

Therapie der CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis im Tiermodell durch Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III (Biologie und Vorklinische Medizin) der Universität
Regensburg

vorgelegt von
Christine Sattler
aus Schwanstetten
2006

Promotionsgesuch eingereicht am 1.2.2006

Prüfungsausschuss: Vorsitzender	Prof. Dr. Will Minuth
1. Prüfer (Erstgutachten)	Prof. Dr. Rüdiger Schmitt
2. Prüfer (Zweitgutachten)	Prof. Edward K. Geissler, PhD
3. Prüfer	Prof. Dr. Karl Kunzelmann

Die Arbeit wurde angefertigt am Institut für Experimentelle Chirurgie (Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg). Die externe Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Edward K. Geissler, PhD.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	1
1.1.1. Klinisches Bild und Inzidenz	1
1.1.2. Ursachen und Behandlung	2
1.1.3. Immunologische Vorgänge bei CED	3
1.1.4. Tiermodelle für CED	5
1.2. NKT-Zellen (Natürliche Killer T-Zellen)	8
1.2.1. Charakteristika von NKT-Zellen	8
1.2.2. Entwicklung und Vorkommen von NKT-Zellen	14
1.2.3. Immunregulatorisches Potential von NKT-Zellen	17
1.2.4. DX5 ⁺ NKT-Zellen	20
1.3. Ziel der Arbeit	21
2. MATERIAL	24
2.1. Geräte	24
2.2. Verbrauchsmaterial	24
2.3. Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen	25
2.4. Kits	25
2.5. Antikörper	26
2.5.1. Antikörper und Magnetbeads zur Zellsortierung	26
2.5.2. Antikörper zur Durchflusszytometrie	26
2.5.3. Antikörper im Tierversuch und in der Zellkultur	28
2.6. Puffer und Zellkulturmedien	28
2.7. Versuchstiere	29
2.8. Software	29

3.	METHODEN	30
3.1.	Zellisolierung	30
3.1.1.	Zellisolierung durch magnetische Markierung (MACS)	30
3.1.1.1.	Funktionsprinzip der Sortierung	30
3.1.1.2.	Magnetische Sortierung von CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	31
3.1.1.3.	Bestimmung der Leukozytensubpopulationen der Milz mittels FACS	34
3.1.1.4.	Magnetische Sortierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen und CD8 ⁺ Kontrollzellen	35
3.1.2.	Isolierung von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten und Milz	38
3.2.	Durchflusszytometrie (FACS)	38
3.2.1.	Kontrolle der Zellsortierung	40
3.2.2.	Charakterisierung von T-Helfer-Zellen und DX5 ⁺ NKT-Zellen	41
3.2.3.	Intrazelluläre FACS-Färbung	43
3.3.	<i>In vitro</i> -Versuche	43
3.3.1.	Detektion zytokinproduzierender Zellen nach Ko-Kultur	43
3.3.2.	Herstellung eines Proteinextrakts aus Mäusekot	44
3.3.3.	CFSE-Färbung	45
3.3.4.	Ko-Kultur von Lymphozyten mit DX5 ⁺ NKT-Zellen	46
3.4.	Tierversuche	49
3.4.1.	DSS-Modell	49
3.4.2.	CD62L ⁺ CD4 ⁺ Transferkolitis-Modell	50
3.4.3.	Präventive Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen im CD62L ⁺ CD4 ⁺ Modell	51
3.4.4.	Therapeutische Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen im CD62L ⁺ CD4 ⁺ Modell	53
3.5.	HE-Färbung und Histologischer Score	55
3.6.	Auswertung und Statistik	56
3.6.1.	Auswertung der FACS-Daten	56
3.6.1.1.	Allgemeines	56
3.6.1.2.	Charakterisierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen und T-Helfer-Zellen	57
3.6.1.3.	Detektion zytokinproduzierender Zellen	58
3.6.2.	Auswertung der <i>In vitro</i> -Versuche	58

3.6.3.	Auswertung der Tierversuche	58
3.6.4.	Statistik	59
4.	ERGEBNISSE	60
4.1.	Zellisolierung durch magnetische Markierung	61
4.1.1.	Isolierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen aus der Milz	61
4.1.2.	Isolierung von CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	63
4.2.	Durchflusszytometrie	65
4.2.1.	Oberflächenmarker auf T-Helfer-Zellen	65
4.2.2.	Oberflächenmarker auf DX5 ⁺ NKT-Zellen	69
4.3.	Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen <i>in vitro</i>	73
4.3.1.	Zytokinproduzierende Zellen nach Ko-Kultur	73
4.3.2.	Effekt in Ko-Kultur mit CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	75
4.3.3.	Effekt in Ko-Kultur mit Lymphozyten aus Tieren mit DSS-Kolitis	80
4.4.	<i>In vivo</i> Versuche	85
4.4.1.	Etablierung des CD62L ⁺ CD4 ⁺ Transferkolitis-Modells	85
4.4.2.	Präventive Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen im CD62L ⁺ CD4 ⁺ Modell	88
4.4.2.1.	Effekt auf die Kolitis im Vergleich zu Kontrollzellen	88
4.4.2.2.	Blockierung der NKT-Zell-Wirkung durch anti-CD1d-Antikörper	93
4.4.3.	Therapeutische Wirkung im CD62L ⁺ CD4 ⁺ Modell	98
5.	DISKUSSION	103
5.1.	CD62L ⁺ CD4 ⁺ Transferkolitismodell	103
5.1.1.	Isolierung der Zellen und Etablierung des Tiermodells	103
5.1.2.	Charakterisierung der CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen im FACS	105
5.2.	Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	106
5.2.1.	Isolierung und Charakterisierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	106
5.2.2.	Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen im CD62L ⁺ CD4 ⁺ Modell	110
5.3.	Ausblick	118
6.	ZUSAMMENFASSUNG	121
7.	LITERATURVERZEICHNIS	128
8.	DANKSAGUNG	147

9.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	148
----	---------------------------	-----

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Kategorien von NKT-Zellen der Maus nach MacDonald et al.	13
Tabelle 2:	Zur Bestimmung der Splenozytensubpopulationen eingesetzte Antikörper	35
Tabelle 3:	Grundeinstellungen am Durchflusszytometer	39
Tabelle 4:	Untersuchte Oberflächenmoleküle auf T-Helfer-Zellen und DX5 ⁺ NKT-Zellen	42
Tabelle 5:	Konzentrationen der verwendeten monoklonalen Antikörper und des Caspase-Inhibitors	48
Tabelle 6:	Experimentelle Gruppen zur Untersuchung der präventiven Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen bei CD62L ⁺ CD4 ⁺ Kolitis	53
Tabelle 7:	Experimentelle Gruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen bei CD62L ⁺ CD4 ⁺ Transferkolitis	54
Tabelle 8:	Definition des histologischen Scores zur Beurteilung von Schnitten des Colon deszendens	55
Tabelle 9:	Ergebnisse der FACS-Analyse zur Expression von Oberflächenmarkern auf T-Helfer-Zellen	68
Tabelle 10:	Ergebnisse der FACS-Analyse zur Expression von Oberflächenmarkern auf DX5 ⁺ NKT-Zellen	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Charakteristika von NKT-Zellen	9
Abbildung 2:	Schematische Darstellung zur Selektion von NKT-Zellen	16
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Funktionen von NKT-Zellen	18
Abbildung 4:	Funktionsprinzip einer magnetischen Sortierung in zwei Schritten	31
Abbildung 5:	Magnetische Sortierung von CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	33
Abbildung 6:	Magnetische Sortierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	37
Abbildung 7:	CFSE-gefärbte Lymphozyten	46
Abbildung 8:	Ko-Kultur aus DX5 ⁺ NKT-Zellen und CFSE-gefärbten CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	48
Abbildung 9:	Modell der chronischen DSS-Kolitis	50
Abbildung 10:	Zeitplan zur Untersuchung der präventiven Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen bei CD62L ⁺ CD4 ⁺ Transferkolitis	52
Abbildung 11:	Zeitplan zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen bei CD62L ⁺ CD4 ⁺ Transferkolitis	54
Abbildung 12:	Schematische Beschreibung der FACS-Auswertung	57
Abbildung 13:	Experimentelle Ziele	60
Abbildung 14:	Repräsentative FACS-Analyse von DX5 ⁺ NKT-Zellen und CD8 ⁺ Zellen nach Sortierung	63
Abbildung 15:	Repräsentative FACS-Bilder von CD4 ⁺ Zellen nach Sortierung	64
Abbildung 16:	Repräsentative Histogramme zur Expression von CD4, CD62L und CD45RB auf CD62L ^{low} CD4 ⁺ und CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	66
Abbildung 17:	Repräsentative Histogramme zur Expression von PD-L1, PD1 und CD1d auf CD62L ^{low} CD4 ⁺ und CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	67
Abbildung 18:	Repräsentative Histogramme zur Expression von CD40 und CD154 auf CD62L ^{low} CD4 ⁺ und CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	68
Abbildung 19:	Repräsentative Histogramme zur Expression von CD1d, CD3, CD4, CD8, CD25, CD38, CD40, CD45RB und DX5 (CD49b) auf DX5 ⁺ NKT-Zellen	70
Abbildung 20:	Repräsentative Histogramme zur Expression von CD62L, CD103, CD154, PD1, PD-L1 und CTLA-4 auf DX5 ⁺ NKT-Zellen	72
Abbildung 21:	Repräsentative Histogramme zur Expression von ICAM-1, LFA-1, Integrin α 4 β 7, V β 8.1, 8.2 und α β TCR auf DX5 ⁺ NKT-Zellen	72
Abbildung 22:	Prozentualer Anteil zytokinproduzierender CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	74
Abbildung 23:	Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen	75

Abbildung 24:	Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Inkubierung ohne Zell-Zell-Kontakt	76
Abbildung 25:	Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Zugabe eines irreversiblen Caspase-Inhibitors	77
Abbildung 26:	Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD1d bzw. PD-L1	79
Abbildung 27:	Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD40 und CD154	79
Abbildung 28:	Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen	81
Abbildung 29:	Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Inkubierung ohne Zell-Zell-Kontakt	81
Abbildung 30:	Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Zugabe eines Caspase-Inhibitors	82
Abbildung 31:	Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD1d und PD-L1	83
Abbildung 32:	Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD40 und CD154	84
Abbildung 33:	Gewichtsverlauf bei Transferkolitis	86
Abbildung 34:	Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der zwei Versuchsgruppen zur Etablierung des Transferkolitis-Modells	87
Abbildung 35:	Histologischer Score von Tieren mit CD62L ^{low} CD4 ⁺ Zellen und Tieren mit CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	87
Abbildung 36:	Gewichtsverlauf nach Injektion von CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen mit bzw. ohne zusätzliche Injektion von DX5 ⁺ NKT-Zellen	89
Abbildung 37:	Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der zwei Versuchsgruppen zur Untersuchung der präventiven Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	90
Abbildung 38:	Histologischer Score von Tieren der Kontrollgruppe und Tieren mit DX5 ⁺ NKT-Zellen	90
Abbildung 39:	Gewichtsverlauf der drei Versuchsgruppen zur Untersuchung der präventiven Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen im Vergleich zu CD8 ⁺ Kontrollzellen	92
Abbildung 40:	Repräsentative histologische Schnitte des Kolons von Tieren mit CD8 ⁺ Kontrollzellen, Tieren mit DX5 ⁺ NKT-Zellen und Kontrolltieren	92

Abbildung 41:	Histologischer Score von Kontrolltieren, Tieren mit DX5 ⁺ NKT-Zellen und Tieren mit CD8 ⁺ Kontrollzellen	93
Abbildung 42:	Gewichtsverlauf von Kontrolltieren, Tieren mit DX5 ⁺ NKT-Zellen und Tieren mit DX5 ⁺ NKT-Zellen + anti-CD1d	95
Abbildung 43:	Histologischer Score der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der Wirkung eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d	96
Abbildung 44:	Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der Wirkung eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d	97
Abbildung 45:	Gewichtsverlauf der drei Versuchsgruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	99
Abbildung 46:	Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	100
Abbildung 47:	Histologischer Score der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen	101
Abbildung 48:	Schematische Darstellung zur möglichen Aktivierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen durch CD62L ⁺ CD4 ⁺ Zellen	114
Abbildung 49:	Schematische Darstellung der möglichen Wirkungsweise von DX5 ⁺ NKT-Zellen im Transferkolitis-Modell	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α GalCer	α -Galactosylceramid
AICD	<i>activation induced cell death</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFSE	Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-Ester
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
DSS	Dextran-Natriumsulfat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HE	Hämatoxilin/Eosin
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
iGb3	Isoglobotrihexosylceramid

IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LFA	<i>leukocyte function associated molecule</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MC	Morbus Crohn
mdr1a	<i>multidrug resistance gene 1a</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Mio	Million
MLN	Mesenteriale Lymphknoten
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>programmed death</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der RNA
SAMP 1	<i>senescence accelerated mouse P1</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNBS	Trinitrobenzen Sulphonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen

U	<i>units</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>

1. EINLEITUNG

1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.1.1. Klinisches Bild und Inzidenz

Unter dem Begriff „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (= CED) werden die zwei Krankheitsbilder der Colitis ulcerosa (CU) und des Morbus Crohn (MC) zusammengefasst. Bei diesen Krankheiten handelt es sich um chronische Entzündungen des Gastrointestinaltrakts, die einige klinische und pathologische Merkmale teilen, sich aber in histopathologischer und klinischer Hinsicht durchaus unterscheiden [148]. Bei CU beschränkt sich die Entzündung meist auf die intestinale Mukosa (Lamina propria und Epithel) des Kolons und selten auch des Ileums, während andere Bereiche des Gastrointestinaltrakts nicht betroffen sind. Es kommt zur Einwanderung von Lymphozyten und Granulozyten in die Mukosa, sowie zum Verlust der Becherzellen und zu Abszessen der Krypten. Klinisch äußert sich CU in Durchfällen mit Blutverlust, im Nachlassen der Darmperistaltik und in schweren Fällen in einer Darmperforation [16]. Bei MC können alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts betroffen sein. Am häufigsten ist eine Entzündung des Ileums und des Kolons. Es liegen nebeneinander nicht-betroffene und entzündete Areale vor [16]. Die Entzündung kann sämtliche Schichten der Darmwand betreffen. Histologisch zeigt sich eine dichte Infiltration durch Lymphozyten und Makrophagen in allen Schichten der Darmwand, verbunden mit dem Auftreten von Granulomen. Die Betroffenen leiden unter Durchfällen, starken Schmerzen und einer Verengung des Darmlumens, was zu Abszessen und zur Fistelbildung führen kann.

In Europa werden pro Jahr zwischen 50.000 und 68.000 neue Fälle von UC und 23.000 bis 41.000 neue Fälle von MC diagnostiziert [71]. Während die Inzidenzrate für MC in den letzten Jahren ansteigt, bleibt diese für CU gleich. Insgesamt sind in Europa ca. 2,2 Mio Menschen von CED betroffen, wobei der Anteil in Nordeuropa höher ist als in Mittel- und Südeuropa. In Nordamerika liegt die Inzidenzrate zwischen 7.000 und 46.000 neuen CU-Fällen und 10.000 bis 47.000 neuen MC-Fällen pro Jahr. Insgesamt gibt es ca. 1,4 Mio CED-Kranke in Nordamerika. Auch hier gibt es ein Nord-Süd-Gefälle mit der höchsten Rate an Erkrankten im Bundesstaat Minnesota. Die Diagnose CED wird im Durchschnitt im zweiten oder dritten Lebensjahrzehnt gestellt, was für die Betroffenen eine lebenslange Einschränkung ihrer Lebensqualität bedeutet. Durch häufige Krankenhausaufenthalte der CED-Betroffenen und die benötigten Medikamente werden hohe Kosten für das Gesundheitssystem verursacht [148].

1.1.2. Ursachen und Behandlung

Trotz intensiver Forschung konnte bisher keine eindeutige Ursache für CED gefunden werden. Nach aktuellem Forschungsstand scheint eine Vielzahl an Faktoren, wie genetische Veranlagung, Ernährungsgewohnheiten oder die hygienischen Verhältnisse in der Kindheit eine Rolle zu spielen. Nach momentanem Stand sind mindestens acht verschiedene Gene mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert [53]. Allerdings gibt es kein eindeutiges „CED-Gen“, das für diese Erkrankungen verantwortlich ist, sondern es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen. Einzig für das CARD15/NOD2-Gen konnte eine enge Verbindung zum Krankheitsbild des MC nicht aber der CU nachgewiesen werden [53; 98; 118]. In mehreren Studien wurde der Einfluss einer Appendektomie auf die Entwicklung von CED untersucht, da diese Auswirkungen auf das mukosale Immunsystem im Darm hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Appendektomie im Bezug auf CU eine protektive Rolle spielt [45; 105; 113]. Für MC sind die Ergebnisse nicht eindeutig, aber einige Ergebnisse- sowohl aus klinischen Studien als auch aus experimentellen Arbeiten- weisen auch hier auf eine positive Wirkung hin [2; 36; 101]. Gegenteilige Ergebnisse lassen einen kolitisfördernden Effekt der Appendektomie in Bezug auf MC vermuten [1]. Allerdings könnten diese darauf zurückzuführen sein, dass fälschlicherweise Appendektomien aufgrund entsprechender- durch den MC verursachter- Beschwerden durchgeführt wurden. Die Diagnose CED wurde erst nach erfolgter Operation gestellt. In den genannten Studien wurde dann irrtümlicherweise eine Verbindung zwischen Appendektomie und CED-Entstehung angenommen, wobei aber tatsächlich kein ursächlicher Zusammenhang bestand [105]. Auch der Einfluss einer Masern-Infektion bzw. einer Impfung gegen Masern wurde in Studien untersucht, da hier ein CED-fördernder Effekt angenommen wurde. Allerdings konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit CED festgestellt werden [71]. Experimentelle Tiermodelle deuten darauf hin, dass es bei CED zu einer überschießenden Immunreaktion auf luminale Antigene kommt, die vom Immunsystem Gesunder normalerweise toleriert werden [26]. Diese Vermutungen konnten mittlerweile auch durch entsprechende Untersuchungen an Patienten bestätigt werden [83].

Behandelt werden chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Allgemeinen mit Glukokortikoiden, die aber nur in 60% der Fälle eine Remission induzieren und darüber hinaus schwerwiegende Nebenwirkungen wie z.B. Herzinsuffizienz, Diabetes oder Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem haben. Bei CU oder Formen des MC,

die nur den Dickdarm betreffen, können auch Aminosalizylate zur Therapie eingesetzt werden. Wenn diese Medikamente keine Wirkung zeigen, werden häufig nicht-steroidale Immunsuppressiva wie z.B. Azathioprin und Cyclosporin oder Mittel mit antibakterieller Wirkung wie Metronidazol eingesetzt. Zusätzlich ist eine chirurgische Intervention möglich, bei der die betroffenen Darmabschnitte entfernt werden. Eine Heilung mittels eines chirurgischen Eingriffs ist nur für Colitis ulcerosa möglich, indem der gesamte Dickdarm entfernt wird (=Proktokolektomie). Da dies aber ein großer operativer Eingriff ist, wird diese Möglichkeit meist erst genutzt, wenn die medikamentöse Behandlung nicht mehr anspricht. Eine Heilung des Morbus Crohn ist derzeit nicht möglich.

1.1.3. Immunologische Vorgänge bei CED

Bei CED kommt es zu verschiedenen Veränderungen im Bereich des Darmepithels, die die Entzündungsreaktion fördern, wie z.B. einer erhöhten Permeabilität des Epithels für bakterielle Antigene [129]. Die Präsentation bakterieller Antigene durch Epithelzellen bewirkt nicht wie beim Gesunden eine T-Zell-Toleranz gegen diese Antigene sondern eine T-Zell-Aktivierung [80]. Zusätzlich werden verschiedene entzündungsinduzierende Zytokine und Chemokine ausgeschüttet [55].

Wichtige Schritte, die sehr früh in der Krankheitsentstehung zu beobachten sind, sind Interaktionen zwischen Leukozyten in den Blutgefäßen und Endothelzellen [58]. Im Zuge der beginnenden Entzündungsreaktion kommt es zunächst zur vermehrten Expression von Selektinen auf Leukozyten und Endothelzellen kleinerer Blutgefäße (postkapilläre Blutgefäße). Dies bewirkt eine schwache Bindung zwischen den beiden genannten Zelltypen, so dass die Leukozyten im Blutstrom verlangsamt werden (= „rolling“). Über Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie auf Endothelzellen wird dann eine feste Bindung vermittelt (= „sticking“). Dies erfolgt über Interaktionen zwischen „intercellular adhesion molecule 1“ (= ICAM-1) und „vascular cell adhesion molecule 1“ (= VCAM-1) auf Endothelzellen und deren Liganden „leucocyte function associated molecule 1“ (= LFA-1) und Integrin $\alpha 4\beta 7$ auf Leukozyten. Daraufhin erfolgt die Migration der Leukozyten ins entzündete Gewebe, was ebenfalls durch Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie wie ICAM-1, VCAM-1 oder PECAM-1 (= „platelet endothelial cell adhesion molecule 1“) vermittelt wird.

Bei CED handelt es sich um eine Form von Autoimmunerkrankung. In der Art der Immunreaktion gibt es deutliche Unterschiede zwischen CU und MC. Colitis ulcerosa stellt eine Th2-Immunantwort (=T-Helfer2-Immunantwort) des Immunsystems dar, während MC einer Th1-Antwort (=T-Helfer1-Antwort) entspricht. Diese Unterscheidung beruht auf den Charakteristika der beteiligten T-Helfer-Zellen (CD4⁺ Zellen). Die Aufgabe von Th1-Zellen besteht v.a. in einer Aktivierung von Makrophagen, die über das Zytokin IFN γ vermittelt wird. Th2-Zellen sind dagegen zuständig für die Aktivierung von B-Zellen und bilden die charakteristischen Zytokine IL-4 und IL-5. Die Prozesse zu Beginn der Immunantwort sind bei beiden Varianten gleich. Ins Gewebe vordringende Bakterien werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen und die Antigene in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Durch den Kontakt mit Bakterien werden die Makrophagen aktiviert und exprimieren neben MHC-Klasse II auch co-stimulatorische Moleküle wie z.B. B7. Treffen nun CD4⁺ Zellen mit dem für das Antigen passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) auf die APZ, so erhalten sie zwei Aktivierungssignale. Signal 1 wird über den TCR vermittelt, das zweite Signal wird über CD28 auf den CD4⁺ Zellen vermittelt, das B7 auf den APZ erkennt. Nur wenn beide Signale vorhanden sind, kommt es zur Aktivierung der CD4⁺ Zelle. Sie differenziert sich dann- in Abhängigkeit von der Art des Erregers und vom umgebenden Zytokinmilieu- zu einer Th1- oder Th2-Zelle.

Eine Th2-Immunantwort findet man bei CU. Hier werden bakterielle Antigene von B-Zellen mit dem passenden B-Zell-Rezeptor aufgenommen und auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert. Nach diesem ersten Aktivierungssignal für die B-Zelle ist ein weiteres Signal nötig, um die B-Zelle endgültig zu aktivieren. Dieses Signal wird von aktivierten Th2-Zellen geliefert, die das Fremdartigen auf der B-Zelle erkennen und daraufhin IL-4 und IL-5 ausschütten. Dies bewirkt die Proliferation der B-Zelle und ihre Differenzierung zur Plasmazelle. Die für eine Th2-Immunantwort charakteristischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie das Auftreten von Autoantikörpern, können bei CU nachgewiesen werden [16; 83]. Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, ob diese Autoantikörper für die Entstehung von Gewebeschäden bei CU verantwortlich sind. Die überwiegend bei Th2-Antworten vorkommenden Immunglobuline IgG1 und IgG4 sind bei CU erhöht.

Morbus Crohn dagegen wird durch eine Th1-Immunantwort aufrechterhalten. Die bakteriellen Antigene auf den APZ (v.a. Makrophagen) werden durch aktivierte Th1-Zellen erkannt. Diese reagieren daraufhin mit der Expression von CD154 (CD40L) und

der Sezernierung von $\text{IFN}\gamma$. Beide Signale werden von den Makrophagen über die entsprechenden Rezeptoren erkannt. Es kommt in der Folge zur Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ sowohl durch Makrophagen als auch durch Th1-Zellen. Dies bewirkt eine Stimulierung von Makrophagen, die daraufhin mit der Produktion von antimikrobiell wirksamen Peptiden und anderen bakterizid wirksamen Substanzen beginnen. Th1-Zellen erhalten ein Signal für ihre eigene Proliferation aufrecht, indem sie IL-2 freisetzen. Eine Schlüsselrolle bei MC spielt offenbar das Zytokin IL-12, das die Synthese von $\text{IFN}\gamma$ induziert [16; 83].

Momentan ist es, gerade bei MC, nur möglich, die Auswirkungen der überschießenden Immunantwort mit Medikamenten zu behandeln. Da diese aber häufig schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen, ist eine solche Therapie nicht als Optimallösung anzusehen. Ein guter Ansatz wäre es, das Immunsystem mit Hilfe körpereigener Kontrollmechanismen und nicht mit Medikamenten in chemischer Form zu regulieren. Ein möglicher Weg führt über regulatorische Zellpopulationen, die innerhalb der körpereigenen Leukozytenpopulationen zu finden sind. In Frage kommen hier klassische regulatorische T-Zellen ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$), T-Suppressor-Zellen ($\text{CD8}^+\text{CD28}^-$) oder auch NKT-Zellen. Auf NKT-Zellen und deren immunregulatorische Funktionen soll in dieser Arbeit näher eingegangen werden.

1.1.4. Tiermodelle für CED

Wichtige Erkenntnisse zur Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen können aus Tiermodellen gewonnen werden. Es gibt hierbei verschiedene Ansätze, Darmentzündungen bei Versuchstieren auszulösen [30; 103; 110].

Eine Gruppe von Tiermodellen beruht darauf, dass durch die Gabe bestimmter Chemikalien oder bakterieller Antigene in ursprünglich gesunden Tieren eine Darmentzündung verursacht wird. Im DSS-Modell bewirkt die einmalige Gabe von Dextran-Natriumsulfat (= DSS) im Trinkwasser eine akute Kolitis mit Durchfall, Gewichtsverlust, Verkürzung des Kolons und Einwanderung von Neutrophilen in das Colon deszendens [30]. Eine wiederholte Gabe von DSS führt zu einer chronischen Kolitis mit Zellinfiltraten in der Lamina propria und der Serosa, sowie einer fleckenartig verteilten Entzündung und Zerstörung der Mukosa [30]. Die Gewebszerstörung wird zumindest in der Akutphase nach erster Gabe von DSS- vermutlich durch Zellen des

angeborenen Immunsystems verursacht, da eine akute DSS-Kolitis auch in SCID-Mäusen, die kein adaptives Immunsystem besitzen, induziert werden kann [24]. Das DSS-Modell weist Ähnlichkeiten zur Colitis ulcerosa auf, da v.a. das Colon descendens befallen wird. Allerdings sind die für CU typischen Abszesse der Krypten hier selten zu beobachten. Mit den massiven Zellinfiltraten und der ungleichmäßigen Verteilung der Entzündung gibt es auch Ähnlichkeiten zu Morbus Crohn. Dieses Modell kann also nicht als Modell für eine bestimmte Form von CED betrachtet werden. In der Akut-Phase kann die DSS-Kolitis v.a. als Modell für die Zerstörung des Darmepithels und die damit verbundenen Heilungsprozesse angesehen werden [147]. Eine durch mehrere DSS-Gaben verursachte chronische DSS-Kolitis zeigt dagegen mehr Ähnlichkeiten zu humaner CED. Das DSS-Modell wird sehr häufig verwendet, da die Induzierung der Kolitis einfach durchzuführen und sehr gut reproduzierbar ist. Aus diesem Grund haben auch wir uns entschlossen, u.a. dieses Modell in Form der chronischen DSS-Kolitis in unserem Labor zu verwenden.

Weitere Tiermodelle beschäftigen sich mit spontan auftretender Kolitis wie sie z.B. bei den ursprünglich in Kolumbien beheimateten Liszt-Affen (*Saguinus oedipus*) zu beobachten ist. Auch bei Mäusen gibt es spontan auftretende CED. Durch selektive Züchtung wurde diese Eigenschaft in den entsprechenden Tierstämmen weiter gefördert, so dass auch hier eine hohe Reproduzierbarkeit vorliegt [79; 117; 147].

Eine dritte Gruppe von Tiermodellen beschäftigt sich mit Kolitis-Formen, die durch genetische Veränderung verursacht werden. Wichtig sind hier besonders Tiere, bei denen die Gene für bestimmte Zytokine „ausgeschaltet“ wurden. Interleukin-2 knock-out-Mäuse entwickeln im Alter von ca. 10 Wochen eine schwere Kolitis, die durch eine Th2-Immunantwort geprägt wird, demnach also Ähnlichkeiten zu CU aufweist. IL-10 knock-out-Mäuse erkranken dagegen an einer durch eine Th1-Immunantwort verursachten ebenfalls sehr aggressiven Form von CED, die den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen kann. Die Entstehung dieser Kolitis kann durch die Gabe von IL-10 oder durch den Transfer von IL-10-positiven Lymphozyten verhindert werden [124]. Die massiven Folgen, die ein „knock-out“ bestimmter Zytokin-Gene in Bezug auf CED hat, zeigt die große Bedeutung dieser Zytokine bei CED. Weitere Tiermodelle mit „Knock-out“-Tieren werden durch Defekte verursacht, die die T-Zell-Funktion ($\text{TCR}\alpha^{-/-}$ -Tiere) oder die Epithelzellfunktion ($\text{mdr1a}^{-/-}$ -Tiere) betreffen [132].

Eine vierte Gruppe von Tiermodellen nutzt immundefiziente Tiere, bei denen mit Hilfe eines Transfers syngener oder kongener, aus gesunden Tieren stammender, T-Zellsubpopulationen eine Kolitis ausgelöst werden kann. Bei SCID-Mäusen oder RAG^{-/-} Mäusen, die defizient für B- und T-Zellen sind, wird durch den Transfer von CD4⁺ Zellen aus immunkompetenten Tieren, die eine hohe Expression von CD45RB aufweisen (=naive T-Helfer-Zellen) eine Kolitis ausgelöst [30; 100]. Diese kolitisverursachenden Zellen gibt es auch in gesunden immunkompetenten Tieren. Allerdings werden sie hier von regulatorisch wirksamen T-Zellpopulationen kontrolliert, so dass unter normalen Umständen keine Kolitis entsteht. In immundefizienten Tieren fehlen regulatorische T-Zellen, so dass hier eine Kolitis induziert werden kann. Zur Isolierung von naiven T-Helfer-Zellen, die zur Kolitis-Induzierung gebraucht werden, gibt es zwei Möglichkeiten. Bei der ersten Möglichkeit wird neben dem Marker CD4 für T-Helfer-Zellen der Marker CD45RB verwendet, der von naiven CD4⁺ Zellen sehr stark (CD45RB^{high}), aber auf Memory-CD4⁺ Zellen nur sehr schwach (CD45RB^{low}) exprimiert wird [68]. Die zweite Möglichkeit verwendet den Marker CD4 zusammen mit CD62L, das nur auf naiven T-Helfer-Zellen zu finden ist [68]. Im Zuge der Entwicklung naiver CD4⁺ Zellen zu Memory CD4⁺ Zellen wird CD62L von der Oberfläche abgespalten [54]. Die Entzündung entspricht einer Th1-Immunantwort, die von CD4⁺ Zellen hervorgerufen wird und ähnelt darin MC beim Menschen. Im CD45RB-Modell wird eine Kolitis durch gleichzeitigen Transfer von CD4⁺CD45RB^{low}-Zellen bzw. von nicht weiter aufgereinigten CD4⁺ Zellen verhindert [86; 99; 100]. Es reicht also offensichtlich eine relativ geringe Menge an Memory CD4⁺ Zellen im Verhältnis zu naiven CD4⁺ Zellen, um die Entstehung einer Kolitis zu verhindern. Es entsteht ebenfalls keine Kolitis, wenn die Tiere in keimfreier Umgebung gehalten werden, was für eine wichtige Rolle bakterieller Antigene bei der Induzierung einer Kolitis spricht.

Das Modell der Transferkolitis ist ein sehr artifizielles Modell. Es werden hier immundefiziente Tiere verwendet, die mit bestimmten T-Zell-Subpopulationen rekonstituiert werden. Dies unterscheidet sich natürlich stark vom klinischen Bild, wo voll-immunkompetente Patienten von CED betroffen sind. Dennoch ist es ein Modell, das für die Erforschung von CED sehr wichtig ist. Es bietet die Möglichkeit, gezielt den Effekt bestimmter Zellpopulationen auf die Kolitis-Entstehung und -Therapie zu untersuchen. Aus diesem Grund haben auch wir uns für die Verwendung dieses Modells entschieden, um hier den Effekt von regulatorischen Zellen wie z.B. NKT-Zellen auf die Kolitis zu untersuchen.

Durch die hier beschriebenen Tiermodelle konnten bereits wichtige Erkenntnisse zur Immunpathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, insbesondere des MC gewonnen werden. Bei CED herrscht offensichtlich ein Ungleichgewicht zwischen Effektor-Zellen (zu viel) und regulatorischen Zellen (zu wenig) [16]. CED kann im Tiermodell ähnlich wie beim Menschen auf zwei verschiedenen Wegen entstehen. Die erste Möglichkeit besteht in einer Th1-Immunantwort mit vermehrter Produktion von IL-12, IFN γ und/oder TNF α , die von T-Helfer-Zellen dominiert wird. Dies findet man z.B. beim CD45RB^{high}-Transferkolitis-Modell. Die zweite Möglichkeit entspricht einer Th2-Immunantwort mit gesteigerter Bildung von IL-4, IL-5 und/oder IL-13, was z.B. beim Modell der Oxazalon-induzierten Kolitis der Fall ist.

Im oben erwähnten Transferkolitis-Modell konnte gezeigt werden, dass die Kolitis-Entstehung durch den Transfer regulatorischer Zellen verhindert werden kann [145; 146]. Es handelt sich hier um klassische CD4⁺CD25⁺ Zellen, die für ihre Wirkung *in vivo* IL-10 und TGF β brauchen. Eine andere Zellpopulation, die immunregulatorische Funktionen besitzt und möglicherweise Autoimmunerkrankungen wie CED kontrollieren könnte, sind NKT-Zellen. Diese Zellen sollen im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

1.2. NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen)

1.2.1. Charakteristika von NKT-Zellen

NKT-Zellen sind eine Zellpopulation, die sowohl Eigenschaften von T-Zellen als auch Eigenschaften von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) besitzt (siehe auch Abb. 1). Sie sind wie T-Zellen Thymus-abhängig und besitzen einen T-Zell-Rezeptor. Ähnlich wie NK-Zellen sind sie aber im Unterschied zu T-Zellen nicht MHC-restringiert und exprimieren Oberflächenmarker, die charakteristisch für NK-Zellen sind. Genau wie T-Zellen und NK-Zellen besitzen NKT-Zellen zytotoxische Eigenschaften und können IFN γ bilden. NKT-Zellen können weder dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, zu dem NK-Zellen gehören, noch dem erworbenen Immunsystem, das die B- und T-Lymphozyten beinhaltet. Sie stehen zwischen diesen beiden Systemen und gelten als Vermittler zwischen ihnen [126]. Sie können zum einen APZ über IFN γ aktivieren und die Proliferation von NK-Zellen stimulieren (angeborenes Immunsystem). Außerdem können sie aber auch CD4⁺ Zellen über Zytokine wie IFN γ

oder IL-4 In Richtung Th1- oder Th2-Antwort beeinflussen und B-Zellen über bisher noch unbekannte Signalwege aktivieren (erworbenes Immunsystem).

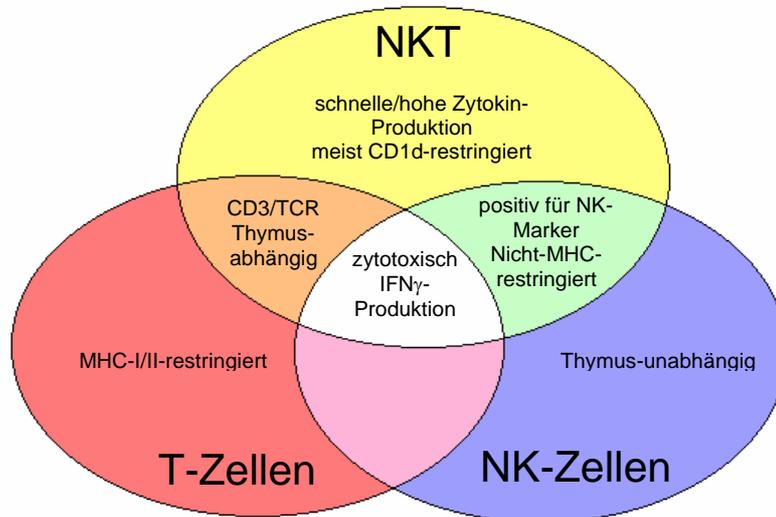


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Charakteristika von NKT-Zellen im Vergleich zu T-Zellen und NK-Zellen [modifiziert nach 46]

NKT-Zellen wurden erstmals 1987 durch Fowlkes et al., sowie Budd et al. unter der Bezeichnung „ $\alpha\beta$ TCR⁺ CD4⁻CD8⁻ (=doppelt negative =DN) Thymozyten“ in C57BL/6-Mäusen beschrieben [18; 38]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Zellen den NK-Zell-Marker NK1.1 exprimierten [10; 11]. Die momentan gängige und allgemein anerkannte Definition für murine NKT-Zellen charakterisiert diese als NK1.1⁺ und gleichzeitig $\alpha\beta$ TCR⁺ [46; 51]. Sie exprimieren außerdem weitere Marker für Natürliche Killer-Zellen wie CD122, CD16 und CD49b (= $\alpha 2$ -Integrin; detektiert über den Antikörper-Klon DX5) [51]. Die Zellen weisen einen Memory-/ Effektor-Phänotyp auf und sind CD44^{high}, CD69⁺, CD62L^{low}, CD38⁺ und Ly6C⁺. NKT-Zellen besitzen ein eingeschränktes T-Zell-Rezeptor-Repertoire (TCR-Repertoire). 85% der murinen NKT-Zellen besitzen einen TCR bestehend aus der α -Kette V α 14J α 18 (früher: J α 281). Die β -Kette des TCR besteht bei 50% der NKT-Zellen aus V β 8.2, ansonsten meist aus V β 2 oder V β 7 [74]. Diese NKT-Zellen mit ihrem stark begrenzten TCR-Repertoire werden auch häufig als „invariante“ NKT-Zellen oder iNKT-Zellen bezeichnet [126]. Da es aber auch NKT-Zellen mit anderen TCR-Ketten gibt, schlagen Stenström et al. eine

Unterscheidung von zwei verschiedenen Gruppen vor [116]. Gruppe 1 stellen NKT1-Zellen dar, die einen variablen TCR besitzen, sowie DX5 exprimieren und negativ für CD69 sind. NKT2-Zellen dagegen sind DX5-negativ oder -low, besitzen einen invarianten TCR und sind positiv für CD69. Beide Gruppen produzieren nach Aktivierung IL-4 und IFN γ , wobei NKT2-Zellen mehr IL-4 bilden können als NKT1-Zellen. Trotz dieser Unterschiede zeigen sowohl NKT1- als auch NKT2-Zellen ähnliche Funktionen, und es soll deshalb im Folgenden nicht mehr explizit zwischen NKT1- und NKT2-Zellen unterschieden werden.

NKT-Zellen sind in ihrer Entwicklung und Aktivierung abhängig vom MHC-Klasse-I-ähnlichen Molekül CD1d (homolog beim Menschen und bei der Maus), das im Gegensatz zu konventionellen MHC-Molekülen nicht Peptide sondern Lipide auf seiner Oberfläche präsentiert [46; 47; 91]. CD1d wird von vielen Zellarten exprimiert. Es kommt auf Knochenmarkzellen und peripheren Leukozyten, ebenso wie auf Epithelzellen und Thymuszellen vor. CD1d ist auch auf Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts zu finden. Dies zeigt, dass NKT-Zellen im Darm aktiviert werden können und somit das Potential haben, regulatorische Einflüsse bei CED auszuüben. Das Lipid, das natürlich vorkommend mit CD1d assoziiert ist, konnte lange Zeit nicht eindeutig identifiziert werden. Neuere Arbeiten zeigen, dass NKT-Zellen durch mykobakterielle Phosphatidylinositol-Mannoside oder körpereigene lysosomale Glycosphingolipide aktiviert werden, die über CD1d präsentiert werden [37; 133; 134]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass den NKT-Zellen eine spezielle Rolle bei der Abwehr von Infektionen mit Gram-negativen Bakterien zukommt [133]. Hier kann es je nach Bakterienart zu einer direkten oder indirekten Aktivierung von NKT-Zellen kommen. Die direkte Aktivierung erfolgt durch die Präsentation bakterieller Antigene durch CD1d [133]. Dies kommt bei Infektionen mit Gram-negativen Bakterienarten vor, die kein LPS bilden. Bei Infektionen mit LPS-produzierenden Gram-negativen Bakterien dagegen kommt es zu einer indirekten Aktivierung der NKT-Zellen, indem körpereigene Glycosphingolipide durch CD1d präsentiert werden. In experimentellen Arbeiten konnte eine Aktivierung von NKT-Zellen durch das aus einem Meeresschwamm gewonnene Lipid α -Galactosylceramid (= α GalCer), das durch CD1d präsentiert wurde, erreicht werden. Dieses Lipid kann mittlerweile auch synthetisch hergestellt und für Experimente genutzt werden [85].

NKT-Zellen bilden nach Aktivierung über ihren TCR sehr schnell große Mengen an Zytokinen, v.a. an IL-4 und IFN γ [8; 46; 51]. Dies ist möglich, da NKT-Zellen offenbar

mRNA für diese Zytokine auch im Ruhezustand konstitutiv exprimieren. Wie es dann zur schnellen Translation der mRNA und Freisetzung der Zytokine kommt, ist allerdings noch unklar [94]. NKT-Zellen aus verschiedenen Geweben unterscheiden sich in ihrer Aktivierbarkeit *in vivo* [62]. Zur Untersuchung der Aktivierbarkeit wurden nach einer kurzen *in vivo*-Stimulierung NKT-Zellen aus Thymus, Leber und Milz von C57BL/6-Mäusen isoliert und im FACS auf die Expression von IFN γ und IL-4 untersucht. NKT-Zellen aus dem Thymus erwiesen sich als ruhende Zellen, d.h. sie teilen sich nicht und können *in vivo* nur sehr schwer aktiviert werden. NKT-Zellen aus der Leber dagegen können sehr leicht aktiviert werden und bilden dann große Zytokinmengen. Diese Aktivierung führt allerdings zum Zelltod (=activation induced cell death =AICD). NKT-Zellen der Milz liegen in ihrer Reaktivität zwischen den beiden genannten Populationen. Möglicherweise ist die Aktivierbarkeit negativ korreliert mit der Expression von NK-Zell-Markern wie NK1.1 [62]. Leber-NKT-Zellen mit hoher Reaktivität weisen die niedrigste Expression von NK-Zell-Markern auf, NKT-Zellen aus dem Thymus mit niedriger Reaktivität die höchste Expression von NK-Zell-Markern [72; 111].

Abhängig vom Umgebungsmilieu haben NKT-Zellen das Potential sowohl Th1-Zytokine wie IFN γ als auch Th2-Zytokine wie IL-4 zu bilden [46]. Wie der Name „Natürliche Killer T-Zellen“ bereits vermuten lässt, können NKT-Zellen den Zelltod in Zielzellen induzieren. Dafür nutzen sie zwei alternative Mechanismen. Ein Weg führt über den Perforin/Granzym-Weg, der zu einer Aktivierung von Caspasen und damit zum Zelltod führt [114]. Der zweite Weg beruht auf der konstitutiven Expression von Fas-Ligand auf NKT-Zellen, wodurch in Fas-positiven Zielzellen die Aktivierung von Caspasen und folglich Apoptose induziert werden kann [4].

NKT-Zellen stellen eine sehr heterogene Gruppe dar. Basierend auf der Expression von T-Zell-Markern unterscheidet man drei große Gruppen von NKT-Zellen: CD4⁻CD8⁻ (= DN) NKT-Zellen, CD4⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ NKT-Zellen [46; 116]. Einige Autoren sprechen mit DN NKT-Zellen und CD4⁺ NKT-Zellen auch nur von zwei Gruppen an NKT-Zellen [126]. Die Untergruppen unterscheiden sich sowohl in ihrem Phänotyp als auch in ihrer Funktionsweise. Die größte und am besten untersuchte dieser Gruppen stellen die DN NKT-Zellen dar. Sie exprimieren höhere Levels an DX5 (= CD49b; ein Marker für NK-Zellen), CD45RB (ein Aktivierungsmarker) und Ly6C (ein Marker, der auf T-Zell-, NK-Zell- und Granulozyten-Subpopulationen zu finden ist) als andere NKT-Zellen [7; 51]. DN NKT-Zellen aus der Milz werden als CD1d-unabhängig beschrieben.

Sie besitzen ein breiteres TCR-Repertoire als DN NKT-Zellen aus anderen Geweben wie z.B. Thymus und bilden nach Aktivierung geringere Mengen an Zytokinen. CD4⁺ NKT-Zellen sind den DN NKT-Zellen sehr ähnlich in ihrer Funktionsweise und bilden nach Aktivierung ebenfalls große Mengen an Zytokinen [46]. CD8⁺ NKT-Zellen sind die kleinste und am wenigsten untersuchte NKT-Zell-Population. Sie kommen in Milz, Knochenmark und Leber vor. Für das Vorkommen von CD8⁺ NKT-Zellen in Thymus gibt es noch keine eindeutigen Beweise. CD8⁺ NKT-Zellen sind CD1d-unabhängig und besitzen ein sehr heterogenes TCR-Repertoire. Nach Aktivierung *in vitro* bilden sie kein IL-4 [46].

Die Entwicklung von CD1d-Tetrameren, die mit α GalCer beladen sind, machte eine andere Einteilung der NKT-Zellen in vier Kategorien entsprechend ihrer Reaktivität möglich [62; 73; 78]. Kategorie eins bilden Zellen, die NK1.1⁺ sind und einen invarianten TCR besitzen. Sie binden an CD1d-Tetramere und werden durch diese aktiviert. Diese Zellen sind meist CD4⁺ oder DN. Das humane Pendant zu dieser Population bilden T-Zellen mit einer α -Kette des TCR bestehend aus V α 24J α 15. Im Gegensatz zu murinen CD1d-abhängigen NKT-Zellen können sie auch CD8⁺ sein. Sie kommen in geringerer Zahl vor als die entsprechenden Zellen in der Maus [43; 65]. NKT-Zellen der Kategorie zwei besitzen einen variablen TCR und reagieren ebenfalls mit CD1d-Tetrameren. Sie sind in Mensch und Maus zu finden, allerdings in geringerer Zahl als NKT-Zellen der Kategorie eins [21; 96]. Sie sind entweder CD4⁺ oder DN. Zur Kategorie drei gehören NKT-Zellen, die nicht an CD1d-Tetramere binden und CD1d-unabhängig sind [27]. Sie können neben CD4⁺ und DN auch CD8⁺ sein und kommen v.a. im Knochenmark vor. Sie besitzen einen variablen TCR und werden vermutlich über klassische MHC-Klasse-I-Moleküle und nicht über CD1d selektioniert. Die Zellen der Kategorie vier binden nicht an CD1d-Tetramere, sind aber in ihrer Entwicklung und Aktivierung abhängig von CD1d [96]. Eine Erklärung für dieses Phänomen gibt es bislang nicht. Diese NKT-Zellen sind positiv für DX5 (=CD49b) und besitzen ein begrenztes TCR-Repertoire, das sich aber nicht auf V α 14 und V β 8 beschränkt. Sie kommen in Milz und Knochenmark vor und spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Typ1-Diabetes [49].

Wie bereits oben beschrieben konnten auch im Menschen NKT-Zellen nachgewiesen werden [23; 33]. Ihr $\alpha\beta$ TCR besteht aus der α -Kette V α 24J α 15 [126]. Als β -Kette besitzen sie meist V β 11. Man unterscheidet hier wie bei Mäusen DN NKT-Zellen, CD4⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ NKT-Zellen. Sie exprimieren den NK-Zell-Marker CD161, der

dem murinen NK1.1 homolog ist [149]. Humane NKT-Zellen sind ebenfalls abhängig von CD1d, das dem murinen CD1d homolog ist. Nach Aktivierung bilden humane NKT-Zellen ebenfalls große Mengen an IL-4 und IFN γ [66].

	CD1d-Tetramere	CD1d-abhängig?	$\alpha\beta$ TCR	Ko-Rezeptor	NK-Marker	Vorkommen
1	positiv	ja	invariant	CD4 ⁺ , DN	NK1.1 ⁺ DX5 ⁻	Thymus, Leber
2	positiv	ja	invariant	CD4 ⁺ , DN	NK1.1 ^{+/-} DX5 ?	Leber, Thymus
3	negativ	nein	variabel	CD4 ⁺ , DN, CD8 ⁺	NK1.1 ⁺ DX5 ^{+/-}	Knochenmark, Milz
4	negativ	ja	begrenzt	CD4 ⁺ , DN, CD8 ⁺	NK1.1 ^{+/-} DX5 ⁺	Milz, Knochenmark

Tabelle 1: Kategorien von NKT-Zellen der Maus nach MacDonald et al. [73]

Murine NKT-Zellen werden meist wie bereits oben beschrieben als NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺ definiert. Diese Definition wurde an C57BL/6-Mäusen getroffen. Das stellt insofern ein Problem dar, da NK1.1 nur von bestimmten Mausstämmen wie C57BL/6-Mäusen und deren Verwandten exprimiert wird. Für andere häufig in Labors verwendete Stämme wie z.B. Balb/c oder C3H ist die Verwendung anderer Marker nötig. Die Definition von NKT-Zellen als DN $\alpha\beta$ TCR⁺ Zellen ist nur bedingt geeignet, da die auf diese Art charakterisierten Zellen nur einen Teil der NKT-Zellen und zusätzlich auch Nicht-NKT-Zellen beinhalten. Sie entsprechen deshalb nicht der klassischen NKT-Zell-Population aus C57BL/6-Mäusen. Eine mögliche Kombination von Oberflächenmarkern zur Definition von NKT-Zellen ist Ly49A⁺CD122⁺CD3⁺. Mit Hilfe dieser Marker kann eine Subpopulation von NKT-Zellen aus Balb/c NOD-Mäusen isoliert werden. Für Balb/c-Mäuse sind sie nicht geeignet, da hier die Expression von Ly49A auf NKT-Zellen sehr viel niedriger ist [46]. Als Alternative wird die Definition als CD8⁻CD24⁻CD62L⁻3G11⁻ T-Zellen verwendet. Mit diesen Markern kann eine gute Anreicherung von NKT-Zellen aus Leber und Thymus erreicht werden. Für NKT-Zellen aus der Milz sind sie allerdings nicht geeignet, da Zellen dieses Phänotyps aus der Milz von C57BL/6-Mäusen kaum NK1.1 exprimieren und überwiegend nicht an CD1d-Tetramere binden [52]. Es scheint also, dass NKT-Zellen der Milz mit diesen Markern nicht detektiert werden können. NKT-Zellen, die über die Expression von CD49b (= DX5) und CD3

definiert werden, beinhalten laut Literatur nur einen Teil der NKT-Zellen, da CD1d-abhängige NKT-Zellen häufig CD49b negativ (DX5⁻) sind [27; 51]. Dennoch haben wir für unsere Versuche diese Marker gewählt, da gute Antikörper gegen CD3 und DX5 verfügbar sind, die NKT-Zellen der Milz sehr gut detektieren. Darüberhinaus gibt es bereits einige Berichte in der Literatur über CD3⁺DX5⁺ NKT-Zellen, die deren immunregulatorische Wirkung beschreiben [49; 64; 77; 135]. Auf die Population der CD3⁺DX5⁺ NKT-Zellen soll in Abschnitt 1.2.4. näher eingegangen werden.

1.2.2. Entwicklung und Vorkommen von NKT-Zellen

Die Entstehung von NKT-Zellen in der Ontogenese und deren weitere Entwicklung ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Berichte in der Literatur beschreiben, dass NKT-Zellen wahrscheinlich erst später als konventionelle T-Zellen entstehen [11; 27; 74]. Sie waren in Experimenten bei der Geburt noch nicht nachweisbar, sondern reichern sich laut FACS-Analyse erst nach der Geburt in Leber und später in Thymus und Milz an [9; 92]. Makino et al. konnten aber NKT-Zellen in der fötalen Leber nachweisen [75]. Taniguchi et al. berichten, dass NKT-Zellen erstmals an Tag 9,5 in der Ontogenese zu finden sind [120]. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanzen ist, dass zum Nachweis von NKT-Zellen unterschiedliche Methoden verwendet wurden (RT-PCR auf die TCR- α -Kette V α 14 bzw. FACS auf $\alpha\beta$ TCR und V β 8). NKT-Vorläuferzellen, entwickeln sich bereits während der Ontogenese, wandern aber erst nach der Geburt in Thymus, Milz und Leber ein. Sie entwickeln dort ihren endgültigen Phänotyp und sind erst dann mittels FACS nachweisbar [43; 97].

DN NKT-Zellen und CD4⁺ NKT-Zellen werden im Thymus selektioniert, CD8⁺ NKT-Zellen aber nicht [34; 56]. Basierend auf der Tatsache, dass NKT-Zellen auch in der Leber und der Milz von Nacktmäusen- also Tieren ohne funktionellen Thymus- nachweisbar sind, gibt es die Meinung, dass NKT-Zellen grundsätzlich Thymus-unabhängig seien [92; 122]. Da aber mit zunehmendem Alter (>10 Monate) auch konventionelle T-Zellen in Nacktmäusen zu finden sind und die erwähnten Untersuchungen an solchen Tieren durchgeführt wurden, sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu bewerten.

Nach aktuellem Stand der Forschung scheint eine Thymus-Abhängigkeit von NKT-Zellen das Wahrscheinlichste zu sein [9; 10; 11]. Im Thymus kommt es zu einer TCR-

abhängigen Interaktion zwischen NKT-Vorläuferzellen und CD4⁺CD8⁺ Thymozyten (= doppelt positiv = DP Thymozyten), die CD1d exprimieren (siehe auch Abb. 2) [10; 11; 29; 74]. Die Interaktion mit CD1d-exprimierenden DP Thymozyten führt zu einer Positivselektion von CD1d-reaktiven NKT-Vorläuferzellen. Diese Zellen sind CD8 positiv oder DP. Im nächsten Schritt wird dann die Herunterregulierung eines oder beider Co-Rezeptoren (CD4 und/oder CD8) induziert. Zellen, die CD4 exprimieren oder DN sind, werden vor der Deletion gerettet, während CD8 positive Zellen als autoreaktiv deletiert werden [11].

Die Expression der NK-Zell-Marker auf der Zelloberfläche, sowie die Auswanderung in periphere Organe stellen späte Prozesse in der Entwicklung von NKT-Zellen dar [46]. Die Entwicklung von NKT-Zellen kann in vier Abschnitte unterteilt werden [41]. Im ersten Abschnitt sind die noch unreifen NKT-Zellen negativ für DX5 und NK1.1. Im nächsten Schritt exprimieren die Zellen DX5, bleiben aber weiterhin negativ für NK1.1. Beim abschließenden Reifungsprozess teilen sich die Zellen auf in DX5⁺NK1.1⁺ Zellen und DX5⁻NK1.1⁺ Zellen [41].

CD8⁺ NKT-Zellen stellen eine eigene Gruppe dar und entstehen Thymus-unabhängig. Möglicherweise handelt es sich um konventionelle CD8⁺ T-Zellen, die nach Antigen-Kontakt die Expression von NK-Rezeptoren hochregulieren, was aber noch nicht schlüssig bewiesen werden konnte [51; 112].

Über das Vorkommen von NKT-Zellen in peripheren Organen und Blut gibt es momentan fast nur Daten, die aus Mäusen gewonnen wurden. Beim Menschen ist bisher nur wenig über die Häufigkeit in peripheren Organen bekannt. Grundsätzlich gibt es NKT-Zellen in allen Geweben, in denen auch konventionelle T-Zellen zu finden sind. In der Leber machen sie 30-50% der T-Zellen aus, im Knochenmark 20-30%, in der Milz 3%. In den Lymphknoten sind dagegen nur 0,3% der T-Zellen NKT-Zellen [27; 51; 74]. In Milz, Lymphknoten und Knochenmark sind DN NKT-Zellen die dominierende NKT-Zell-Population. Im Thymus kommen v.a. CD4⁺ NKT-Zellen vor, die auch in geringerer Menge in der Milz nachgewiesen werden konnten. CD8⁺ NKT-Zellen sind z.B. in der Milz oder in der Leber zu finden, nicht aber im Thymus.

Die in Thymus und Leber vorkommenden NKT-Zellen sind meist Zellen der Kategorie eins [73]. Hier kommen aber auch - genau wie in Lymphknoten - NKT-Zellen der Kategorie zwei vor. NKT-Zellen aus Milz und Knochenmark gehören entweder zur

Kategorie drei oder vier. Die in unseren Experimenten verwendeten NKT-Zellen werden aus der Milz gewonnen und gehören in der Einteilung nach MacDonald zur Kategorie vier [73].

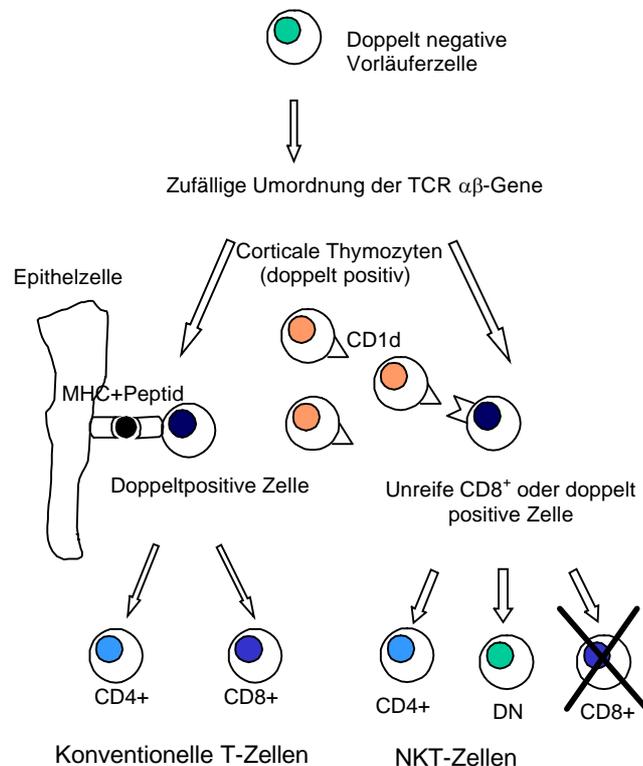


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Selektion von NKT-Zellen im Thymus über CD1d⁺ Thymozyten [modifiziert nach 11]

NKT-Zellen aus verschiedenen Geweben zeigen leichte Unterschiede in ihrer Funktion [130]. Im Vergleich zu NKT-Zellen aus dem Thymus bilden NKT-Zellen der Milz weniger Zytokine und brauchen hierfür ein Signal über CD40 bzw. CD40L. CD4⁺ NKT-Zellen der Milz können nach mehrfacher Aktivierung die Expression von CD4 herunterregulieren und sind dann nur noch als DN NKT-Zellen nachweisbar [136]. Untersuchungen zeigten, dass die Funktionsweise von NKT-Zellen *in vitro* sehr stark vom Umgebungsmilieu abhängt [130]. Werden die Versuche in einem Milieu aus Milzzellen durchgeführt, so fördern NKT-Zellen Th1-Immunantworten. Werden die Versuche dagegen in einer Thymus-geprägten Umgebung durchgeführt, so fördern NKT-Zellen Th2-Antworten. *In vivo* scheint eine so deutliche Unterscheidung nicht möglich zu sein. Hier üben NKT-Zellen aus der Milz ähnliche Funktionen aus wie NKT-Zellen aus dem Thymus, zeigen aber eine etwas geringere Potenz, d.h. um den

gleichen Effekt zu erreichen, müssen aus der Milz mehr NKT-Zellen eingesetzt werden als aus dem Thymus [50; 69].

1.2.3. Immunregulatorisches Potential von NKT-Zellen

NKT-Zellen üben sowohl Effektor- als auch regulatorische Funktionen aus [123; 126]. Die Aktivierung von NKT-Zellen erfolgt über die Präsentation von Glycolipiden durch CD1d auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ), sowie durch weitere Signale wie z.B. IL-12. Im Gegenzug können NKT-Zellen APZ durch die Ausschüttung von IFN γ stimulieren. Nach Aktivierung führen NKT-Zellen wie in Abbildung 3 gezeigt Effektor- oder regulatorische Funktionen aus. Im Organismus scheinen NKT-Zellen mindestens zwei Hauptfunktionen zu haben [46]. Sie sind dafür zuständig, die Immunantworten gegen Infektionen zu kontrollieren und sind Teil der Immunreaktion gegen Tumore (Aktivierung des Immunsystems). Eine weitere Aufgabe der NKT-Zellen ist es, das Körpergewebe vor Schädigungen durch entzündliche Immunreaktionen zu schützen (Regulierung des Immunsystems).

Auf Effektor-Ebene führt die Aktivierung von NKT-Zellen zur Zerstörung der Zielzellen entweder mittels Perforin/Granzym oder mittels Fas/Fas-Ligand-Interaktionen. Die Konsequenzen auf regulatorischer Ebene, die eine Aktivierung von NKT-Zellen *in vivo* hervorruft, sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass NKT-Zellen zu verstärkten Th2-Immunantworten führen und Th1-Antworten inhibieren [19; 50; 60; 115; 137]. Es gibt aber auch Berichte darüber, dass NKT-Zellen Th2-Immunantworten unterdrücken [22]. Vermutlich sind NKT-Zellen je nach Umgebungsmilieu fähig, Th1- oder Th2-Immunantworten zu fördern [51]. Die Gabe von IL-12 bewirkt die Produktion von IFN γ durch NKT-Zellen und damit eine Th1-Antwort. Die Anwesenheit von IL-7 dagegen fördert die Sezernierung von IL-4 durch NKT-Zellen und induziert eine Th2-Antwort. Unumstritten ist, dass eine Stimulierung von NKT-Zellen die Proliferation von NK-Zellen verursacht, sowie zu einer Aktivierung von B-Zellen, Dendritischen Zellen, T-Helfer-Zellen und cytotoxischen T-Zellen führt [46].

Bei einer Entzündung werden NKT-Zellen aus Knochenmark, Leber, Milz und peripheren Lymphknoten aktiviert und spezifisch zur Entzündungsstelle rekrutiert [88; 109]. Das Homing der Zellen wird meist über die Expression von Chemokin-Rezeptoren kontrolliert [59; 126].

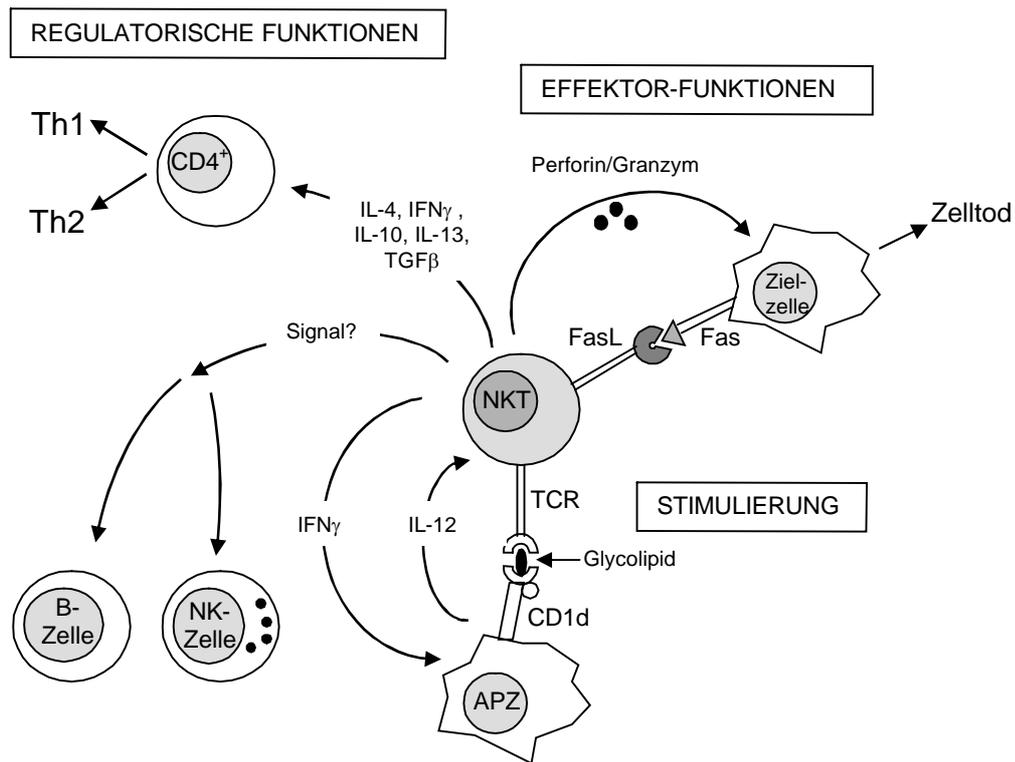


Abbildung 3: Schematische Darstellung der regulatorischen Funktionen und der Effektorfunktionen von NKT-Zellen [modifiziert nach 126]

Eine Reihe von aktuellen Untersuchungen konnte zeigen, dass NKT-Zellen eine wichtige Rolle bei vielen Immunprozessen spielen. Bei Autoimmunerkrankungen beobachtet man häufig eine NKT-Zell-Defizienz. Dies wurde bereits für Typ1-Diabetes bei Mensch und Maus [48; 67; 128], die Sklerodermie beim Menschen [119] und die Autoimmun-Gastritis bei der Maus festgestellt [51]. Allerdings ist es möglich, dass diese verminderte Zahl an NKT-Zellen nicht ursächlich für die Krankheit ist, sondern einen sekundären Effekt darstellt, der durch entzündliche Gewebeschädigungen hervorgerufen wird [126]. Bei Autoimmunerkrankungen ist wahrscheinlich nicht die verminderte Zahl an NKT-Zellen entscheidend für die Krankheitsentstehung, sondern Veränderungen in der NKT-Zell-Funktion [35; 63; 93; 127]. Im Tiermodell kann der Transfer von NKT-Zellen die Entstehung eines Typ1-Diabetes verhindern [50]. Dies geschieht durch einen IL-4- und/oder IL-10-abhängigen Mechanismus. Dabei sind NKT-Zellen aus dem Thymus in ihrer Wirkung sehr viel potenter als NKT-Zellen aus der Milz [50; 69]. Auch bei CED spielen NKT-Zellen eine Rolle. Die Aktivierung von NKT-Zellen über α GalCer konnte im Tiermodell die im histologischen Bild sichtbaren

kolitis-bedingten Veränderungen einer DSS-Kolitis wesentlich verringern [106]. Für die Bekämpfung von bakteriellen oder parasitären Infektionen haben NKT-Zellen eine große Bedeutung [31; 82]. Bei der Tumorbekämpfung zeigen NKT-Zellen ebenfalls Effekte. Im Tiermodell führt die Stimulierung von NKT-Zellen mit IL-12 zu einer Aktivierung von NK-Zellen, was eine aktive Zerstörung von Tumorzellen hervorruft [20; 28]. In einer klinischen Studie wird bereits der Einfluss einer NKT-Zell-Aktivierung mit α -GalCer auf solide Tumore untersucht [44]. NKT-Zellen können außerdem im Tiermodell eine akute GVHD unterdrücken und sind offensichtlich für die Toleranz-Induktion nötig [108; 131].

Neben diesen positiven Effekten, die NKT-Zellen bewirken, können diese aber auch negative Wirkungen haben. So führte im Tiermodell die Aktivierung von NKT-Zellen über α -GalCer zu massiven Leberschäden v.a. in älteren Tieren [95]. Dass gerade ältere Tiere von diesem Effekt stärker betroffen sind, hängt mit der höheren Zahl an NKT-Zellen in der Leber älterer Tiere zusammen. Auch bei der Leukämie-Entstehung scheinen NKT-Zellen eine Rolle zu spielen. In einem Tiermodell für Akute myeloische Leukämie (AML) in C57BL/6-Mäusen konnten LaBelle et al. auf den Tumorzellen DX5, CD69, CD44, CD45RB und CD45R/B220 nachweisen [156]. Diese Marker sind typischerweise auch auf NKT-Zellen zu finden. Mittels RT-PCR konnte außerdem CD3 in diesen Zellen detektiert werden, während CD4 und CD8 nicht zu finden waren, was ebenfalls charakteristisch für die Population der DN NKT-Zellen ist. Es handelt sich bei diesem Modell also um eine atypische myeloische NKT-Zell-Leukämie.

Von einem weiteren negativen Effekt von NKT-Zellen berichten Fuss et al. [40]. Sie beschreiben, dass in der Lamina propria von Patienten mit CU große Mengen an NKT-Zellen zu finden sind. Diese Zellen produzieren *in vitro* nach Stimulierung durch anti-CD2/anti-CD28 oder CD1d große Mengen an IL-13. Dies ist Teil einer Th2-Immunantwort, bei der das durch die NKT-Zellen gebildete IL-13 zytotoxische Effekte auf Epithelzellen ausübt. Bei den in dieser Studie untersuchten NKT-Zellen, handelt es sich um Zellen, die abhängig sind von CD1d, die sich aber von klassischen NKT-Zellen unterscheiden, da sie durch α GalCer nicht aktiviert werden. Alles deutet also darauf hin, dass nicht-klassische NKT-Zellen, die IL-13 bilden, zur Entstehung von CU beitragen.

1.2.4. DX5⁺ NKT-Zellen

Wie bereits beschrieben, wirft die Definition von murinen NKT-Zellen als NK1.1⁺αβTCR⁺ in der Praxis große Probleme auf. Der Marker NK1.1 wird von häufig in der Forschung verwendeten Mausstämmen wie z.B. Balb/c oder C3H nicht exprimiert. Funktionell scheint NK1.1 keine entscheidende Bedeutung zu haben. Die bereits mehrfach beschriebenen Funktionen von NKT-Zellen, wie z.B. die hohe Zytokinproduktion, werden über die Bindung des αβTCR an CD1d aktiviert [62]. Viele Versuche, die sich mit immunologisch wichtigen Themen wie Transplantation oder Autoimmunerkrankungen beschäftigen, werden mit Tierstämmen durchgeführt, die NK1.1 nicht exprimieren. In unseren Tiermodellen für CED werden Balb/c-Mäuse bzw. C.B17-SCID-Mäuse verwendet, die NK1.1 nicht exprimieren. Daher ist es notwendig, zuverlässige Marker für NKT-Zellen zu finden, die auch von diesen Tierstämmen exprimiert werden. Als vielversprechende Alternative gilt hier die Markerkombination CD3/DX5 [84]. CD3 dient hier zur Identifizierung von T-Zellen. DX5 ist ein Pan-NK-Zell-Marker und dient somit dem Nachweis von NK-Zellen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der DX5-Antikörper das Integrin α2 (= CD49b) erkennt [150].

Eine Diskussion beschäftigt sich mit der Frage, ob DX5⁺ T-Zellen überhaupt „NKT-Zellen“ sind. Hammond et al. berichteten, dass DX5⁺ T-Zellen überwiegend unabhängig vom eng mit NKT-Zellen assoziierten Molekül CD1d sind [51]. Entgegen diesen früheren Veröffentlichungen die DX5⁺ NKT-Zellen als CD1d-unabhängig beschrieben [27; 51; 52], konnten Yang et al. nachweisen, dass DX5⁺ NKT-Zellen durch αGalCer aktiviert werden können und in dieser Aktivierung abhängig von CD1d sind [130]. In einer späteren Studie konnten Hammond et al. unter Verwendung von NK1.1 kongenen Balb/c-Mäusen weder auf NK1.1⁺ T-Zellen aus diesen Balb.NK1.1-Mäusen noch aus C57BL/6-Mäusen DX5 im Durchflusszytometer nachweisen [52]. Allerdings zeigte es sich, dass beim verwendeten DX5-Antikörper die Wahl der Fluoreszenz entscheidend ist. In den genannten Versuchen wurde ein FITC-markierter DX5-Antikörper verwendet, um die Zellen im FACS auf die Expression von Oberflächenmarkern zu untersuchen. Dies kann bei schwacher Expression von DX5 zu falsch negativen Ergebnissen führen. Yang et al. konnten dies 2003 zeigen [130]. Der gleiche Antikörper in Verbindung mit Phycoerythrin zeigt dagegen eine deutliche Expression von DX5 auf reifen NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Ein weiteres Argument, was für NKT-Zell-Eigenschaften von DX5⁺ T-Zellen spricht, lieferten Untersuchungen zu „graft-versus-host-disease“ (= GVHD) [64; 77], Autoimmun-

Enzephalomyelitis [135] und Autoimmun-Diabetes [49]. DX5⁺ T-Zellen zeigen hier immunregulatorische Eigenschaften wie sie auch für klassische NK1.1⁺αβTCR⁺ Zellen aus C57BL/6-Mäusen bereits mehrfach beschrieben wurden. DX5⁺ T-Zellen können also zu Recht als „NKT-Zellen“ bezeichnet werden. DX5⁺ NKT-Zellen können in Milz und Leber gefunden werden, sind aber im Thymus nur schwer nachzuweisen [51]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass NKT-Zellen in ihrer Entwicklung erst sehr spät DX5 exprimieren, das nur auf reifen NKT-Zellen nachweisbar ist [41; 130].

In der Einteilung nach MacDonald et al., die sich u.a. auf die Reaktivität mit CD1d-Tetrameren bezieht, gehören DX5⁺ NKT-Zellen vermutlich zur Kategorie vier [62; 73]. Sie sind also CD1d-abhängig, binden aber wie in Abschnitt 1.2.1. beschrieben keine CD1d-Tetramere. Nach der Unterscheidung von Stenström et al. gehören DX5⁺ NKT-Zellen zu den NKT1-Zellen [116]. Sie besitzen also ein variables TCR-Spektrum und sollten doppelt negativ sein.

DX5⁺ NKT-Zellen besitzen wie bereits oben beschrieben das Potential Autoimmunreaktionen zu regulieren. Sie werden aktiviert über CD1d, das auch auf Epithelzellen des Darms exprimiert wird, also am Ort der Entzündung, die bei CED zu beobachten ist. Dies macht DX5⁺ NKT-Zellen zu einem vielversprechenden Therapieansatz. Bei CED kommt es zu einer überschießenden Immunreaktion auf bakterielle Antigene des Darms, die zu einer chronischen Entzündung führt. Für klassische regulatorische T-Zellen (Treg) wurde bereits ein positiver Effekt auf CED im Tiermodell beschrieben [100]. Die vorliegenden Daten geben Anlass zu der Vermutung, dass auch DX5⁺ NKT-Zellen regulatorisch in die Entzündungsprozesse eingreifen könnten und somit zur Therapie von CED beitragen könnten.

1.3. Ziel der Arbeit

Die bisher geschilderten Daten zeigen, dass NKT-Zellen Th1-Immunantworten beeinflussen können. In meiner Arbeit sollte nun untersucht werden, ob in einem Th1-Modell für CED die Entstehung einer Kolitis durch den Transfer von NKT-Zellen verhindert und sogar eine bereits bestehende Kolitis therapiert werden kann.

In einem ersten Schritt musste neben dem bereits im Labor bekannten Modell der chronischen DSS-Kolitis ein Transferkolitis-Modell entwickelt werden. Dieses Modell

beruht auf dem Transfer von naiven T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD45RB^{high}$ oder $CD62L^+CD4^+$) in immundefiziente Empfänger und weist damit Ähnlichkeiten zu Morbus Crohn auf. Die Aufreinigung naiver T-Helfer-Zellen sollte dabei mittels magnetischer Sortierung erfolgen. Diese Methode ist billiger als eine Sortierung im Durchflusszytometer und ist unabhängig von einem teuren FACS-Sorter, der nicht in allen Labors verfügbar ist. Die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien (Antikörper und magnetische Beads) mussten dafür sorgfältig festgelegt und überprüft werden, da sonst keine ausreichende Reinheit der sortierten Zellpopulationen erreicht werden kann. Die Überprüfung der Effektivität der Aufreinigung erfolgte im Durchflusszytometer.

Um die Funktionsweise von NKT-Zellen *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen musste eine Methode zur Isolierung von NKT-Zellen von Balb/c-Mäusen ebenfalls mittels magnetischer Sortierung über die Oberflächenmarker DX5 (= CD49b) und CD3 gefunden werden. Dies war nötig, da der klassische Marker für NKT-Zellen NK1.1 von Balb/c-Mäusen, die sowohl im DSS-Kolitismodell als auch im Transferkolitismodell verwendet werden, nicht exprimiert wird. Die Aufreinigung erfolgte aus der Milz. Aus diesem Organ können leicht Einzelzellsuspensionen hergestellt werden, die überwiegend aus Lymphozyten bestehen. Anders als beispielsweise bei der Leber sind hier keine aufwändigen Vorbehandlungen nötig, um störende Nicht-Lymphozytenpopulationen zu entfernen. In der Milz sind ca. 3% der T-Zellen NKT-Zellen, so dass hier eine gute Ausbeute an NKT-Zellen zu erwarten ist. Außerdem ist bekannt, dass die von uns gewählten Marker CD3 in Kombination mit DX5 von einer großen Zahl an NKT-Zellen der Milz im Gegensatz zu NKT-Zellen des Thymus exprimiert wird.

Die so isolierten DX5⁺ NKT-Zellen wurden durchflusszytometrisch entsprechend ihrer Expression von Oberflächenmolekülen charakterisiert. Dies dient nicht nur zur näheren Beschreibung dieser noch wenig bekannten Zellpopulation, sondern liefert auch Hinweise auf deren mögliche Funktionsweise. Ein weiteres Ziel war es, die Effekte von DX5⁺ NKT-Zellen auf andere Zellen *in vitro* anhand von Ko-Kultur-Versuchen zu untersuchen. Hier wurde sowohl die Beeinflussung des Zytokinprofils anderer Zellen durch DX5⁺ NKT-Zellen als auch der direkte Effekt von DX5⁺ NKT-Zellen auf kolitisverursachende im Vergleich zu nicht-kolitisverursachenden Zellen untersucht. Es wurden dabei sowohl die CED-induzierenden Zellen des Transferkolitismodells als auch die CED-assoziierten Zellen des DSS-Modells mit den jeweiligen nicht-CED-

assoziierten Zellen verglichen. Nach der Charakterisierung und Überprüfung der Funktionsweise *in vitro* folgte die Untersuchung der Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen in einem Transferkolitis-Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen *in vivo*. Hierzu sollte das oben beschriebene CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitismodell verwendet werden. Untersucht wurde, ob der Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen die Entstehung einer Kolitis verhindern (präventive Wirkung) bzw. eine bestehende Kolitis heilen kann (therapeutische Wirkung). Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der DX5⁺ NKT-Zellen von CD1d und von co-stimulatorischen Molekülen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht.

2. MATERIAL

2.1. Geräte

Brutschrank HeraCell	Heraeus, Langensfeld, Deutschland
ELISA-Reader	Molecular Devices, Palo Alto, CA, USA
FACS Calibur	BD, Heidelberg, Deutschland
Intravitalmikroskop (Fluoreszenz)	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Midi-MACS Magnet	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer improved „bright line“	Schubert & Weiss, München, Deutschland
Überkopfschüttler GFL 3025	GFL, Wunstorf, Deutschland
Ultraschallstab Sonoplus	Bandelin, Berlin, Deutschland
Zentrifuge EBA 12 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Langensfeld, Deutschland

2.2. Verbrauchsmaterial

1,5ml Eppendorfgefäße	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
12well-Platten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
15ml Zentrifugenröhrchen	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
1ml Tuberculin-Spritzen	BD Plastipak, Madrid, Spanien
20G Kanülen	BD Microlance, Fraga, Spanien
24well-Platten	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
24well-Platten	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
27G Kanülen	BD Microlance, Drogheda, Irland
50ml Zentrifugenröhrchen	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
5ml Spritzen	BD Discardit, Fraga, Spanien
5ml Rundboden-(FACS-)Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
96well-Platten mit flachem Boden	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
96well-Platten mit rundem Boden	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Glass Beads (150-212 microns)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
LS Separation Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Steriflip-Filtereinheit, 50ml	Millipore, Billerica, MA, USA

Steritop-Filtereinheit, 250ml	Millipore, Billerica, MA, USA
Superfrost Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Zellkultureinsätze 0,4µm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellsiebe, 70µm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

2.3. Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen

Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Collagenase D	Roche, Mannheim, Deutschland
Dextran Sulfat Natriumsalz (DSS)	ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Lösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid aus E.coli	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Maus Interleukin-2, rekombinant	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Großbritannien
Titriplex (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,5% (w/v)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Z-FA-FMK (Kontr. für Caspase-Inh.)	BD, Heidelberg, Deutschland
Z-VAD-FMK (Caspase-Inhibitor)	Promega, Madison, WI, USA

2.4. Kits

BC Proteinassay	Uptima, Montlucon, Frankreich
CD4+ T-cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cytokine Secretion Assay, mIFN γ	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

Cytokine Secretion Assay, mL-10	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cytokine Secretion Assay, mL-4	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Inside Stain Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.5. Antikörper

2.5.1. Antikörper und Magnetbeads zur Zellsortierung

Anti-Biotin-MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD49b (DX5) MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Maus CD11c MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Maus CD8 MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Ratte IgG MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Basic MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

Anti-Maus CD62L, Klon MEL-14	BD, Heidelberg, Deutschland
Biotin anti-Maus TER-119, Klon TER-119	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD11b, Klon M1/70	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD45R/B220, Klon RA3-6B2	BD, Heidelberg, Deutschland
Biotin-anti-Maus Ly6G, Klon RB6-8C5	BD, Heidelberg, Deutschland

2.5.2. Antikörper zur Durchflusszytometrie

Antikörper:

APC anti-Maus CD4, Klon RM4-5	Caltag, Hamburg, Deutschland
APC anti-Maus CD49b (PanNK), Klon DX5	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-Maus CD62L, Klon MEL-14	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD3, Klon 17A2	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD4, Klon GK1.5	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD8a, Klon 53-6.7	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD11b, KlonM1/70	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD11c, Klon HL3	BD, Heidelberg, Deutschland

Maus FcBlock, Klon 2.4G2	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD1d, Klon 1B1	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD45R/B220, Klon RA3-6B2	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD25, Klon PC61	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD38, Klon 90	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD40, Klon 3/23	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD45RB, Klon 16A	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD49b (PanNK), Klon DX5	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD62L, Klon MEL-14	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD103, Klon M290	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD154, Klon MR1	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CTLA-4, Klon UC10-4F10-11	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus ICAM-1, Klon 3E2	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus LFA-1, Klon 2D7	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus Ly6G, Klon RB6-8C5	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus PD1, Klon RMP1-30	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE anti-Maus PD-L1, Klon MIH5	eBioscience, San Diego, CA, USA
PE anti-Maus $\vee\beta 8.1,8.2$, Klon MR5-2	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus $\alpha 4\beta 7$, Klon DATK32	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus $\alpha\beta$ TCR, Klon H57-597	Caltag, Hamburg, Deutschland

Isotypkontrollen:

APC Ratte IgG2a	Caltag, Hamburg, Deutschland
APC Ratte IgM	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Hamster IgG1	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte IgG2a	Caltag, Hamburg, Deutschland
FITC Ratte IgG2b	Caltag, Hamburg, Deutschland
PE Hamster IgG	Caltag, Hamburg, Deutschland
PE Ratte IgG1	BD, Heidelberg, Deutschland
PE Ratte IgG2a	Caltag, Hamburg, Deutschland
PE Ratte IgG2b	Caltag, Hamburg, Deutschland
PE Ratte IgM	Caltag, Hamburg, Deutschland

2.5.3. Antikörper im Tierversuch und in der Zellkultur

Antikörper:

Anti-Maus PD-L1, Klon MIH5	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD1d, Klon 1B1 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus CD154, Klon MR1 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus CD40, Klon HM40-3 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland

Isotypkontrollen:

Hamster IgG3, Klon A19-4 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland
Hamster IgM, Klon G235-1 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland
Ratte IgG2a, Klon R35-95 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland
Ratte IgG2b, Klon A95-1 (Azid-/Toxin-frei)	BD, Heidelberg, Deutschland

2.6. Puffer und Zellkulturmedien

Fertigpuffer:

Phosphate buffered Saline (PBS)	Cambrex, Verviers, Belgien
Hank´s buffered salt solution (HBSS)	Gibco, Paisley, Großbritannien

Puffer:

MACS-Puffer:	PBS
	2mM EDTA
	75µM BSA

steril-filtriert mit Steritop-Filtereinheit; Lagerung bei 4°C

Erythrozyten-Lysepuffer:	Aqua dest.
	+ 150mM NH ₄ Cl
	+ 10mM KHCO ₃
	+ 0,1mM EDTA
	pH 7,2

steril-filtriert mit Steriflip-Filtereinheit; Lagerung bei -20°C

Zellkulturmedium:

RPMI 1640 inkl. Phenolrot und 20mM Hepes	Biochrom, Berlin, Deutschland
+ 10% FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
+ 50000U Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
+ 0,2mM Glutamin	Gibco, Paisley, Großbritannien

2.7. Versuchstiere

Tiere:

Balb/c, weiblich	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
C.B17-/lcrCrl-scid, weiblich	Charles River, Sulzfeld, Deutschland

Tierfutter:

V1535 Futter für Ratten und Mäuse	SSNIFF, Soest, Deutschland
-----------------------------------	----------------------------

2.8. Software

Adobe PhotoShop 5.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Analysis Image Processing	Soft Imaging Systems, Münster, Deutschland
Cell Quest, Version 3.1	BD, Heidelberg, Deutschland
FlowJo, Version 5.5	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
GraphPad QuickCalcs	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Image J, Version 1.23y	Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA
Sigma 2001	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
SigmaPlot 2001	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
SoftMax, Version 2.31	Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA
Win MDI, Version 2.8	© Joseph Trotter

3. METHODEN

3.1. Zellisolierung

3.1.1. Zellisolierung durch magnetische Markierung (MACS)

Zur Isolierung verschiedener Zellpopulationen aus der Milz gesunder Balb/c-Mäuse wurde die magnetische Zellsortierung (=„magnetic activated cell sorting“ =MACS) angewendet. Die Technologie der magnetischen Sortierung ist eine Alternative zur Zellsortierung im Durchflusszytometer (FACS), die auf ein teures FACS-Gerät mit Zellsorter angewiesen und deshalb in vielen Labors nicht verfügbar ist. Die MACS-Technologie beruht auf der Verwendung von so genannten MicroBeads. Dies sind kommerziell erhältliche superparamagnetische Partikel, gebunden an monoklonale Antikörper. Sie sind bei einer Größe von etwa 50nm weder im FACS noch im Lichtmikroskop sichtbar, sind biodegradierbar und beeinflussen den Zellstoffwechsel nur minimal. Die Zielzellen können mit MicroBeads magnetisch markiert werden und werden dann mit Hilfe eines sehr starken Magnetfelds in speziell beschichteten MACS-Säulen zurückgehalten.

3.1.1.1. Funktionsprinzip der Sortierung

Für die Isolierung von Zellpopulationen, die durch die Expression von zwei Oberflächenmarkern definiert werden, sind zwei Isolierungsschritte nötig. Es wird dabei erst eine Population isoliert, die Marker eins besitzt. Dies kann über eine Positivselektion der entsprechenden Zellen geschehen oder über eine Depletion aller Zellen, die für dieses Merkmal negativ sind. Im Falle einer Positivselektion in Schritt eins müssen die MagnetBeads mit einem speziellen Reagenz von den Zellen abgelöst werden bevor eine zweite Sortierung durchgeführt werden kann. Dies bringt häufig Zellverluste mit sich, da zusätzliche Waschschrte nötig sind. Darüber hinaus ist das Ablösen der MagnetBeads nicht immer zu 100% effektiv, so dass für den ersten Sortierungsschritt eine Depletion unerwünschter Zellen die bessere Methode darstellt. In einem zweiten Schritt werden dann die Zellen isoliert, die Marker zwei besitzen. Dieser Schritt wird mit einer Positivselektion durchgeführt (siehe auch Abb. 4). Die isolierten Zellen sind dann positiv für Marker 1 und Marker 2.

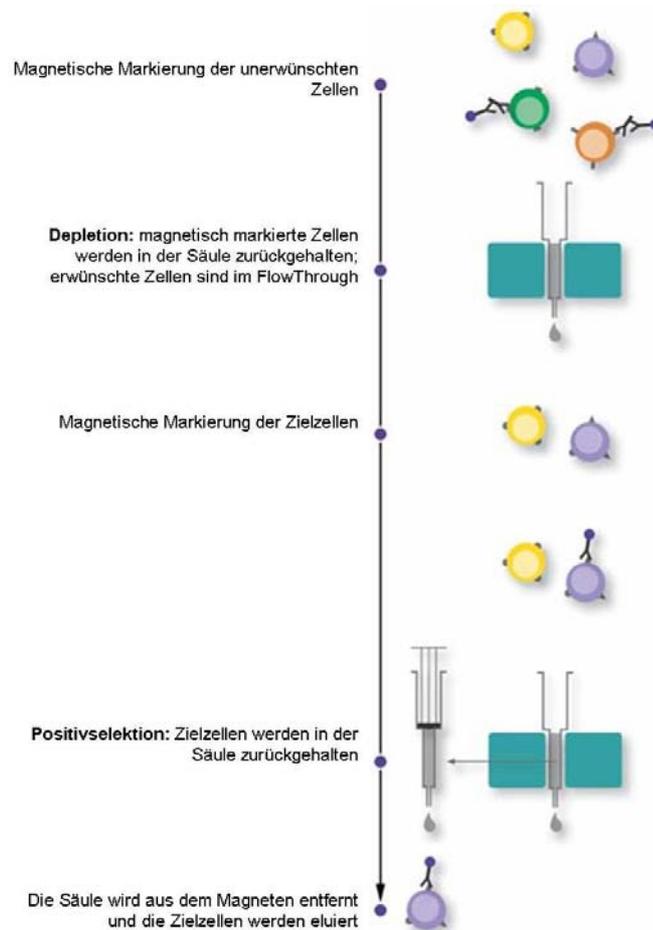


Abbildung 4: Funktionsprinzip einer magnetischen Sortierung in zwei Schritten

3.1.1.2. Magnetische Sortierung von $CD62L^+CD4^+$ Zellen

$CD62L^+CD4^+$ Zellen wurden aus der Milz gesunder Balb/c Mäuse isoliert. Die Aufreinigung erfolgte nach folgendem Prinzip: zuerst wurde eine Einzelzellsuspension aus Milzgewebe hergestellt. Danach wurden mittels MACS $CD62L^+CD4^+$ Zellen aufgereinigt. Die Sortierung wurde in zwei Schritten durchgeführt (siehe auch Abb. 5). Zuerst wurden T-Helfer-Zellen ($CD4^+$) durch eine Negativselektion gewonnen. Anschließend wurden naive T-Helfer-Zellen ($CD62L^+CD4^+$) durch $CD62L$ -Markierung aufgereinigt. Die magnetische Aufreinigung in einem Schritt (also nur nach $CD62L^+$ Zellen) war nicht möglich, da auch viele Nicht- $CD4$ -Zellen, wie z.B. B-Zellen, Monozyten und Granulozyten $CD62L$ exprimieren.

Im Detail wurde die Aufreinigung von CD62L⁺CD4⁺ Zellen wie folgt durchgeführt. Zur Organentnahme wurde eine gesunde, weibliche Balb/c Maus durch Genickbruch getötet und die Milz entnommen. Die gesamte Zellaufreinigung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Milz wurde mittels einer 27G Kanüle mit Collagenase D (1mg/ml in PBS) perfundiert und anschließend in kleine Stücke zerschnitten. Das Gewebe wurde für 45min bei 37°C in Collagenase D inkubiert. Durch Zermahlen der Gewebestücke auf einem 70µm Zellsieb und Spülen mit RPMI/10%FCS wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Suspension wurde bei 350x g für 8min bei RT in einer Heraeus Megafuge 1.0 zentrifugiert (im weiteren Text als „waschen“ bezeichnet). Der Überstand wurde verworfen und die im Pellet enthaltenen Erythrozyten durch hypotone Lyse mit 1ml Erythrozytenlysepuffer für 5min bei RT zerstört. Nach der Zugabe von 19ml RPMI/10%FCS wurde die Suspension gewaschen und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5ml MACS-Puffer resuspendiert und die Zahl vitaler Zellen mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt. Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in 4µl MACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen aufgenommen. Im folgenden ersten Sortierungsschritt wurden CD4 positive Zellen mit Hilfe des „CD4⁺ T cell isolation kit“ der Fa. Miltenyi angereichert. Dieser enthält einen Cocktail aus Biotin-markierten Antikörpern gegen nicht-CD4-positive mononukleäre Zellen der Maus bestehend aus einem Antikörper gegen B-Zellen (anti-CD45R/B220), Monozyten/ Granulozyten (anti-CD11b), NK-Zellen (anti-CD49b), Erythrozyten (anti-TER-119) und zytotoxische T-Zellen (anti-CD8). Pro 1×10^6 Zellen wurde 1µl dieses Antikörper-Cocktails zugegeben und die Suspension für 10min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Verdünnungsschritt durch Zugabe von 3µl MACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen. Dann wurden anti-Biotin-Microbeads, die ebenfalls im Kit enthalten sind, in einer Konzentration von 2µl pro 1×10^6 Zellen zugegeben und für 15min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde gewaschen und das Pellet wurde in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Eine LS-Trennsäule wurde in einem Midi-MACS-Magneten fixiert und mit 3ml MACS-Puffer gespült bevor die Zellsuspension zugegeben wurde. Um die Durchflussgeschwindigkeit der Zellsuspension zu verringern wurde eine 20G-Kanüle an der Trennsäule befestigt. CD4⁺ Zellen waren nicht magnetisch markiert und deshalb in der Negativfraktion enthalten. Die Säule wurde mit 3x 3ml MACS-Puffer nachgespült, wobei der gesamte Durchlauf als Negativfraktion aufgefangen wurde. Zur Kontrolle der Sortierung wurde auch die Positivfraktion gesammelt. Dazu wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und mit 1x 5ml MACS-Puffer gespült. Die Zellen wurden einmal gewaschen, das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert und anschließend die Zahl vitaler Zellen bestimmt. Für die weitere Sortierung wurde nur die Fraktion der CD4⁺ Zellen verwendet. Die Zellen

wurden mit 0,325µg anti-CD62L-Antikörper pro 1×10^6 Zellen für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in MACS-Puffer (8µl pro 1×10^6 Zellen) aufgenommen und 2µl anti-Ratte-IgG-Microbeads pro 1×10^6 Zellen zugegeben. Die Suspension wurde für 15min bei 4°C inkubiert und anschließend 1x gewaschen. Danach erfolgte die magnetische Sortierung in einer LS-Trennsäule wie bereits oben beschrieben. In der Negativfraktion befanden sich hier die $CD62L^{low}$ Zellen. Die $CD62L^+$ Zellen befanden sich in der Positivfraktion, die mit Hilfe des zur LS-Trennsäule gehörenden Stempels in 5ml Puffervolumen aus der Säule gespült wurde. Die Zellen wurden 1x gewaschen, in Puffer (für Zellkultur: RPMI/10% FCS; für Injektion: PBS) resuspendiert und die Zahl vitaler Zellen mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt. Von allen Fraktionen wurden Proben zur durchflusszytometrischen Kontrolle entnommen. Aus einer Milz konnten ca. 5×10^6 $CD62L^+CD4^+$ Zellen gewonnen werden.

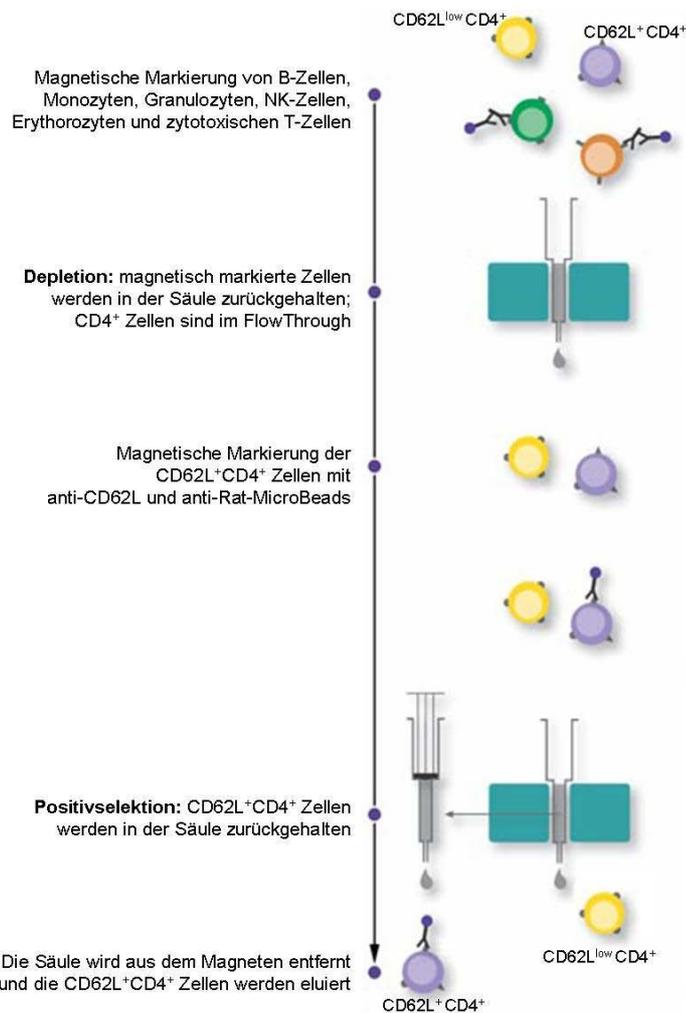


Abbildung 5: Schematische Darstellung der magnetischen Sortierung von $CD62L^+CD4^+$ Zellen

3.1.1.3. Bestimmung der Leukozytensubpopulationen der Milz mittels FACS

Für die Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen musste im ersten Schritt eine Aufreinigung von T-Zellen aus einer Splenozyten-Suspension erfolgen. Hierfür wurde eine Negativselektion durchgeführt. Für diesen Sortierungsschritt gibt es keinen kommerziell erhältlichen Kit. Er musste also mit einem selbst hergestellten Antikörpercocktail gegen Nicht-T-Zellen erfolgen. Um festzustellen, welche Antikörper benötigt werden und in welcher Konzentration diese eingesetzt werden müssen, war es nötig, den prozentualen Anteil der einzelnen Leukozytensubpopulationen in der Milz zu bestimmen. Dazu wurde eine FACS-Färbung an Splenozyten durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Antikörper, deren Spezifität, sowie die eingesetzten Mengen.

Zur Isolierung von Splenozyten wurde die Milz einer Balb/c-Maus wie oben beschrieben entnommen. Durch Zermahlen der Gewebestücke auf einem 70µm Zellsieb und Spülen mit RPMI/10%FCS wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Suspension wurde bei 350x g für 8min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die im Pellet enthaltenen Erythrozyten durch hypotone Lyse mit 1ml Erythrozytenlysepuffer für 5min bei RT zerstört. Nach der Zugabe von 19ml RPMI/10%FCS wurde die Suspension gewaschen und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 3-5ml Medium resuspendiert. Die Zahl vitaler Zellen wurde mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt. Es wurden insgesamt 6 Proben à 0,25x10⁶ Zellen zur FACS-Färbung entnommen. 3 Proben wurden mit folgenden Antikörper-Kombinationen gefärbt:

- CD3-FITC + CD49b-PE
- CD11b-FITC + CD45R/B220-PE
- CD11c-FITC + Ly6G-PE

Weitere 3 Proben wurden mit den jeweiligen Isotyp-Antikörpern gefärbt. Die Färbung wurde wie in Abschnitt 3.2.1. beschrieben durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden wie in Abschnitt 3.6.2.1. beschrieben ausgewertet.

Antikörper	Fluoreszenz	Spezifität	Verdünnung
CD3	FITC	T-Zellen	1:75 in 100µl
CD11b	FITC	Monozyten, (Granulozyten)	1:75 in 100µl
CD11c	FITC	Dendritische Zellen	1:75 in 100µl
CD45R/B220	PE	B-Zellen	1:100 in 100µl
CD49b (DX5)	PE	NK-Zellen	1:75 in 100µl
Ly6G	PE	Granulozyten	1:100 in 100µl

Tabelle 2: Zur Bestimmung der Splenozytensubpopulationen eingesetzte Antikörper

3.1.1.4. Magnetische Sortierung von DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Kontrollzellen

DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Kontrollzellen wurden aus der Milz gesunder Balb/c Mäuse isoliert. Wie die Versuche aus 3.1.1.3. ergaben befinden sich in der Milz einer Balb/c-Maus etwa 1×10^6 DX5⁺ NKT-Zellen. Zunächst soll hier kurz das Prinzip der Aufreinigung erklärt werden. Zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Kontrollzellen aus der Milz wurde eine Einzelzellsuspension aus Milzgewebe hergestellt. Danach wurden mittels MACS DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Zellen aufgereinigt. Die Sortierung erfolgte in drei Schritten. Eine direkte Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen in einem Schritt war nicht möglich, da es keinen spezifischen Marker für NKT-Zellen gibt, sondern diese durch die Expression eines T-Zell-Markers bei gleichzeitiger Expression eines NK-Zell-Markers definiert werden. In Schritt eins wurden T-Zellen (CD3⁺) durch eine Negativselektion gewonnen. In Schritt zwei wurden T-Zellen, die positiv für NK-Zellmarker sind, mittels Positivselektion aufgereinigt (siehe auch Abb. 6). In der Literatur wird als Marker hierfür das Oberflächenmolekül NK1.1 angegeben [46; 51]. Dieser Marker wird aber nur von bestimmten Tierstämmen exprimiert, wie z.B. C57/BL6 Mäusen. Von den im Experiment verwendeten Balb/c Mäusen wird NK1.1 nicht exprimiert. Für die Sortierung wurde daher der Marker CD49b/Pan-NK (Klon: DX5) verwendet. Die so gewonnenen DX5⁺ NKT-Zellen wurden in den folgenden Experimenten als „NKT-Zellen“ verwendet. In Schritt drei wurden aus den T-Zellen, die negativ für CD49b waren, die CD8⁺ Zellen mittels Positivselektion isoliert. Diese Zellen dienten als Kontrollpopulation zu den DX5⁺ NKT-Zellen.

Im Detail erfolgte die Aufreinigung von DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Kontrollzellen wie folgt. Die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz, die Behandlung mit Collagenase D, sowie die hypotone Lyse der enthaltenen Erythrozyten wurden wie bereits in 3.1.1.2 beschreiben durchgeführt. Die Zahl vitaler Zellen wurde mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt. Entsprechend der Ergebnisse, die sich in 3.1.1.3. ergaben wurde ein Cocktail aus Antikörpern gegen Splenozytensubpopulationen verwendet, um Nicht-T-Zellen zu markieren. Die Zellen wurden mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen Monozyten (anti-CD11b; 0,175µg/Mio), einem PE-konjugierten Antikörper gegen B-Zellen (anti-CD45R/B220; 0,225µg/Mio) und Biotin-konjugierten Antikörpern gegen Erythrozyten (anti-TER-119; 0,175µg/Mio), und gegen Granulocyten (anti-Ly6G; 0,225µg/Mio) für 30min bei 4°C inkubiert. Die Markierung mit verschieden konjugierten Antikörpern (FITC, PE und Biotin) erwies sich für das Funktionieren der Aufreinigung als notwendig. Durch eine Markierung mit einem Cocktail Biotin-konjugierter Antikörper konnte kein vergleichbar gutes Ergebnis der Aufreinigung von DX5⁺ NKT-Zellen erreicht werden. Nach einem Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 15min bei 4°C mit je 0,65µl anti-Biotin MicroBeads, anti-FITC MicroBeads und anti-PE MicroBeads, sowie 0,25µl anti-CD11c MicroBeads (gegen Dendritische Zellen) pro 1x 10⁶ Zellen inkubiert. Die Zellsuspension wurde gewaschen und das Pellet wurde in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden wie bereits in 3.1.1.2. beschrieben magnetisch sortiert. T-Zellen waren nicht magnetisch markiert und deshalb in der Negativfraktion enthalten. Eine durchflusszytometrische Kontrolle der Positivfraktion war aufgrund der erfolgten Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wenig sinnvoll, weshalb diese nicht aufgefangen wurde. Die Zellen der Negativfraktion wurden einmal gewaschen, das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert und anschließend die Zahl vitaler Zellen bestimmt. Die so gewonnene Fraktion der T-Zellen wurde mit 0,05µl BasicBeads pro 1x 10⁶ Zellen für 15min bei 4°C inkubiert und anschließend einmal gewaschen. Es folgte eine magnetische Sortierung wie oben beschrieben, bei der nur die Negativfraktion aufgefangen wurde. Dieser Schritt diente dazu, tote Zellen und andere unerwünschte Zellen mit hoher unspezifischer Affinität für Magnet-Beads aus der Zellsuspension zu entfernen. Die Negativfraktion wurde mit 1,75µl CD49b-(DX5-)MicroBeads pro 1x 10⁶ Zellen für 20min bei 4°C magnetisch markiert und 1x gewaschen. Das Pellet wurde in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden wie in 3.1.1.2. beschrieben sortiert. DX5⁺ NKT-Zellen waren magnetisch markiert und deshalb in der Positivfraktion enthalten. Die Negativfraktion wurde aufgefangen, um hieraus CD8⁺ Kontrollzellen aufzureinigen. Die DX5⁺ NKT-Zellen

wurden gewonnen, indem die Säule aus dem Magneten entfernt und die Zellen mit Hilfe des zur LS-Säule gehörenden Stempels in einem Volumen von 5ml MACS-Puffer aus der Säule gespült wurden (Positivfraktion). Die Zellen wurden einmal gewaschen, das Pellet in Puffer (MACS-Puffer zur weiteren Sortierung; PBS zur Injektion in Tiere; RPMI/10% FCS zur Kultivierung) resuspendiert und anschließend die Zahl vitaler Zellen mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt.

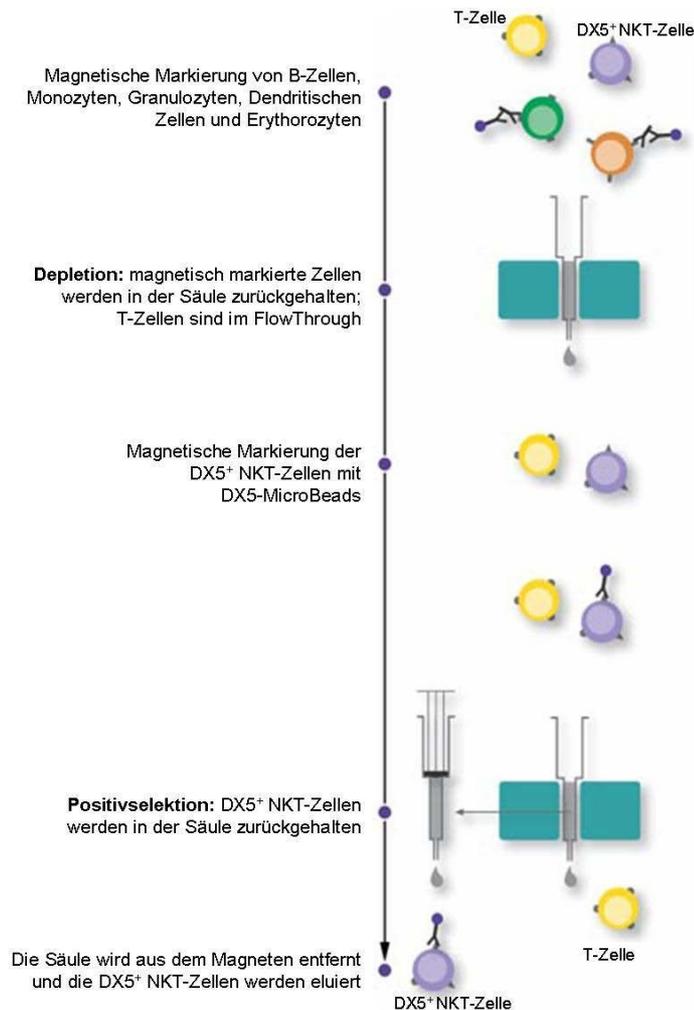


Abbildung 6: Schematische Darstellung der magnetischen Sortierung von DX5⁺ NKT-Zellen

Zur Isolierung von CD8⁺ Kontrollzellen wurden die DX5⁻ T-Zellen für 15min bei 4°C mit 1µl/Mio CD8-MicroBeads inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen wie oben beschrieben magnetisch sortiert, wobei die CD8⁺ Zellen in der Positivfraktion

enthalten waren. Von allen Zellfraktionen wurden Proben zur durchflusszytometrischen Kontrolle entnommen.

3.1.2. Isolierung von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten und Milz

Zur Isolierung von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten (MLN) von Tieren mit DSS-Kolitis (Beschreibung des Tiermodells siehe Abschnitt 3.4.1.) wurden die Tiere zur Organentnahme durch Genickbruch getötet. Die Lymphknoten wurden entnommen und vom umgebenden Fett befreit. Mit Hilfe eines 70µm Zellsiebs wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese wurde 1x bei 350x g und RT für 8min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3ml Medium resuspendiert. Die Zahl vitaler Zellen wurde mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt. Zur Isolierung von Lymphozyten aus der Milz von Tieren mit DSS-Kolitis wurden die Tiere wie oben beschrieben zur Organentnahme durch Genickbruch getötet und neben den Lymphknoten auch die Milz entnommen. Wie in 3.1.1.3. beschrieben wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zahl vitaler Zellen wurde mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt.

3.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte an einem BD FACS-Calibur mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest. Als Ausgangswert für die Messeinstellungen dienten die in Tabelle 3 angegebenen Werte. Diese mussten allerdings für jede Messung neu überprüft und entsprechend der mit Isotyp-Antikörper gefärbten Kontrollen modifiziert werden.

Im FACS können Zellen entsprechend verschiedener Parameter charakterisiert werden. Das Vorwärtsstreulicht (= FSC), also der Teil des Fluoreszenzlichts, der schräg nach vorne gestreut oder nicht abgelenkt wird, liefert Informationen über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (= SSC) entspricht dem in einem 90°-Winkel abgestrahlten Licht und ist abhängig von der Zellgranularität. Zusätzlich zu diesen beiden Parametern können mit dem von uns verwendeten FACS-Calibur mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper bis zu vier weitere Parameter untersucht werden. Die Messeinstellungen im FACS müssen so gewählt sein, dass die Zellen in der grafischen

Darstellung von Größe (= FSC) und Granularität (= SSC), sowie in den Darstellungen der jeweils verwendeten Fluoreszenzen, gut sichtbar sind. Die Zellen der Isotypkontrollen sollten negativ sein, d.h. in der Darstellung zweier Fluoreszenz-Parameter zueinander (z.B. Fluoreszenz 1 auf der x-Achse und Fluoreszenz 2 auf der y-Achse) im unteren linken Quadranten möglichst unterhalb des Wertes für 10^1 in der logarithmischen Auftragung erscheinen.

Threshold:	200			
	Faktor	lin/log ?	Amp. Gain	Parameter/Farbstoff
FSC	E 00	linear	1,36	Zellgröße
SSC	458	linear		Zellgranularität
FL-1	642	logarithmisch		FITC
FL-2	589	logarithmisch		PE
FL-4	600	logarithmisch		APC
Compensation:	FL-1 – 0,8% FL-2			
	FL-2 – 25,4% FL-1			

Tabelle 3: Grundeinstellungen am Durchflusszytometer

Ausgewertet wurden die Messungen mit dem Programm WinMDI, Version 2.8 wie in Kapitel 3.6.1.1. bzw. mit dem Programm FlowJo, Version 5.5 wie in Kapitel 3.6.1.2. beschrieben. WinMDI ist sehr gut geeignet sogenannte Dotplot-Diagramme darzustellen, in denen zwei Parameter gleichzeitig gezeigt werden können (z.B. Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2). Mit dem Programm FlowJo können sehr gut Histogramme erstellt werden, in denen nur ein Parameter dargestellt ist. Es ist hier möglich, die Kontrollfärbung mit Isotyp-Antikörper und die Färbung mit dem gewünschten Antikörper im gleichen Bild darzustellen.

3.2.1. Kontrolle der Zellsortierung

Zur Qualitätskontrolle der MACS-Sortierung wurden von den erhaltenen Zellpopulationen jeweils 0,25Mio Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit PBS auf 150-200µl aufgefüllt. Um unspezifische Bindungen, die durch Fc-Rezeptoren auf den untersuchten Zellen verursacht werden, zu minimieren, wurden diese vor der eigentlichen Färbung blockiert. Dazu wurden zu jeder Probe 100µl PBS mit 1µl „Mouse Fc-Block™“ (=anti-Maus CD16/CD32, = anti-Maus Fcγ III/II Rezeptor) gegeben und 5min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden- ohne dazwischenliegenden Waschschrift- die fluoreszenz-markierten Antikörper, die wie angegeben in 100µl MACS-Puffer verdünnt wurden, zugegeben und für 30min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Bei der CD62L⁺ Sortierung wurden zwei Ansätze verwendet, die mit folgenden Antikörpern gefärbt wurden:

- anti-CD4-FITC (Verdünnung 1:75) + anti-CD62L-PE (Verdünnung 1:100)
- anti-CD4-FITC (Verdünnung 1:75) + anti-CD45RB-PE (Verdünnung 1:100)

Zwei weitere Proben wurden mit den jeweiligen Isotyp-Antikörpern gefärbt.

Bei der Sortierung von DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Kontrollzellen wurden die Proben mit diesen Antikörpern gefärbt:

- DX5⁺ NKT-Zellen: anti-CD3-FITC (Verdünnung 1:75) + anti-CD49b-(DX5-)PE (Verdünnung 1:75)
- CD8⁺ Kontrollzellen: anti-CD8a-FITC (Verdünnung 1:75) + anti-CD49b-(DX5-)PE (Verdünnung 1:75)

Weitere Proben wurden mit den jeweiligen Isotyp-Kontroll-Antikörpern in der gleichen Konzentration wie der Primärantikörper markiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal bei 470xg und RT für 5min zentrifugiert, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellett in 300-400µl PBS resuspendiert und die Zellen im FACS analysiert. Färbung und Messung im FACS wurden wie in 3.2.1 beschrieben durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm WinMDI, Version2.8 wie in 3.6.1.1. beschrieben.

3.2.2. Charakterisierung von T-Helfer-Zellen und DX5⁺ NKT-Zellen

Zur näheren Charakterisierung wurden T-Helfer-Zellen (CD62L⁺CD4⁺ und CD62L^{low}CD4⁺) und DX5⁺ NKT-Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle markiert (verwendete Antikörper und eingesetzte Verdünnung in 100µl Puffervolumen siehe Tabelle 4). Zur Charakterisierung von DX5⁺ NKT-Zellen wurden PE-konjugierte Antikörper gegen CD1.1, CD3, CD25, CD103, CD154, CD40, PD-L1, PD1, CD45RB, CD38, LFA-1, CD62L, Vβ8.1,8.2, αβTCR, Integrin α4β7 und ICAM-1 verwendet. Die Zellen wurden mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen CD3 und einem APC-konjugierten Antikörper gegen CD49b (DX5) gegengefärbt, um bei der Auswertung die DX5⁺ NKT-Zellen von evtl. nach der Sortierung enthaltenen Nicht-NKT-Zellen unterscheiden zu können. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen CD8a, einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD49b (DX5) und einem APC-konjugierten Antikörper gegen CD4 gefärbt.

Sowohl CD62L⁺CD4⁺ als auch CD62L^{low}CD4⁺ Zellen wurden mit PE-konjugierten Antikörpern gegen CD1.1, CD154, CD40, CD45RB, PD-L1 und PD1 gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen CD4 (1:100 in 100µl Puffervolumen) und einem APC-konjugiertem Antikörper gegen CD62L (1:150 in 100µl Puffervolumen) gefärbt, um bei der Auswertung nur die CD62L⁺CD4⁺ bzw. CD62L^{low}CD4⁺ Zellen einzuschließen.

Jeder Versuch wurde 3 bis 7mal wiederholt, um individuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Zellisolierungen auszugleichen.

Name	alternativ	Vorkommen	Funktion	Verdünnung
CD1d	CD1d, Ly-38	Darmepithel, Leukozyten, Knochenmark	Präsentierung von Lipiden	1:100
CD3		T-Lymphozyten	Signaltransduktion	1:100
CD4		T-Helfer-Zellen	Signaltransduktion	1:150
CD8a	Ly-2	Zytotoxische T-Zellen	Signaltransduktion	1:75
CD11a	LFA-1	Periphere Leukozyten	Adhäsionsmolekül, Ligand von ICAM-1	1:100
CD25	IL-2-Rezeptor α	Aktivierte T- und B-Zellen	Aktivierungsmarker, Marker für Treg	1:100
CD38		T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen	Lymphozyten-aktivierung	1:100
CD40		B-Zellen, Makrophagen, einige Milz-T-Zellen	Ko-Stimulation, Ligand von CD154	1:100
CD45RB		B-Zellen, naive T-Zellen	Signaltransduktion	1:100
CD54	ICAM-1	Lymphozyten, Endothel Makrophagen	Adhäsionsmolekül, Ligand von LFA-1	1:100
CD62L	LECAM, L-Selectin	Periphere Leukozyten	Lymphozytenhoming	1:100
CD103	Integrin α_{IEL}	Intraepitheliale Lymphozyten des Darms, einige periphere T-Zellen	Adhäsionsmolekül, Interaktionen zwischen Epithel und T-Zellen	1:100
CD152	CTLA-4	Aktivierte T-Zellen, Treg (Oberfläche & intrazellulär)	Negativ-Regulation von Immunantworten	1:100
CD154	CD40Ligand, CD40L	Aktivierte T-Zellen	Ko-Stimulation, Ligand von CD40	1:100
PD-L1	B7-H1	T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen	Ko-Stimulation, Ligand von PD1	1:100
PD1		Aktivierte T- und B-Zellen	Ko-Stimulation, Ligand von PD-L1	1:100
$\alpha 4\beta 7$	LPAM-1	Reife Lymphozyten	Adäsionsmolekül	1:100
V β 8.1, 8.2		T-Zellen	β -Kette des TCR, Signaltransduktion	1:100
$\alpha\beta$ TCR		T-Zellen	Signaltransduktion	1:75

Tabelle 4: Untersuchte Oberflächenmoleküle auf T-Helfer-Zellen und DX5⁺ NKT-Zellen: Färbung und Messung im FACS erfolgten wie in 3.2.1 beschrieben, die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm FlowJo, Version 5.5 wie in 3.6.1.2. beschrieben.

3.2.3. Intrazelluläre FACS-Färbung

Zur Überprüfung der Expression von CTLA-4 durch DX5⁺ NKT-Zellen wurde sowohl eine Oberflächenfärbung als auch eine intrazelluläre FACS-Färbung durchgeführt. Intrazelluläres CTLA-4 kann v.a. bei klassischen regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺) nachgewiesen werden und trägt zu deren immunregulatorischer Wirkung bei.

Zur intrazellulären Färbung wurde der „Inside Stain Kit“ der Firma Miltenyi verwendet. Es wurden zunächst frisch isolierte DX5⁺ NKT-Zellen wie oben beschrieben die Oberflächenmoleküle mit anti-DX5-APC, anti-CD3-FITC und anti-CTLA-4-PE gefärbt wie oben beschrieben. Dieser Schritt wird an lebenden Zellen durchgeführt, da durch die spätere Fixierung Oberflächenmoleküle zerstört werden können. Nach einem Waschschrift wurde das Zellpellet in 250µl MACS-Puffer aufgenommen. Zur Fixierung der Zellen wurden 250µl „Inside Fix“ zugegeben und die Zellen lichtgeschützt für 20min bei RT inkubiert. „Inside Fix“ enthält 3,7% Formaldehyd und dient zur Fixierung der Zellen. Die Zellen werden dadurch abgetötet, aber deren Struktur bleibt erhalten. Nach zwei Waschsritten (300x g; 5min; RT) in MACS-Puffer wurde der Überstand verworfen. Es wurden 1µl Zellen anti-CTLA-4-PE in 100µl „Inside Perm“ zugegeben (= Verdünnung 1:100) und lichtgeschützt für 15min bei RT inkubiert. „Inside Perm“ enthält ein Detergens, was die Zellmembran durchlässig macht und es so dem Antikörper ermöglicht, ins Zellinnere vorzudringen. Nach Ende der Inkubationszeit wurde 1ml Inside Perm zugegeben und die Zellen wurden 1x gewaschen. Das Pellet wurde in 250µl- 350µl MACS-Puffer aufgenommen und im FACS wie in Abschnitt 3.2. beschrieben analysiert.

3.3. *In vitro*-Versuche

3.3.1. Detektion zytokinproduzierender Zellen nach Ko-Kultur

Zur Überprüfung, ob Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen die Produktion der Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Interferon gamma (IFN γ) durch die T-Helfer-Zellen verändert, wurde der „Cytokine Secretion Assay“ der Firma Miltenyi verwendet. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer intrazellulären Färbung ist, dass hier nur Zytokine detektiert werden, die tatsächlich von der Zelle an das Medium abgegeben werden. Bei einem ELISA werden dagegen zwar nur die ins Medium

abgegebenen Zytokine gemessen, aber es ist nicht mehr möglich, die Zellpopulation zu identifizieren, die die gemessenen Zytokine produziert hat.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert und anschließend im Verhältnis 1:1 in 96well-Platten mit rundem Boden ausplattiert. Dabei wurden jeweils 0,03Mio CD62L⁺CD4⁺ Zellen bzw. DX5⁺ NKT-Zellen in einem Volumen von 150µl RPMI 1640 verwendet. Folgende Versuchsgruppen wurden untersucht: CD62L⁺CD4⁺ Zellen (Kontrolle) und CD62L⁺CD4⁺ Zellen mit DX5⁺ NKT-Zellen. Zur Stimulierung der Zellen wurden 10U/ml Interleukin-2 und 5µg/ml LPS zugegeben. Nach einer Kulturdauer von 36h wurden die Zellen geerntet. Es wurden jeweils drei wells gepoolt, um eine ausreichende Zellzahl für die FACS-Messung zu erreichen. Die Zellen wurden nach einem Waschschrift (350x g, 8min, RT) zunächst mit einem sogenannten „Catch-Reagent“ (10µl/Mio) bestehend aus einem Antikörper gegen CD45 gekoppelt an einen Antikörper gegen das jeweilige Zytokin für 5min auf Eis inkubiert. CD45 bindet an alle Leukozyten und dient somit zur Verankerung des Zytokin-Antikörpers an der Zelloberfläche. Nach Zugabe von 37°C warmem Medium (gewünschte Zellkonzentration: 0,1x10⁶/ml) wurde die Zellsuspension für weitere 45min bei 37°C unter Bewegung inkubiert. In dieser Sezernierungsphase wurden die Zytokine, die von der Zelle abgegeben wurden, von dem jeweiligen- auf der Zelloberfläche verankerten- Antikörper gebunden. Nach zwei Waschschriften (350x g, 8min, 4°C) wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Detektions-Antikörper gegen das gewünschte Zytokin (1:10 in 100µl Puffervolumen), sowie einem APC-konjugierten Antikörper gegen CD49b (=DX5, 1:100 in 100µl Puffervolumen) für 10min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt erfolgte lichtgeschützt, um die Fluoreszenz-Farbstoffe nicht „auszubleichen“. Durch die Gegenfärbung mit CD49b-(DX5-)Antikörper konnten gezielt zytokin-produzierende T-Helfer-Zellen analysiert werden, da DX5⁺ NKT-Zellen bei der Auswertung ausgeschlossen werden konnten. Nach einem Waschschrift wurde der Überstand verworfen, das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert, im FACS gemessen und wie in 3.6.1.3 beschrieben ausgewertet.

3.3.2. Herstellung eines Proteinextrakts aus Mäusekot

Bei den in Abschnitt 3.3.1. beschriebenen Experimenten wurden die Zellen in Kultur mit IL-2 und LPS stimuliert. Eine weitere- mehr „kolitis-spezifische“- Möglichkeit um in der Zellkultur einen Antigenreiz für die Lymphozyten zu liefern, ist ein Extrakt aus

Proteinen im Mäusekot (= Fecal extract). Die Herstellung dieses Extrakts erfolgte nach einer Methode von Brimnes et al. [17]. Zur Organentnahme wurde eine gesunde Balb/c-Maus durch Genickbruch getötet. Der Inhalt von Coecum und Kolon wurde in 2ml PBS mit 10µg/ml DNase für 5min auf Eis inkubiert. Pro ml PBS wurden 0,25g Glas-Kügelchen (150-212µm) zugegeben. Die Suspension wurde dreimal mit dem Ultraschallstab (Einstellung: 30s, 1 Zyklus) sonifiziert und anschließend bei 14000rpm und 4°C für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit einer Steriflip-Filtereinheit steril filtriert und bei -80°C gelagert. Vor Verwendung in der Zellkultur wurde mit Hilfe des „BC Proteinassays“ der Firma Uptima der Proteingehalt bestimmt. Dieser Kit arbeitet mit zwei Lösungen. Lösung A besteht aus Bicinchonin-Säure, Lösung B enthält Kupfer(II)Sulfat. Diese beiden Lösungen reagieren zusammen mit Protein zu einem violett-gefärbten Komplex, der im ELISA-Reader nachgewiesen werden kann. Zur Versuchs-Durchführung wurde der Extrakt mit PBS 1:20 verdünnt. In Dreifachbestimmung wurden jeweils 20µl Lösung in eine 96well-Platte mit flachem Boden pipettiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden verschiedene Verdünnungen einer BSA-Proteinlösung verwendet. Aus 50 Teilen der im Kit enthaltenen Lösung A und einem Teil Lösung B wurde eine Reagenzlösung hergestellt. 200µl dieser Lösung wurden zu jeder Probe zugegeben. Die Kulturplatte wurde für 30min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert, wobei es abhängig von der in der Probe enthaltenen Proteinmenge zur Entwicklung einer rötlich-violetten Farbe kam. Nach der Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 540nm im Elisa-Reader gemessen und der Proteingehalt der Proben anhand der Standardwerte mit dem Computerprogramm Softmax berechnet. Für die Zellkultur wurde der Extrakt in einer Konzentration von 200µg/ml verwendet.

3.3.3. CFSE-Färbung

Um in Ko-Kultur die DX5⁺ NKT-Zellen und die zugegebenen Lymphozyten (z.B. CD62L⁺CD4⁺ Zellen) unterscheiden zu können, wurden letztere vor der Ko-Kultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (=CFSE, =CFDA SE) gefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit der Firma Molecular Probes. CFSE reichert sich im Zytoplasma der Zelle an. Bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 492nm emittiert es Licht mit einer Wellenlänge von 517nm, das im gleichen Bereich wie der Farbstoff FITC (Anregung bei 492nm; emittiertes Licht: 517nm) im Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist. Durch die

Färbung und die nötigen Waschschrirte gehen etwa 10% bis 50% der Zellen verloren, so dass entsprechend mehr Zellen für die Färbung eingesetzt werden müssen.

Die Zellen wurden einmal in PBS oder Medium ohne FCS-Zusatz gewaschen. Dieser Schritt dient dazu, eventuell enthaltenes tierisches Eiweiß zu entfernen, das sonst den Färbeprozess stören könnte. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen als Pellett belassen. Der im Kit in Pulverform enthaltene Farbstoff wurde zunächst in 90µl DMSO gelöst und dann mit 37°C warmem PBS 1:20 verdünnt (=Arbeitslösung). Die Färbelösung wurde aus 0,5µl/Mio Zellen Arbeitslösung und 50µl/Mio Zellen PBS hergestellt. Das Zellpellett wurde in der Färbelösung resuspendiert und für 5min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurde FCS zugegeben, so dass die Endkonzentration des FCS 10% betrug, um die Färbung zu stoppen. Die Zellsuspension wurde mit RPMI-Medium/10%FCS aufgefüllt und zweimal gewaschen. Anschließend wurden 5ml RPMI-Medium/10%FCS (37°C warm) zugegeben und die Suspension lichtgeschützt für 30min bei 37°C inkubiert. Während dieses Inkubierungsschritts wird überschüssiges CFSE von den Zellen wieder abgegeben. Nach einem weiteren Waschschrirte wurde die Zahl CFSE-positiver Zellen im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

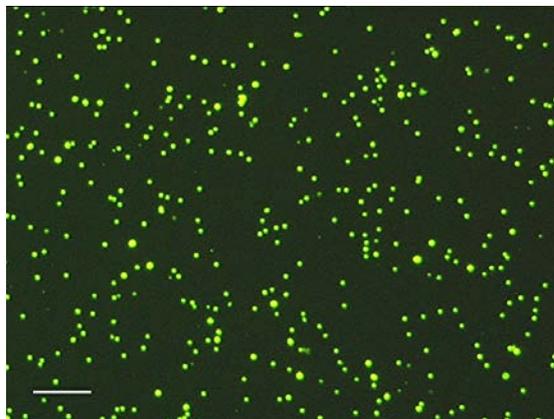


Abbildung 7: CFSE-gefärbte Lymphozyten (10fache Vergrößerung; Größenbalken entspricht 100µm)

3.3.4. Ko-Kultur von Lymphozyten mit DX5⁺ NKT-Zellen

Zur Ko-Kultivierung von DX5⁺ NKT-Zellen und Lymphozyten wurden zwei Ansätze verwendet. Im Ansatz 1 wurden DX5⁺ NKT-Zellen mit den Kolitis-verursachenden

CD62L⁺CD4⁺ Zellen kultiviert. Als Kontrolle dienten Ko-Kulturen mit nicht-Kolitis-
verursachenden CD62L^{low} CD4⁺ Zellen. Zur Erstellung eines Referenzwerts wurden
sowohl die CD62L⁺CD4⁺ Zellen als auch die CD62L^{low}CD4⁺ Zellen ohne Zugabe von
DX5⁺ NKT-Zellen kultiviert. Dies liefert die Zellzahl, die sich nach Kultur ohne den
Einfluss von DX5⁺ NKT-Zellen ergeben würde. So können kulturbedingte
Veränderungen der Zellzahl, die nicht durch DX5⁺ NKT-Zellen verursacht werden-
beispielsweise durch apoptotische Vorgänge- ausgeschlossen werden.

In Ansatz 2 wurden DX5⁺ NKT-Zellen mit Zellen aus mesenterialen Lymphknoten
und/oder Milz von mit DSS behandelten Tieren ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten hier
Lymphknotenzellen/Milzzellen aus gesunden Tieren. Auch hier wurden die
Lymphknotenzellen aus DSS-Tieren und aus gesunden Tieren zur Kontrolle jeweils
ohne Zugabe von DX5⁺ NKT-Zellen kultiviert.

Um die DX5⁺ NKT-Zellen von den zugegebenen Zellen unterscheiden zu können
wurden die CD62L⁺CD4⁺ Zellen, die CD62L^{low}CD4⁺ Zellen, die Lymphozyten aus DSS-
Tieren und die Lymphozyten aus gesunden Tieren vor Kultur jeweils wie in 3.3.3.
beschrieben mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE gefärbt. Die Kultivierung der Zellen
erfolgte in 24well-Platten in einem Volumen von 1ml RPMI1640-Medium pro well bei
einer Temperatur von 37°C bei 5% CO₂. Es wurden jeweils 0,3 x10⁶ DX5⁺ NKT-Zellen,
sowie 0,3 x10⁶ CFSE-gefärbte Zellen ausplattiert. Zu jedem Ansatz wurden zur
Stimulierung der Lymphozyten 200µg/ml Fecal extract zugegeben. An Tag 2 wurden
500µl frisches Medium inklusive Fecal extract zugegeben. An Tag 4 der Ko-Kultur
wurden die Zellen geerntet und die Zahl an CFSE-Zellen mit Hilfe einer „bright-line“
Neubauer-Zählkammer im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Es wurden vier große
Quadrate mit jeweils einer Fläche von 1mm² ausgezählt und gemittelt. Zellen, die Zell-
Zell-Kontakt zu DX5⁺ NKT-Zellen (farblos) hatten und offensichtlich mit diesen
interagierten, wurden dabei nicht gezählt (siehe auch Abb. 8). Das Volumen, in dem
sich die jeweiligen Proben befanden, wurde exakt bestimmt, um später die tatsächliche
Zellzahl berechnen zu können.

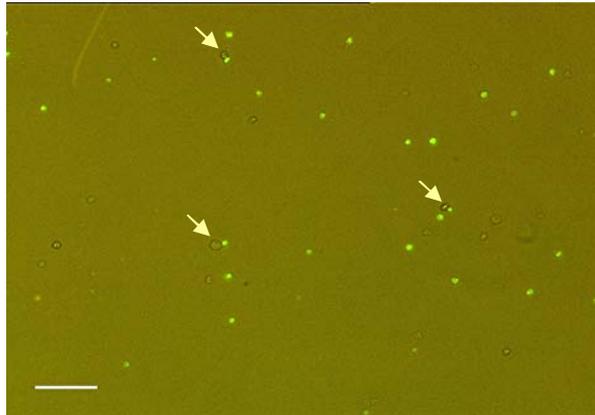


Abbildung 8: Ko-Kultur aus DX5⁺ NKT-Zellen und CFSE-gefärbten CD62L⁺CD4⁺ Zellen (10fache Vergrößerung; Größenbalken entspricht 100µm; Pfeile: CD62L⁺CD4⁺ Zellen, die nicht gezählt werden, weil sie Zell-Zell-Kontakt zu DX5⁺ NKT-Zellen haben)

Zur näheren Untersuchung der Wirkungsweise von DX5⁺ NKT-Zellen werden verschiedene inhibierende monoklonale Antikörper (mAK) gegen Oberflächenmoleküle zugegeben. Es wurde das für die Aktivierung klassischer NKT-Zellen wichtige Molekül CD1d blockiert. Zusätzlich wurden auch die co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD154 und PD-L1 blockiert, die möglicherweise für die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen wichtig sind. In einem weiteren Ansatz wurde ein irreversibler Caspase-Inhibitor (= Z-VAD-FMK) verwendet, der die über Caspasen vermittelte Apoptose der Zielzellen verhindert (verwendete Mengen siehe Tabelle 5). Als Kontrolle wurden in Parallelansätzen die jeweiligen Isotypantikörper zugegeben bzw. als Kontrolle für den Caspase-Inhibitor ein ähnlich aufgebautes nicht-inhibitorisch wirkendes Molekül (= Z-FA-FMK).

anti-CD1d (Isotyp: Ratte IgG2b)	50µg/ml
anti-CD40 (Isotyp: Hamster IgM)	50µg/ml
anti-CD154 (Isotyp: Hamster IgG3)	100µg/ml
anti-PD-L1 (Isotyp: Ratte IgG2a)	50µg/ml
Z-VAD-FMK (Kontrolle: Z-FA-FMK)	20µM

Tabelle 5: Konzentrationen der verwendeten monoklonalen Antikörper und des Caspase-Inhibitors bzw. deren Kontrollen

An Tag zwei der Zellkultur werden 500µl frisches Medium, sowie eine entsprechende Menge an frischen Zusätzen zugegeben. Die Zugabe eines frischen Caspase-Inhibitors bzw. des entsprechenden Kontroll-Moleküls war nicht nötig, da der Inhibitor irreversibel ist und es nicht- wie bei einem Antikörper- zu einem zeitabhängigen Nachlassen der Wirkung kommt. Zur Überprüfung ob DX5⁺ NKT-Zellen für ihre Wirkung Zell-Zell-Kontakt brauchen wurde in einem weiteren Experiment die Ko-Kultivierung in einer 12well-Platte mit einem sogenannten Transwell-Einsatz durchgeführt. Hier wurden jeweils 0,75 x10⁶ Zellen ausplattiert. Dabei wurden die DX5⁺ NKT-Zellen oben im Transwell-Einsatz ausplattiert, während die CFSE-gefärbten Lymphozyten sich unten im well befanden. Das verwendete Volumen betrug 2ml, in dem wiederum 200µg/ml Fecal extract enthalten waren. Um direkten Kontakt der Zellen zu verhindern wurde ein 0,4µm Transwell-Einsatz verwendet, der den Austausch löslicher Stoffe (z.B. Zytokine), nicht aber direkten Zell-Zell-Kontakt erlaubte.

Die Ko-Kulturen wurden wie oben beschrieben an Tag vier beendet und ausgezählt.

3.4. Tierversuche

Die Tiere wurden gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 21°C, die Luftfeuchtigkeit 55% im Mittel (40%-75%). Es wurde ein künstlicher Tag-/Nachtrhythmus aufrechterhalten (12h/12h). Die Tiere erhielten Wasser (Leitungswasser) und Futter ad libitum. Das Wasser wurde 3mal wöchentlich gegen frisches Wasser ausgetauscht. Die für das DSS-Modell benötigten Balb/c-Mäuse wurden in Typ 3-Käfigen in Räumen mit einem 15fachen Luftwechsel gehalten. Die für das CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis-Modell benötigten immundefizienten C.B17-SCID-Mäuse wurden in speziellen Filterkäfigen (IVC Typ II/L) mit einem 20fachen Luftwechsel bei 0,5Pascal Überdruck gehalten. Alle Versuche wurden nach den Maßgaben des Deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesblatt vom 17.2.1993, I S. 254) durchgeführt.

3.4.1. DSS-Modell

Im DSS-Modell wird bei gesunden Mäusen durch die Gabe der Zuckerverbindung Dextran-Natriumsulfat (=DSS) im Trinkwasser eine Entzündung im Dickdarm

ausgelöst. DSS zerstört die epitheliale Barriere im Darm, so dass Antigene aus dem Darmlumen ins Gewebe vordringen können. Diese werden vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und attackiert, was zu einer Entzündungsreaktion führt. Durch eine 7-tägige Gabe von DSS in einer Konzentration von 2,5 % bis 5% wird bei den Tieren eine akute Kolitis verursacht. Danach folgen 10 Tage mit der Gabe von normalem Trinkwasser. Durch vier Zyklen von DSS (7 Tage) mit anschließender Gabe von Trinkwasser (10 Tage) wird bei den Mäusen eine chronische Kolitis induziert, die mehrere Wochen nach der letzten DSS-Gabe anhält (siehe auch Abb. 9) [61; 90]. Für das DSS-Modell wurden immunkompetente weibliche Balb/c-Mäuse mit einem Gewicht von 19,5g bis 20,5g verwendet. In unseren Experimenten erhielten die Tiere DSS in einer Konzentration von 2,5% gelöst im Trinkwasser. Zur Isolierung von Lymphozyten aus Tieren mit chronischer DSS-Kolitis wurden die Organe zwischen Tag 59 und Tag 72 (also maximal zwei Wochen nach letztem DSS) entnommen.

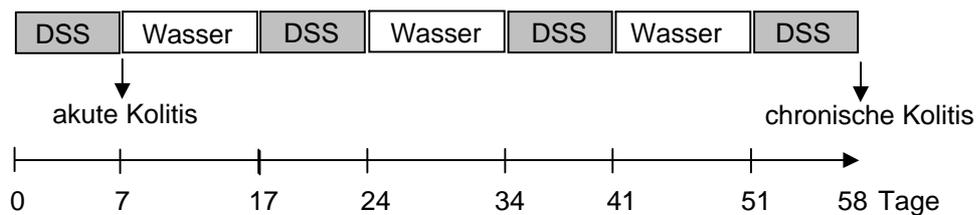


Abbildung 9: Modell der chronischen DSS-Kolitis

3.4.2. CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis-Modell

Für das CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis-Modell wurden immundefiziente C.B-17/lcrCrl-SCID-Mäuse (kurz: C.B17-SCID) verwendet. Die Verwendung dieses Tierstamms für das Transferkolitis-Modell wurde bereits durch Asseman et al. beschrieben [6]. C.B17-SCID-Mäuse wurden 1983 erstmals von Bosma et al. [12] beschrieben und sind homozygot für die autosomal rezessive Mutation „scid“, die auf Chromosom 16 lokalisiert ist [13; 14]. Dies führt zu einem Defekt in der V(D)J Rekombination, wodurch die Tiere keine funktionalen B- und T-Zellen besitzen. Der Tierstamm C.B-17-SCID ist kongen zu Balb/c-Mäusen und unterscheidet sich von diesen nur im Allel für die schwere Kette des Immunglobulins, das aus dem Tierstamm C57BL/Ka stammt [13; 14; 15]. Für das Tranferkolitismodell wurden Tiere im Alter zwischen 6 und 8 Wochen verwendet.

Im Tiermodell kann durch den Transfer naiver T-Helfer-Zellen aus immunkompetenten Tieren in kongene oder syngene immundefiziente Tiere eine Kolitis ausgelöst werden [30; 100]. Naive T-Helfer-Zellen exprimieren neben CD4 große Mengen an CD45RB (CD45RB^{high}) [86; 99; 100] und sind positiv für CD62L (=L-Selektin) [68; 87]. Abhängig von der injizierten Zellzahl lösen diese Zellen nach 4-8 Wochen eine Kolitis aus, die sich in Gewichtsverlust und Durchfall, sowie in schlechtem Allgemeinzustand und auch im histologischen Bild zeigt [3; 70; 86]. Memory T-Helfer-Zellen, die CD45RB^{low} bzw. CD62L^{low} sind, verursachen keine Kolitis. Sie können sogar eine durch CD45RB^{high}-Zellen induzierte Kolitis verhindern [99; 100]. Dieses Tiermodell wurde in unserem Labor bisher nicht verwendet und musste deshalb im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert werden. Die Zellen wurden aus der Milz immunkompetenter gesunder Balb/c-Mäuse wie in 3.1.1.2. beschrieben isoliert.

Zur Etablierung des CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis-Modells wurden jeder C.B17-SCID-Maus 1×10^6 CD62L⁺CD4⁺ Zellen in 0,5ml PBS intraperitoneal injiziert (n=10). Tieren der Kontrollgruppe wurden 1×10^6 CD62L^{low}CD4⁺ Zellen in 0,5ml PBS injiziert (n=8). Das Gewicht der Tiere und das Auftreten möglicher Kolitis-Anzeichen wie Durchfall, struppiges Fell oder eingeschränkte Aktivität wurden engmaschig kontrolliert. 53 Tage nach Transfer wurde der Versuch beendet und es wurden Proben des Kolons zur histologischen Untersuchung entnommen.

3.4.3. Präventive Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen im CD62L⁺CD4⁺ Modell

In einem ersten Versuch wurde untersucht, ob DX5⁺ NKT-Zellen das Entstehen einer CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis verhindern können (Prävention). Dazu wurden zwei Versuchsgruppen gebildet (n= 6 Tiere pro Gruppe; siehe auch Tabelle 3). Beide Gruppen erhielten an Tag 0 eine Injektion mit 1×10^6 CD62L⁺CD4⁺ Zellen. Tiere der Behandlungsgruppe erhielten zusätzlich an den Tagen -2, +14, +28 und +42 eine Injektion mit $0,5 \times 10^6$ DX5⁺ NKT-Zellen (siehe auch Abb. 10). Die Tiere wurden engmaschig auf Gewichtsverlust, sowie das Auftreten von Kolitis-Symptomen kontrolliert. 77 Tage nach Induzierung der Kolitis wurde der Versuch beendet und Proben des Colon descendens zur histologischen Untersuchung wurden entnommen.

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob die Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen spezifisch durch die DX5⁺ NKT-Zellen verursacht wird oder ob der Effekt allein auf der

Injektion von Zellen- unabhängig vom Zelltyp- beruht. Dazu wurden drei Versuchsgruppen gebildet (n= 4 Tiere pro Gruppe, 2 Versuche). Alle Tiere erhielten an Tag 0 eine Injektion mit $CD62L^+CD4^+$ Zellen. Tiere der Gruppe 2 erhielten an den Tagen -2, +14, +28 und +42 eine Injektion mit $0,5 \times 10^6$ $DX5^+$ NKT-Zellen. Tiere der Gruppe 3 wurden an den genannten Zeitpunkten mit der gleichen Anzahl an $CD8^+$ Kontrollzellen behandelt. Auch hier wurden das Gewicht der Tiere und das Vorkommen eventueller Kolitis-Symptome regelmäßig überprüft. Nach 77 Tagen wurde der Versuch beendet, und es wurden Proben des Colon descendens zur histologischen Untersuchung entnommen.

Ein Molekül, das eng mit NT-Zellen assoziiert und sehr wichtig für deren Aktivierung ist, ist CD1d. In einem dritten Versuch sollte daher untersucht werden, ob der Effekt der $DX5^+$ NKT-Zellen durch Gabe eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d verhindert werden kann. Dazu wurden C.B-17-SCID-Mäuse in vier Gruppen eingeteilt (n= 5 Tiere pro Gruppe, 2 Versuche). Tiere der Gruppe 1 (Kontrollgruppe) erhielten 1×10^6 $CD62L^+CD4^+$ Zellen an Tag 0, Tiere der Gruppe 2 erhielten zusätzlich zu den $CD62L^+CD4^+$ Zellen an Tag -2, sowie an den Tagen +14, +28 und +42 $0,5 \times 10^6$ $DX5^+$ NKT-Zellen in 0,5ml PBS. Tiere der Gruppen 3 und 4 erhielten wie oben beschrieben $CD62L^+CD4^+$ Zellen und $DX5^+$ NKT-Zellen und zusätzlich 2h vor jeder Injektion von $DX5^+$ NKT-Zellen 200 μ g eines CD1d-Antikörpers (Gruppe 3) bzw. des entsprechenden Isotyp-Antikörpers (Gruppe 4) in 500 μ l PBS i.v. in die Schwanzvene injiziert. Wie oben beschrieben wurden die Gewichtsentwicklung und der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere ständig kontrolliert.

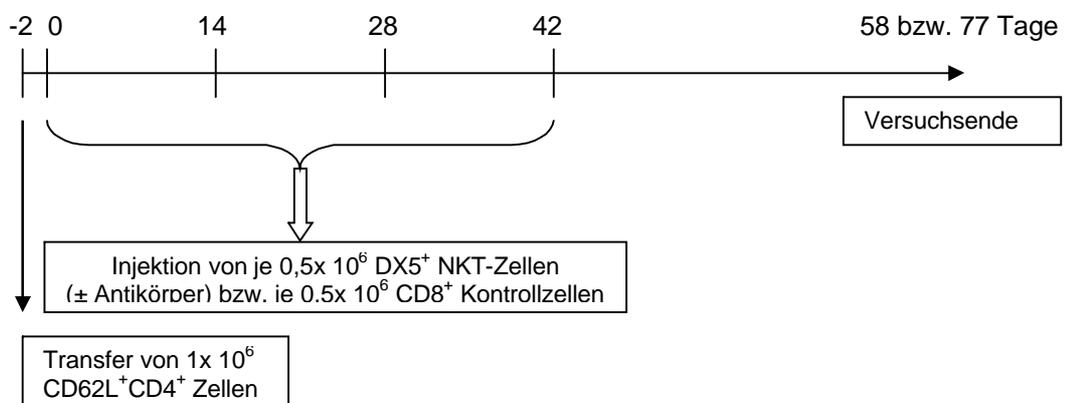


Abbildung 10: Zeitplan zur Untersuchung der **präventiven** Wirkung von $DX5^+$ NKT-Zellen bei $CD62L^+CD4^+$ Transferkolitis

Nach 58 bis 77 Tagen wurde der Versuch beendet. Es wurden Proben des Colon descendens zur histologischen Untersuchung entnommen.

Versuch	Gruppe	Behandlung	Antikörper
1	1	keine	kein Antikörper
	2	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag -2, +14, +28 und +42	kein Antikörper
2	1	keine	kein Antikörper
	2	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag -2, +14, +28 und +42	kein Antikörper
	3	CD8 ⁺ Zellen an Tag -2, +14, +28 und +42	kein Antikörper
3	1	keine	kein Antikörper
	2	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag -2, +14, +28 und +42	kein Antikörper
	3	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag -2, +14, +28 und +42	anti-CD1d
	4	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag -2, +14, +28 und +42	Isotyp-AK

Tabelle 6: Experimentelle Gruppen zur Untersuchung der **präventiven** Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen bei CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis

3.4.4. Therapeutische Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen im CD62L⁺CD4⁺ Modell

In den Untersuchungen zur therapeutischen Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen wurde ein Versuchsaufbau gewählt, der mehr der klinischen Situation entspricht. Hier wird ein Patient erst dann um Hilfe bei einem Arzt nachsuchen, wenn erste Krankheitssymptome vorhanden sind. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob durch den Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen eine bereits etablierte CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis therapiert werden kann. Es wurden dazu zwei unabhängige Versuche mit jeweils drei Versuchsgruppen durchgeführt (siehe auch Tabelle 7). Alle Tiere erhielten an Tag 0 eine Injektion mit 1×10^6 CD62L⁺CD4⁺ Zellen. Der Gewichtsverlauf wurde engmaschig kontrolliert und es wurde auf das Auftreten von Kolitis-Symptomen geachtet. An Tag 42 (6 Wochen nach Transfer) wurden die Tiere entsprechend ihrem Gewicht in drei Gruppen randomisiert (n=5 in Versuch 1, n= 6 in Versuch 2). Tiere der Gruppe 1 erhielten keine Therapie, während Tiere der Gruppe 2 eine Injektion mit $0,5 \times 10^6$ DX5⁺ NKT-Zellen in 0,5ml PBS erhielten. Die Tiere der dritten Gruppe erhielten in Versuch 1 je $0,5 \times 10^6$ CD8⁺ Kontrollzellen in 0,5ml PBS, um den

Effekt des Zelltransfers zu überprüfen. Für eine Versuchsgruppe wurde das Experiment ohne weitere Zelinjektion an Tag 42 beendet, um festzustellen, ob bei Therapiebeginn eine etablierte Kolitis bei den Tieren festzustellen war. An Tag 56 (8 Wochen nach Transfer der CD62L⁺CD4⁺ Zellen) wurde die Injektion von DX5⁺ NKT-Zellen bzw. CD8⁺ Kontrollzellen wiederholt.

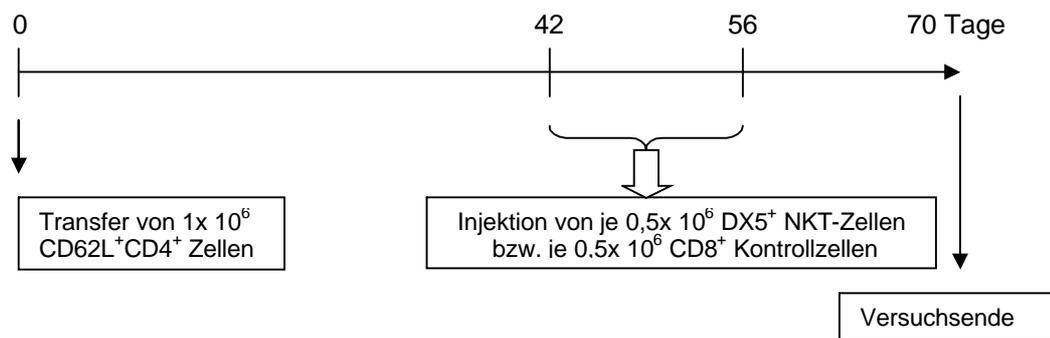


Abbildung 11: Zeitplan zur Untersuchung der **therapeutischen** Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen bei CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis

70 Tage nach Transfer der CD62L⁺CD4⁺ Zellen wurde der Versuch beendet. Es wurden Proben des Colon deszendens zur histologischen Untersuchung entnommen.

Versuch	Gruppe	Behandlung
1	1	Keine
	2	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag +42 und +56
	3	CD8 ⁺ Zellen an Tag +42 und +56
2	1	Keine
	2	DX5 ⁺ NKT-Zellen an Tag +42 und +56
	3	keine ; Versuchsende Tag +42

Tabelle 7: Experimentelle Gruppen zur Untersuchung der **therapeutischen** Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen bei CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis

3.5. HE-Färbung und Histologischer Score

Von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben des Colon deszendens wurden 4µm dicke Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden für jeweils 5min in absteigender Reihenfolge in Alkohol in verschiedenen Konzentrationen (99%-50%) entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gewaschen bevor sie für ca. 5min in Hämalaun/Hämatoxilin gefärbt wurden. Um eine blaue Färbung zu erreichen, wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült und wieder in destilliertes Wasser überführt. Sie wurden anschließend mit Eosin gegengefärbt und kurz mit destilliertem Wasser gespült. Den Schnitten wurde in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen Wasser entzogen, und sie wurden mit dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas luftdicht versiegelt.

Pro Versuchstier wurden drei Schnitte beurteilt und daraus ein Mittelwert gebildet. Es wurde ein histologischer Score nach Kojouharoff et al. für die Morphologie des Epithels und für die Schwere der zellulären Infiltration festgelegt [61]. Die Scores reichen jeweils von 0 bis 4 (siehe Tabelle 8). Der endgültige Score stellt den Mittelwert aus dem Score für die Epithelmorphologie und dem Score für das Zellinfiltrat dar und reicht somit von 0 bis 4. Von repräsentativen Schnitten wurden digitale Bilder am Mikroskop erstellt.

Score	Epithelmorphologie	Zelluläre Infiltration
0	Normale Morphologie	Kein Infiltrat
1	Verlust einiger Becherzellen	Zelluläre Infiltrate um die Basis der Krypten herum
2	Verlust von Becherzellen in großen Arealen	Zelluläre Infiltrate bis zur Lamina muscularis mucosae
3	Pathologische Verlängerung einiger Krypten	Zelluläre Infiltrate bis zur Lamina muscularis mucosae und Verdickung der Mucosa
4	Verlängerung der Krypten in großen Arealen	Zelluläre Infiltrate bis in die Lamina submucosa mit Verdickung der Mucosa

Tabelle 8: Definition des histologischen Scores zur Beurteilung von Schnitten des Colon deszendens

- 3.6. Auswertung und Statistik
- 3.6.1. Auswertung der FACS-Daten
- 3.6.1.1. Allgemeines

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurden die Computerprogramme WinMDI, 2.8 und FlowJo, Version 5.5 verwendet. Es wurde zunächst ein Dotplot-Diagramm geöffnet, auf dem Vorwärtsstreulicht (FSC = Größe der Zellen) und Seitwärtsstreulicht gegeneinander aufgetragen sind (SSC = Granularität der Zellen). Lymphozyten sind kleine Zellen mit einer geringen Granularität und befinden sich deshalb in dieser Darstellung links unten. Diese Population wurde als gewünschte Region definiert (=Lymphozytengate), so dass in der folgenden Auswertung nur noch diese Zellen erscheinen (siehe auch Abb. 12). Bei der Kontrolle der Zellsortierung wurde kein Lymphozytengate gesetzt, da hier alle in der Probe vorhandenen Zellen in die Auswertung eingehen sollten. Anhand der Zellverteilung in der Kontrollprobe (gefärbt mit Isotyp-Antikörper) konnte eine Markierung gesetzt werden, um eine Unterscheidung zwischen „negativen“ und „positiven“ Zellen zu treffen. Bei der Darstellung als Histogramm (ein Parameter) unterteilt die Markierung die Grafik in zwei Teile, wobei die Markierung- orientiert an der Kontrollprobe- so gesetzt wurde, dass alle Zellen links von dieser als negativ gelten. Alle Zellen innerhalb der Markierung wurden als positiv für das jeweilige Merkmal angesehen. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation wird vom Programm berechnet. In der Darstellung als Dotplot (zwei Parameter) wurde ein Quadrant gezeichnet, der das Bild in vier Rechtecke unterteilt. Entsprechend der Kontrollprobe wurde der Quadrant so gesetzt, dass die mit Isotyp-Antikörper gefärbten Zellen im linken unteren Quadranten zu finden waren. Diese Zellen wurden als negativ für beide Parameter definiert. In der Darstellung der mit dem gewünschten Antikörper gefärbten Zellen wurde diese Einteilung beibehalten. Das Computerprogramm kann nun die jeweilige Zellzahl für jeden Quadranten berechnen.

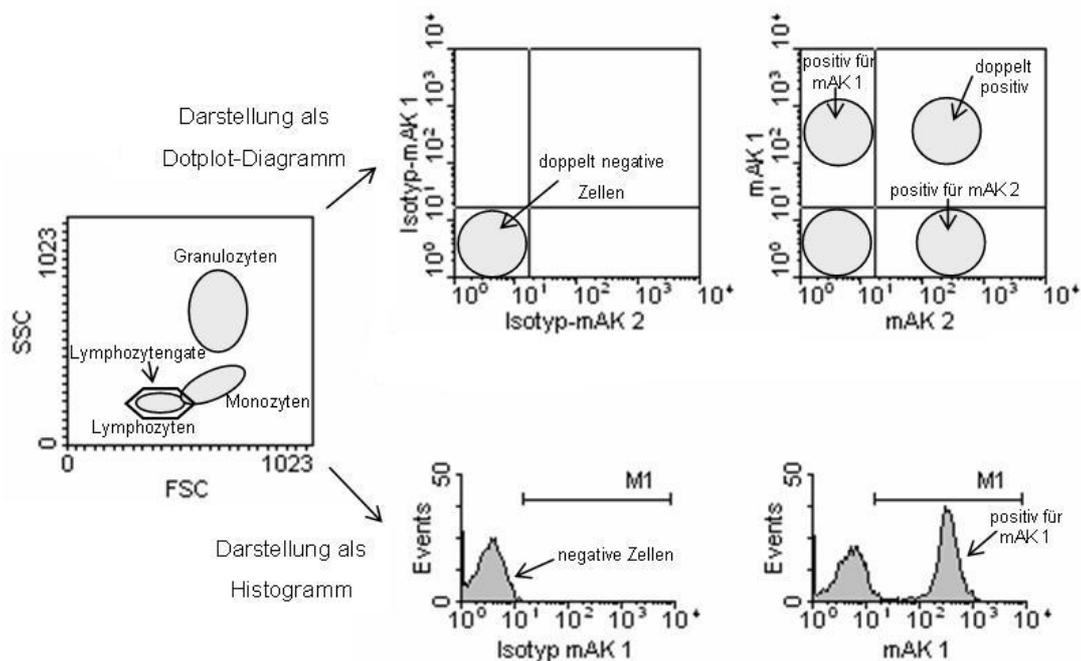


Abbildung 12: Schematische Beschreibung der FACS-Auswertung: Definition eines Lymphozytengates und anschließende Darstellung als Dotplot-Diagramm oder Histogramm

3.6.1.2. Charakterisierung von DX5⁺ NKT-Zellen und T-Helfer-Zellen

Zur Charakterisierung von DX5⁺ NKT- bzw. T-Helfer-Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben aufgereinigt. Es wurde ein Lymphozytengate definiert und die jeweiligen Färbungen für die Fluoreszenzen (FL1 entspricht FITC; FL2 entspricht PE; FL4 entspricht APC) wurden dann als Histogramm dargestellt, in dem nur Lymphozyten gezeigt werden. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden auf die Expression von Adhäsionsmolekülen, co-stimulatorischen Molekülen, sowie von bestimmten T-Zell-Markern und Markern regulatorischer Zellen untersucht. Die Färbungen für CD49b bei DX5⁺ NKT-Zellen bzw. für CD4/CD62L bei T-Helfer-Zellen dienen dabei nicht nur zur Charakterisierung der Zellen sondern auch zur Kontrolle der Sortierqualität. In der Abbildung wird die mit dem gewünschten Antikörper gefärbte Probe als durchgezogene Linie dargestellt, die Isotypkontrolle ist als gestrichelte Linie im gleichen Histogramm zu sehen.

3.6.1.3. Detektion zytokinproduzierender Zellen

Zur Detektion von zytokinproduzierenden T-Helfer-Zellen wird ein Dotplot-Diagramm für Lymphozyten erstellt, auf dem die Granularität gegen die Fluoreszenz 4 (=anti-CD49b-APC) aufgetragen ist. Es wird um die T-Helfer-Zellen, die CD49b-negativ sind, ein gate gezeichnet, so dass nur diese in die Auswertung eingehen. In dem Histogramm, das nur die Fluoreszenz für das jeweilige Zytokin (Farbstoff PE) zeigt, wird ein Marker für PE-positive Zellen gesetzt, der in der Gruppe der CD62L⁺CD4⁺ Zellen unter 1% der Zellen umfasst (Kontrollprobe). Im Vergleich dazu werden dann die T-Helfer-Zellen aus der Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen mit dem gleichen Marker dargestellt und die Prozentwerte für PE-positive Zellen ermittelt.

3.6.2. Auswertung der *In vitro*-Versuche

Zur Auswertung der Ko-Kultur-Versuche musste die Gesamtzahl an CFSE-positiven Zellen, die in einem well enthalten waren, bestimmt werden.

Es werden 4 Großquadrate mit jeweils einem Volumen von 0,1µl ausgezählt. Nach der Formel:

$$\underline{[\text{Mittelwert der 4 Einzelzählungen} \times 10^4 \text{ (=Zellzahl pro ml)}] \times \text{Volumen[ml]}}$$

kann die Gesamtzellzahl pro well berechnet werden. Die Zellzahl für die jeweiligen Lymphozyten ohne Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen wurde als 100% gesetzt. Die Zellzahlen in Ko-Kultur wurden dann in Relation zu diesem Referenzwert berechnet.

3.6.3. Auswertung der Tierversuche

Zur Auswertung der Tierversuche stellte der histologische Score den wichtigsten Parameter dar. Aus den Werten für jeweils eine Versuchsgruppe wurde der Mittelwert für diese Versuchsgruppe berechnet.

Zusätzlich wurde aus den gemessenen Gewichtsdaten eine Gewichtskurve erstellt, die den Verlauf während der Versuchsdauer darstellt. Es wurde dabei nicht das absolute

Gewicht in Gramm verwendet, sondern das relative Gewicht in Prozent des Anfangsgewichts. Dieser Wert wurde verwendet, da nicht das absolute Gewicht dargestellt werden sollte, sondern die Gewichtsveränderung. Auch hier wurden für die jeweiligen Gruppen die Mittelwerte gebildet. Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der Gruppen zu Versuchsende verglichen. Gegebenenfalls wurde überprüft zu welchem Zeitpunkt sich zuerst ein signifikanter Unterschied im Tiergewicht zeigte.

3.6.4. Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden das Computerprogramm Sigma, sowie das Statistik-Programm GraphPad QuickCalcs verwendet. Die statistische Überprüfung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test bzw. T-Test. Als „signifikant“ wird ein Ergebnis bezeichnet wenn der p-Wert $\leq 0,05$ ist. In Grafiken werden die Ergebnisse, wenn nicht anders erwähnt, als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Der SEM-Wert entspricht der Standardabweichung dividiert durch die Wurzel aus n.

4. ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, einen Ansatz zur Therapie von CED zu finden. Bei CED kommt es zu einer überschießenden Immunreaktion auf bakterielle Antigene im Darm, die vom Immunsystem eines Gesunden toleriert werden. Eine vielversprechende Möglichkeit, diese Immunreaktion zu kontrollieren, stellen regulatorisch wirksame Zellen dar. Eine Population, die dieses Potential besitzt, sind NKT-Zellen.

Zur Überprüfung der therapeutischen Wirkung von NKT-Zellen in einem Kolitis-Modell wurden vier Hauptpunkte untersucht (siehe auch Abb. 13). In einem ersten Schritt wurde eine Methode zur Isolierung von NKT-Zellen aus der Milz von Balb/c-Mäusen mit Hilfe der Marker DX5 und CD3 etabliert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch charakterisiert und deren Wirkung auf kolitis-verursachende Zellen *in vitro* untersucht. Im nächsten Schritt wurde das Th1-vermittelte Modell der CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis etabliert, um die Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen *in vivo* zu untersuchen. Zusätzlich wurde überprüft, ob co-stimulatorische Moleküle wie CD40, CD154 oder PD-L1 wichtig für die Funktion der DX5⁺ NKT-Zellen sind.

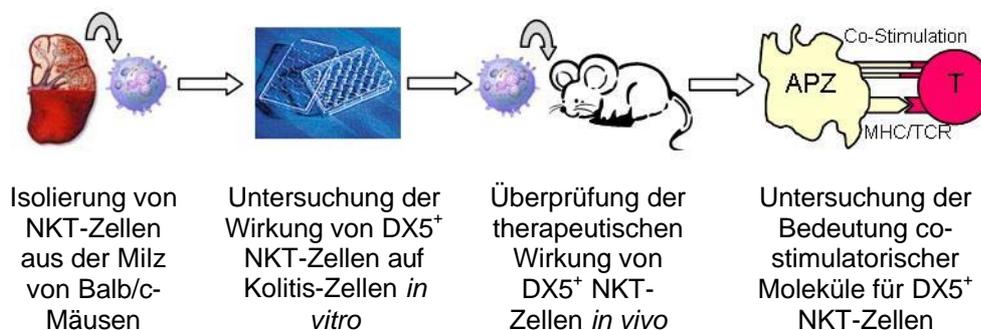


Abbildung 13: Experimentelle Ziele zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von NKT-Zellen

- 4.1. Zellisolierung durch magnetische Markierung
- 4.1.1. Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen aus murinem Gewebe (Milz) mittels „Magnetic activated cell sorting“ (MACS) etabliert. Es wurde die Isolierung von NKT-Zellen aus der Milz gewählt, da dieses Organ erwiesenermaßen NKT-Zellen enthält. Darüber hinaus kann aus der Milz- im Unterschied zu anderen NKT-Zellen-enthaltenden Organen wie der Leber- ohne aufwändige Vorbehandlung eine Einzelzellsuspension aus Leukozyten hergestellt werden. Die verwendeten CED-Modelle werden mit Balb/c- bzw. C.B17-SCID-Mäusen durchgeführt. In der Literatur wird meist der $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor (Teil des CD3-Komplexes aus $\alpha\beta$ TCR und den CD3-Untereinheiten γ , δ , ϵ und ξ ; Marker für T-Zellen) in Kombination mit NK1.1 (Marker für NK-Zellen) als Marker für NKT-Zellen beschrieben. NK1.1 wird von den im Versuch verwendeten Balb/c-Mäusen aber nicht exprimiert und ist deshalb zur Isolierung von NKT-Zellen aus Gewebe von Balb/c-Mäusen nicht geeignet [46; 51]. Es wurde daher der NK-Zellmarker CD49b/PanNK (Klon: DX5) in Kombination mit dem T-Zell-Marker CD3 verwendet. Es wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, dass mit dieser Marker-Kombination NKT-Zellen detektiert werden können [49; 64; 84; 130]. Da es keinen Marker gibt, der ausschließlich von NKT-Zellen exprimiert wird, muss die Isolierung der Zellen in zwei Schritten erfolgen. Denkbar zur Isolierung von NKT-Zellen wären dabei zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit besteht in einer Positivselektion von NK-Zellen und einer anschließenden Positivselektion von T-Zellen. Hier ist es allerdings nötig vor der zweiten Sortierung, die MagnetBeads aus Schritt eins von den Zellen abzulösen. Dies bedeutet zusätzliche Waschschriffe verbunden mit Zellverlust und eine geringere Reinheit, da das Ablösen der MagnetBeads nicht zu 100% effektiv ist. Möglichkeit zwei ist eine Negativselektion von T-Zellen in Schritt eins und eine Positivselektion von NKT-Zellen aus der Population der T-Zellen in Schritt zwei. Diese Methode wurde zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen gewählt, da hier sowohl mit einer höheren Ausbeute als auch einer besseren Reinheit als bei der erstgenannten Methode zu rechnen ist.

In Voruntersuchungen am Durchflusszytometer wurde der Anteil einzelner Leukozytenpopulationen an der Gesamtzellzahl der Splenozyten analysiert. 45% bis 55% der in der Milz enthaltenen Leukozyten waren CD45R/B220⁺ B-Zellen. CD11b⁺ Monozyten stellten weitere 5% bis 10%. Die gleiche Zahl ergab sich für Ly6G⁺ Granulozyten und CD11c⁺ Dendritische Zellen. Es zeigte sich, dass durch die hypotone

Lyse nicht alle Erythrozyten zerstört wurden, so dass in der analysierten Population noch bis zu 10% TER-119⁺ Erythrozyten enthalten waren. 25% bis 35% der Splenozyten waren CD3⁺ T-Zellen. Von diesen waren 0,5% bis 1,5% DX5⁺ T-Zellen.

Zur Markierung und anschließenden magnetischen Sortierung von B-Zellen (mit anti-CD45R/B220) und Granulozyten (mit anti-Ly6G) erwies sich eine Antikörpermenge von jeweils 0,225µg pro 1×10^6 Zellen als optimal. Zur Markierung von Monozyten (mit anti-CD11b) bzw. Erythrozyten (mit anti-Ter-119) war dagegen eine geringere Antikörpermenge von 0,175µg pro 1×10^6 Zellen ausreichend. Zur Markierung von Dendritischen Zellen konnten kommerziell erhältliche anti-CD11c MicroBeads in einer Menge von 0,25µl pro 1×10^6 Zellen eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mehr als 15 Isolierungen von DX5⁺ NKT-Zellen durchgeführt. Nach dem ersten Sortierungsschritt (Negativselektion von T-Zellen) konnten aus einer Milz 30x bis 40x 10^6 Zellen erhalten werden. In der FACS-Analyse ergab sich eine Reinheit für CD3⁺ T-Zellen von 75-98%. In dieser Population waren 10-15% DX5⁺ NKT-Zellen enthalten. Nach der Positivselektion mit DX5-MicroBeads ergab sich für die gewonnenen DX5⁺ NKT-Zellen eine Reinheit von 86-94% (siehe auch Abb. 14). Dabei musste das 1,75fache der Menge an DX5-MicroBeads verwendet werden, die vom Hersteller angegeben wird. Dies kann durch die Ergebnisse der FACS-Analyse erklärt werden. Es zeigte sich bei DX5⁺ NKT-Zellen im Vergleich zu konventionellen NK-Zellen, für die diese MicroBeads ursprünglich konzipiert wurden, eine geringere Expression von DX5. Aus einer Milz konnten bis zu 1×10^6 DX5⁺ NKT-Zellen gewonnen werden.

Für CD8⁺ Kontrollzellen ergab sich eine Reinheit von 76% bis 85%. Es waren auch einige DX5⁺ Zellen enthalten (= NK-Zellen), die aber aufgrund der geringen Anzahl nicht ins Gewicht fielen.

Versuche zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen aus der Leber zeigten keine vergleichbar guten Ergebnisse. Nach Perfusion der Leber mit Collagenase D *in vivo* oder *in vitro* und anschließender Percoll-Aufreinigung konnte nur eine Zahl von 0,5 bis $0,8 \times 10^6$ T-Zellen gewonnen werden. Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt waren bis zu $0,4 \times 10^6$ DX5⁺ NKT-Zellen enthalten, die allerdings eine sehr geringe Reinheit von maximal 41% aufwiesen. Aufgrund dieser technischen Probleme wurde die Methode zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen aus der Leber nicht weiter verwendet.

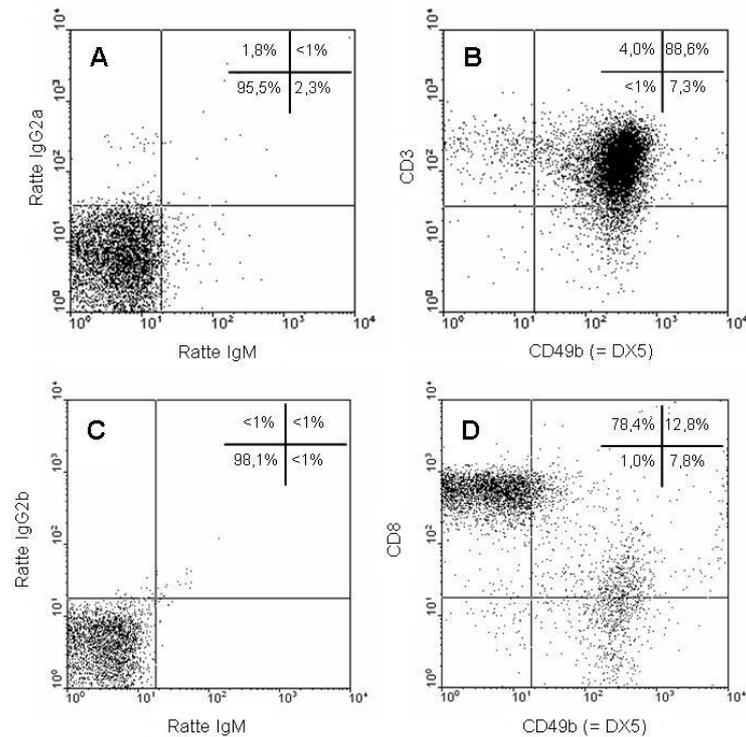


Abbildung 14: Repräsentative FACS-Analyse von DX5⁺ NKT-Zellen und CD8⁺ Zellen nach Sortierung: A) Isotypkontrolle für DX5⁺ NKT-Zellen; B) Färbung für CD3 und DX5 (CD49b) auf DX5⁺ NKT-Zellen: 88,6% der Zellen liegen im rechten oberen Quadranten und sind somit doppel-positiv für CD3 und DX5; C) Isotypkontrolle für CD8⁺ Zellen; B) Färbung für CD8 und DX5 (CD49b) auf CD8⁺ Zellen: 78,4% der Zellen sind CD8⁺ und CD49b⁻ (DX5⁻); es sind knapp 20% NK-Zellen enthalten, die an der Grenze zwischen unterem und oberem rechten Quadranten zu sehen sind.

4.1.2. Isolierung von CD62L⁺CD4⁺ Zellen

Für das CD62L⁺CD4⁺ Tiermodell musste die Sortierung von naiven T-Helfer-Zellen etabliert werden. Die Aufreinigung erfolgte aus der Milz gesunder Spendertiere in zwei Schritten. Schritt eins ist eine Negativselektion von CD4⁺ Zellen, Schritt zwei eine Positivselektion von CD62L⁺ Zellen aus der Population der CD4⁺ Zellen. Die FACS-Analyse zeigte, dass sich 10-25% der Lymphozyten aus der Milz in der Fraktion der CD4⁺ Zellen befinden. Dies entspricht etwa 15x bis 25x 10⁶ Zellen. Nach der ersten Sortierung zeigte sich für die CD4⁺ Zellen im FACS eine Reinheit von 75-96%. 25-40% der CD4⁺ Zellen waren CD62L⁺ Zellen. Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt zeigte

sich eine Reinheit von 85-96% für die $CD62L^+CD4^+$ Zellen (siehe auch Abb. 15). $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen setzten sich aus zwei Populationen zusammen. Zwei Drittel der Zellen waren $CD62L^-$. Das restliche Drittel war zwar $CD62L^+$, zeigte aber eine niedrigere Expression von $CD62L$ als die Population der $CD62L^+CD4^+$ Zellen. Dennoch konnten diese Zellen nicht als $CD62L$ „negativ“ bezeichnet werden. Sie wurden daher als $CD62L^{low}CD4^+$ definiert.

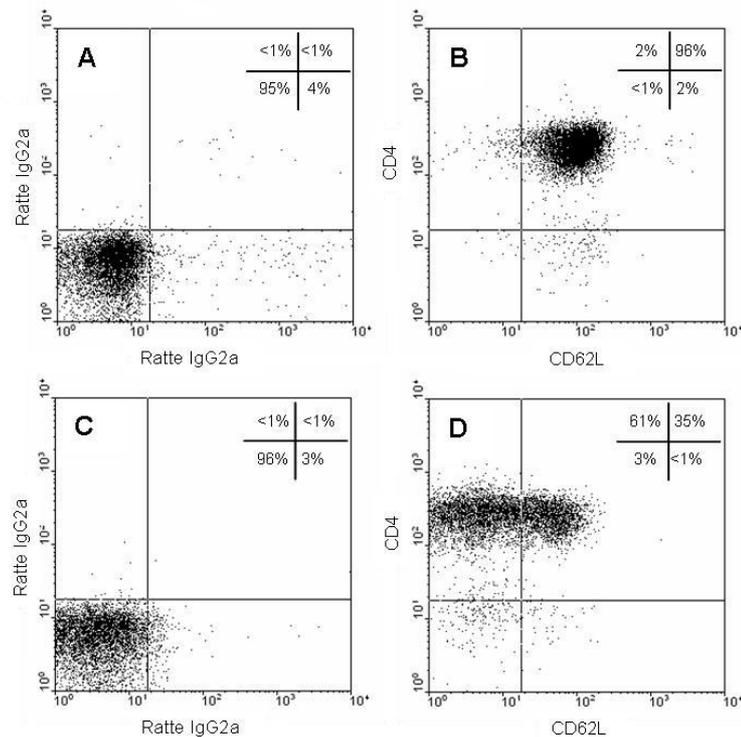


Abbildung 15: Repräsentative FACS-Bilder von $CD4^+$ Zellen nach Sortierung: A) $CD62L^+CD4^+$ Zellen gefärbt mit Isotyp-Antikörper; B) $CD62L^+CD4^+$ Zellen gefärbt für $CD4$ und $CD62L$: die Zellen liegen im rechten oberen Quadranten und sind somit positiv für $CD4$ und gleichzeitig für $CD62L$; C) $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen gefärbt mit Isotyp-Antikörper; D) $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen gefärbt für $CD4$ und $CD62L$: die Zellen im oberen linken Quadranten sind positiv für $CD4$, aber negativ für $CD62L$; die Zellen im rechten oberen Quadranten sind $CD62L^{low}$ und $CD4^+$

4.2. Durchflusszytometrie

4.2.1. Oberflächenmarker auf T-Helfer-Zellen

Sowohl $CD62L^+CD4^+$ Zellen (naive T-Helfer-Zellen) als auch $CD62L^{low}CD4^+$ Kontrollzellen (Memory-T-Helfer-Zellen) wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht (siehe Abb. 16 bis 18 und Tabelle 9; Funktion und Vorkommen der Oberflächenmoleküle siehe Tabelle 4). Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde mindestens fünfmal an frisch isolierten Zellen durchgeführt.

Die statistische Auswertung im FACS zeigte, dass der Marker für T-Helfer-Zellen CD4 auf beiden isolierten Zellpopulationen zu mehr als 90% exprimiert wird (siehe Abb. 16). CD62L (= L-Selektin), ein Molekül aus der Familie der Selektine, wird von $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen zu 27-39% und von $CD62L^+CD4^+$ Zellen zu 88-96% exprimiert. L-Selektin spielt eine wichtige Rolle beim Lymphozytenhoming und wird nach Aktivierung der Zelle von der Oberfläche abgespalten [42; 54]. Das Oberflächenmolekül CD45RB, das wichtig ist für die Signaltransduktion, wird von 67% bis 81% der $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen und mehr als 93% der $CD62L^+CD4^+$ Zellen exprimiert. Entscheidend ist bei diesem Molekül nicht die Expression an sich sondern wie stark diese ist (bezeichnet mit $CD45RB^{high}$ im Gegensatz zu $CD45RB^{low}$). Für T-Helfer-Zellen wird beschrieben, dass die CD45RB-Expression auf naiven Zellen sehr hoch ist, im Lauf der Entwicklung hin zu einem Memory-Phänotyp abnimmt, aber nicht ganz verloren geht [32]. Bei $CD62L^+CD4^+$ Zellen handelt es sich demnach um naive T-Helfer-Zellen, während $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen Memory-T-Helfer-Zellen darstellen.

Das MHC-I-ähnliche Molekül CD1d, das auf der Zelloberfläche Lipide als Antigene präsentieren kann und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von $DX5^+$ NKT-Zellen spielt, wird von 39% bis 65% der $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen und 81% bis 95% der $CD62L^+CD4^+$ Zellen exprimiert. $CD62L^+CD4^+$ besitzen somit ein größeres Potential zur Aktivierung von NKT-Zellen als $CD62L^{low}CD4^+$ Kontrollzellen.

Es wurde auch die Expression co-stimulatorischer Moleküle auf T-Helfer-Zellen untersucht. Ein wichtiges co-stimulatorisches Molekül ist PD-L1. Guleria et al. konnten zeigen, dass PD-L1 wichtige negative Signale für das Immunsystem liefert, um den Fötus im Mutterleib vor einer Abstoßung zu schützen [153]. Interaktionen zwischen PD-L1 und dessen Ligand PD1 führen zu einer Unterdrückung von B- und T-Zell-Antworten

[39]. PD-L1 (=B7H1) wird von $CD62L^{low}CD4^{+}$ Zellen zu 89-95% und von $CD62L^{+}CD4^{+}$ Zellen zu 92-97% exprimiert (siehe auch Abb. 17). PD1, das auf aktivierten Lymphozyten exprimiert wird, ist durchschnittlich auf 69% der $CD62L^{low}CD4^{+}$ Zellen und auf 58% der $CD62L^{+}CD4^{+}$ Zellen zu finden.

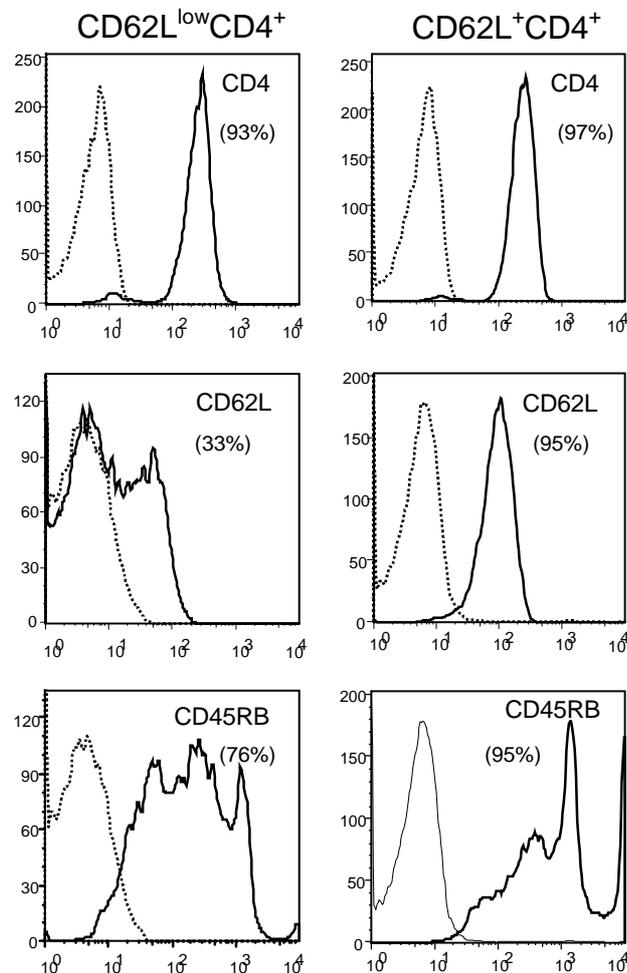


Abbildung 16: Repräsentative Histogramme zur Expression von CD4, CD62L und CD45RB auf $CD62L^{low}CD4^{+}$ und $CD62L^{+}CD4^{+}$ Zellen (durchgezogene Linie= Färbung mit genanntem Antikörper; gestrichelte Linie= Färbung mit Isotyp-Kontroll-Antikörper)

Das ebenfalls co-stimulatorische Molekül CD40 ist auf 45-55% der Memory-T-Helfer-Zellen und auf 79-90% der naiven T-Helfer-Zellen zu finden (siehe auch Abb. 18). Der Ligand von CD40, CD154 (= CD40L), wird von 12% bis 18% der $CD62L^{low}CD4^{+}$ Zellen und von 65% bis 77% der $CD62L^{+}CD4^{+}$ Zellen exprimiert. Interaktionen zwischen CD40 und CD154 spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen, die

ihrerseits CD40 exprimieren. Zusätzlich kann über CD154 die Zytokinproduktion durch Makrophagen und Dendritische Zellen angeregt werden. Als aktivierte T-Zellen, die CD154 exprimieren, haben $CD62L^+CD4^+$ Zellen dieses Potential zur Co-Stimulierung während $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen dies nicht haben.

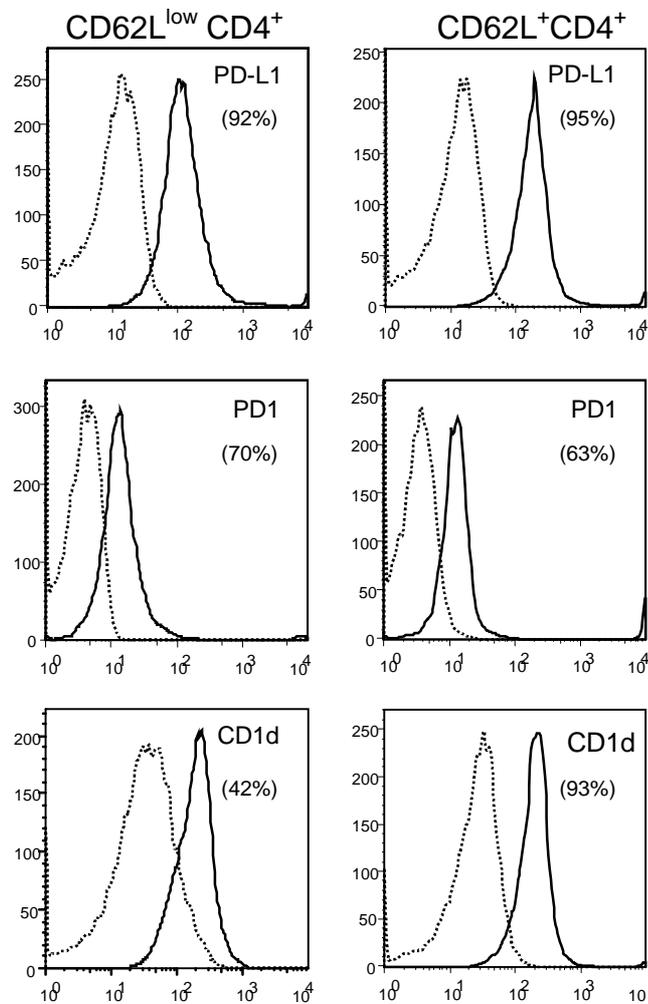


Abbildung 17: Repräsentative Histogramme zur Expression von PD-L1, PD1 und CD1d auf $CD62L^{low}CD4^+$ und $CD62L^+CD4^+$ Zellen (durchgezogene Linie= Färbung mit genanntem Antikörper; gestrichelte Linie= Färbung mit Isotyp-Kontroll-Antikörper)

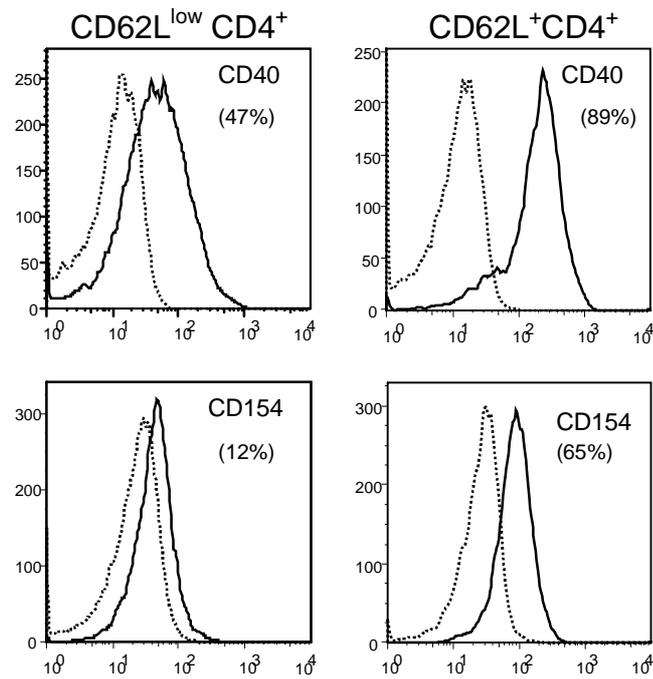


Abbildung 18: Repräsentative Histogramme zur Expression von CD40 und CD154 auf CD62L^{low}CD4⁺ und CD62L⁺CD4⁺ Zellen (durchgezogene Linie= Färbung mit genanntem Antikörper; gestrichelte Linie= Färbung mit Isotyp-Kontroll-Antikörper)

	CD62L ^{low} CD4 ⁺	CD62L ⁺ CD4 ⁺
CD4	92% - 96%	91% - 98%
CD62L	27% - 39%	88% - 96%
CD45RB	67% - 81% (low)	93% - 97% (high)
PD-L1	89% - 95%	92% - 97%
PD1	69% - 71%	53% - 65%
CD1d	39% - 65%	81% - 95%
CD40	45% - 55%	79% - 90%
CD154	12% - 18%	65% - 77%

Tabelle 9: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Expression von Oberflächenmarkern auf T-Helfer-Zellen (n= 3 bis 9)

4.2.2. Oberflächenmarker auf DX5⁺ NKT-Zellen

DX5⁺ NKT-Zellen wurden zur näheren Charakterisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht (siehe Abb. 19 bis 21 und Tabelle 10; Funktion und Vorkommen der Oberflächenmoleküle siehe Tabelle 4). Alle Färbungen wurden mindestens fünfmal an frisch isolierten DX5⁺ NKT-Zellen durchgeführt.

Entsprechend der Definition von DX5⁺ NKT-Zellen werden die Marker CD3 (Marker für T-Zellen) und DX5 (= CD49b; Marker für NK-Zellen) von einem sehr großen Prozentsatz der von uns verwendeten Zellen exprimiert (CD3: 90-96%; DX5: 91-98%; siehe auch Abb. 19). Das Fluoreszenz-Signal von CD3 auf DX5⁺ NKT-Zellen ist etwas niedriger als auf „normalen“ T-Zellen, was zeigt, dass die Dichte von CD3 auf der Oberfläche von DX5⁺ NKT-Zellen, die sich hier in der Fluoreszenz-Intensität zeigt, niedriger ist als auf konventionellen T-Zellen.

Das MHC-I-ähnliche Molekül CD1d, das wie bereits erwähnt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von DX5⁺ NKT-Zellen spielt, wird von 68% bis 85% der frisch isolierten DX5⁺ NKT-Zellen exprimiert. 12% bis 52% der Zellen sind positiv für den Marker CD4, der auf T-Helfer-Zellen vorkommt. Für diesen Marker ergaben sich je nach Isolierung stark schwankende Werte. In 5 von 7 Versuchen lagen diese jedoch über 33%. Auch für CD8, einen Marker für zytotoxische T-Zellen, gab es gewisse Schwankungen in den Werten. In zwei Versuchen waren 10% bzw. 15% CD8⁺ NKT-Zellen enthalten. In fünf weiteren Versuchen ergaben sich aber Werte zwischen 0% und 3%. Wir gehen daher davon aus, dass bei den beiden erstgenannten Versuchen ein technisches Problem vorlag und dass CD8 im Allgemeinen auf den von uns verwendeten DX5⁺ NKT-Zellen nicht vorkommt. Es handelt sich also bei DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz um eine Mischpopulation, die zu zwei Dritteln aus DN NKT-Zellen und zu einem Drittel aus CD4⁺ NKT-Zellen besteht.

CD25, ein Marker für aktivierte und für regulatorische Zellen, wird von DX5⁺ NKT-Zellen nicht exprimiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen in der Literatur für klassische NKT-Zellen. D'Andrea et al. konnten auf zwei Dritteln der neonatalen NKT-Zellen aus humanem Nabelschnurblut CD25 nachweisen, während NKT-Zellen aus dem Blut Erwachsener als CD25 negativ beschrieben werden [140]. Das für die Aktivierung von T-Lymphozyten wichtige CD38 konnte auf 47-57% der DX5⁺ NKT-

Zellen nachgewiesen werden. Es ist ein sehr starkes Fluoreszenzsignal nachweisbar, was auf eine hohe Dichte auf der Zelloberfläche hindeutet. Das co-stimulatorische Molekül CD40 ist auf DX5⁺ NKT-Zellen praktisch nicht zu finden (0% bis 10% positive Zellen). Das Oberflächenmolekül CD45RB, das eine Rolle bei der Signaltransduktion spielt, wird von 82% bis 87% der DX5⁺ NKT-Zellen exprimiert. Laut Literatur wird auf 93% der DN NKT-Zellen der Milz und auf 91% der CD4⁺ NKT-Zellen der Milz CD45RB exprimiert [51]

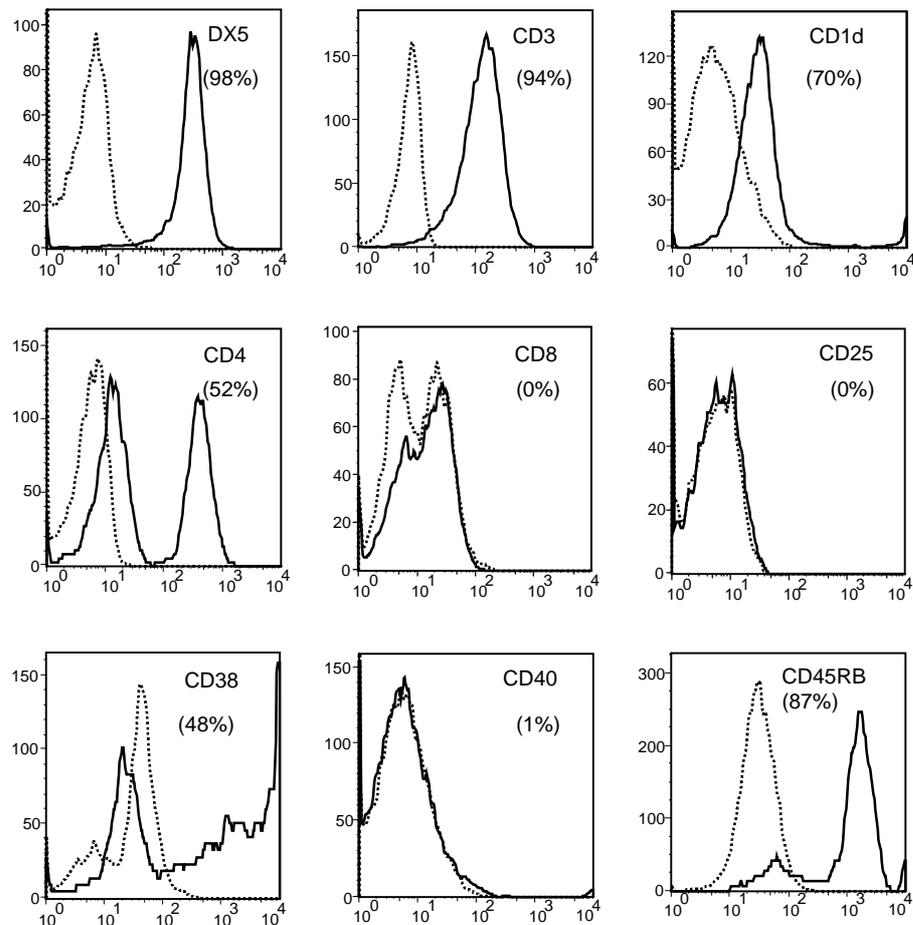


Abbildung 19: Repräsentative Histogramme zur Expression von CD1d, CD3, CD4, CD8, CD25, CD38, CD40, CD45RB und DX5 (CD49b) auf DX5⁺ NKT-Zellen (durchgezogene Linie= Färbung mit genanntem Antikörper; gestrichelte Linie= Färbung mit Isotyp-Kontroll-Antikörper)

CD62L (= L-Selektin) wird von DX5⁺ NKT-Zellen nur zu 5-16% exprimiert (siehe auch Abb. 20). Angaben in der Literatur zu klassischen NKT-Zellen beschreiben diese ebenfalls als Zellen mit einem Effektor-/Memory-Phänotyp, die negativ für CD62L sind [62]. Auf regulatorischen T-Zellen, die bei Kolitis eine Krankheitsverbesserung bewirken, ist häufig das Oberflächenmolekül CD103 zu finden. Dieses kommt auf DX5⁺ NKT-Zellen nicht vor. Das co-stimulatorische Molekül CD154 ist, ähnlich wie dessen Ligand CD40, auf DX5⁺ NKT-Zellen praktisch nicht zu finden (0% bis 12% positive Zellen). PD1, das auf aktivierten Lymphozyten zu finden ist, wird nur von 2-12% der DX5⁺ NKT-Zellen exprimiert. Der Ligand von PD1, PD-L1, wird von DX5⁺ NKT-Zellen im Durchschnitt zu 69% exprimiert. Auch bei der Expression dieses Moleküls durch DX5⁺ NKT-Zellen sind, ähnlich wie bei CD4, große Schwankungen festzustellen (47% bis 72%).

CTLA-4 (=CD152), konnte auf DX5⁺ NKT-Zellen weder intrazellulär noch auf der Zelloberfläche detektiert werden. CTLA-4 ist ein Regulator von Immunantworten und könnte evtl. sogar Toleranz induzieren [57; 76]. In Treg Zellen kann CTLA-4 intrazellulär nachgewiesen werden und stellt somit einen wichtigen Marker für CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften dar.

ICAM-1 (= CD54) konnte auf 78-85% der DX5⁺ NKT-Zellen nachgewiesen werden (siehe auch Abb. 21). Es gehört zur Immunglobulin-Super-Familie und wird nach Stimulierung durch Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine) hochreguliert [107]. LFA-1 (=CD11a), der Ligand von ICAM-1, wird von mehr als 87% der DX5⁺ NKT-Zellen exprimiert. Sowohl das Integrin $\alpha 4\beta 7$ als auch ICAM-1 und LFA-1 spielen eine wichtige Rolle beim Lymphozytenhoming. Das Integrin $\alpha 4\beta 7$, ein Adhäsionsmolekül, wird von DX5⁺ NKT-Zellen kaum exprimiert (5-8%). Mehr als 85% der DX5⁺ NKT-Zellen besitzen einen $\alpha \beta$ T-Zell-Rezeptor wie dies auch für klassische NKT-Zellen aus C57BL/6 – Mäusen beschrieben wird. Die laut Literatur dominierende β -Kette des T-Zell-Rezeptors von klassischen NKT-Zellen (= iNKT-Zellen), $V\beta 8.2$, wird von den nach unserer Methode isolierten Zellen praktisch nicht exprimiert (0-4%). Der TCR von DX5⁺ NKT-Zellen der Milz besitzt demnach eine andere β -Kette. Möglich wäre z.B. die Verwendung von $V\beta 2$ oder $V\beta 8$, die beide auf Subpopulationen klassischer NKT-Zellen nachgewiesen werden konnten [74]. Denkbar wäre auch, dass DX5⁺ NKT-Zellen in ihrem TCR-Repertoire weniger eingeschränkt sind als klassische NKT-Zellen und deshalb verschiedene β -Ketten auf diesen Zellen nachweisbar sind.

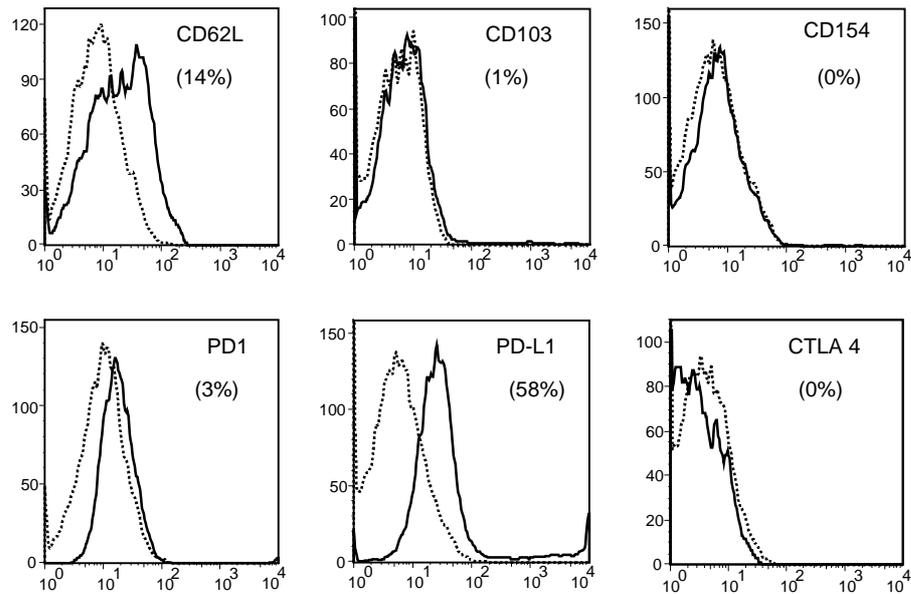


Abbildung 20: Repräsentative Histogramme zur Expression von CD62L, CD103, CD154, PD1, PD-L1 und CTLA-4 auf DX5⁺ NKT-Zellen (durchgezogene Linie= Färbung mit genanntem Antikörper; gestrichelte Linie= Färbung mit Isotyp-Kontroll-Antikörper)

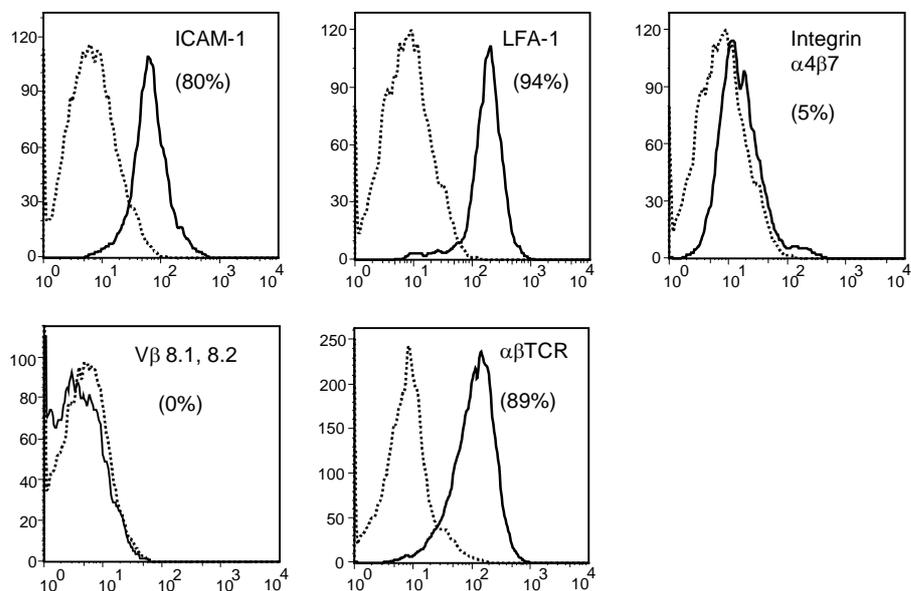


Abbildung 21: Repräsentative Histogramme zur Expression von ICAM-1, LFA-1, Integrin $\alpha 4\beta 7$, V β 8.1, 8.2 und $\alpha\beta$ TCR auf DX5⁺ NKT-Zellen (durchgezogene Linie= Färbung mit genanntem Antikörper; gestrichelte Linie= Färbung mit Isotyp-Kontroll-Antikörper)

	DX5+ NKT-Zellen		DX5+ NKT-Zellen
CD3	90% - 96%	CTLA-4	0% - 5%
DX5	91% - 98%	CD40	0% - 10%
CD4	12% - 52%	CD154	0% - 12%
CD8	0% - 15%	CD62L	5% - 16%
$\alpha\beta$ TCR	85% - 97%	CD45RB	82% - 87%
Vβ8.1,8.2	0% - 4%	CD38	47% - 57%
CD1d	68% - 85%	CD103	0% - 4%
PD-L1	47% - 72%	ICAM-1	78% - 85%
PD1	2% - 12%	LFA-1	87% - 96%
CD25	0% - 3%	Integrin α4β7	5% - 8%

Tabelle 10: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Expression von Oberflächenmarkern auf DX5⁺ NKT-Zellen (n= 5 bis 9)

DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz exprimieren also klassische Marker von NKT-Zellen wie CD3, $\alpha\beta$ TCR und DX5. Sie stellen eine gemischte Population aus DN und CD4⁺ NKT-Zellen dar und sind negativ für CD8. DX5⁺ NKT-Zellen exprimieren Moleküle wie CD1d und PD-L1, die zur Aktivierung und Co-Stimulation der Zellen wichtig sind. Sie zeigen ein Expressionsmuster für CD45RB, CD62L und CD38 wie es in der Literatur auch für NK1.1⁺ NKT-Zellen beschrieben wird [51, 62]. Die von uns verwendeten Zellen exprimieren außerdem Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und ICAM-1, die für die Migration in entzündetes Gewebe wichtig sind. Sie unterscheiden sich von klassischen Treg-Zellen, da sie weder CD25 noch CTLA-4 exprimieren, was ebenfalls mit den Aussagen in der Literatur für klassische NKT-Zellen übereinstimmt [140].

4.3. Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen *in vitro*

4.3.1. Zytokinproduzierende Zellen nach Ko-Kultur

Es wurde die Expression der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN γ durch naive T-Helfer-Zellen nach Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen mittels eines „Cytokine Secretion Assays“ untersucht. Dieser Assay bietet die Möglichkeit, Zytokine zu messen, die ins Medium abgegeben werden und gleichzeitig die Herkunftszelle zu identifizieren. Die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN γ werden u.a. nach Aktivierung von CD4⁺ Zellen gebildet und üben

im Organismus unterschiedliche Funktionen aus. IL-10 wird überwiegend von Th2-Zellen gebildet und inhibiert Makrophagen durch Hemmung der $\text{IFN}\gamma$ -Bildung. IL-4 wird von Th2-Zellen ausgeschüttet und stimuliert die Proliferation von B-Zellen, sowie deren Differenzierung zu Plasmazellen. $\text{IFN}\gamma$ dagegen ist Teil einer Th1-Antwort. Es stimuliert Makrophagen und wirkt dadurch pro-inflammatorisch.

Nach 36h Kultur wurde anhand der FACS-Analyse der Anteil an $\text{CD62L}^+\text{CD4}^+$ Zellen berechnet, die das jeweilige Zytokin sezernierten. $\text{CD62L}^+\text{CD4}^+$ Zellen, die mit DX5^+ NKT-Zellen ko-kultiviert wurden, zeigten bei gleichzeitiger Stimulierung mit IL-2 und LPS eine erhöhte Ausschüttung aller untersuchten Zytokine im Vergleich zu einzeln kultivierten Zellen (siehe auch Abb. 22). Für IL-4 ergab sich im Vergleich der Einzelkultur zur Ko-Kultur eine signifikante Steigerung um den Faktor 2,4 ($p= 0,0034$). Die Produktion von IL-10 steigerte sich um den Faktor 6,7 ($p= 0,0057$). Für $\text{IFN}\gamma$ konnte eine Steigerung um das 11,4fache gezeigt werden ($p= 0,0333$; Ergebnisse aus 5 unabhängigen Versuchen).

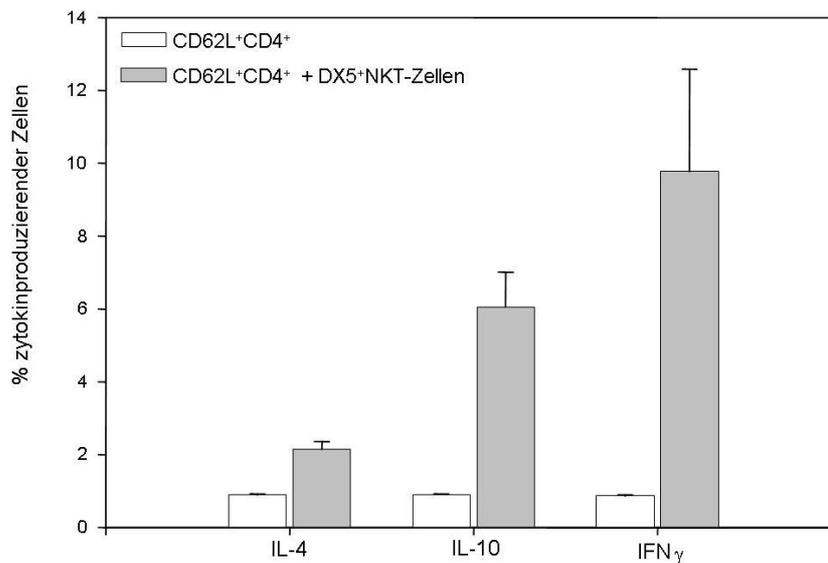


Abbildung 22: Prozentualer Anteil zytokinproduzierender $\text{CD62L}^+\text{CD4}^+$ Zellen in der Gesamtpopulation nach 36h Kultur mit oder ohne DX5^+ NKT-Zellen: im Vergleich zu $\text{CD62L}^+\text{CD4}^+$ Zellen alleine zeigten Zellen, die mit DX5^+ NKT-Zellen ko-kultiviert wurden, eine deutliche Steigerung der Zytokin-Produktion. Dies konnte sowohl für die mit einer Th2-Antwort assoziierten Zytokine IL-4 und IL-10 als auch für das Th1-assoziierte $\text{IFN}\gamma$ festgestellt werden. (Mittelwerte + SEM)

4.3.2. Effekt in Ko-Kultur mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen

In diesen Versuchen wurde der Effekt von DX5⁺ NKT-Zellen auf kolitis-verursachende CD62L⁺CD4⁺ Zellen aus gesunden Mäusen *in vitro* untersucht. In Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen verringert sich die Zahl an kolitis-verursachenden CD62L⁺CD4⁺ Zellen statistisch signifikant auf 46,9% (\pm 3,0%) im Vergleich zur Kultur ohne DX5⁺ NKT-Zellen, deren Wert auf 100% gesetzt wird ($p < 0,0001$, $n = 7$ Versuche; siehe auch Abb. 23). Die Zahl an nicht-kolitis-verursachenden CD62L^{low}CD4⁺ Zellen verminderte sich im Vergleich zur Kontrolle zwar ebenfalls, aber in geringerem Ausmaß- und nicht statistisch signifikant- auf 89,6% (\pm 4,6%; $p = 0,0664$, $n = 7$). Durch Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen wurden CD62L⁺CD4⁺ Zellen stärker verringert als CD62L^{low}CD4⁺ Zellen (46,9% versus 89,6%; $p < 0,0001$, $n = 7$).

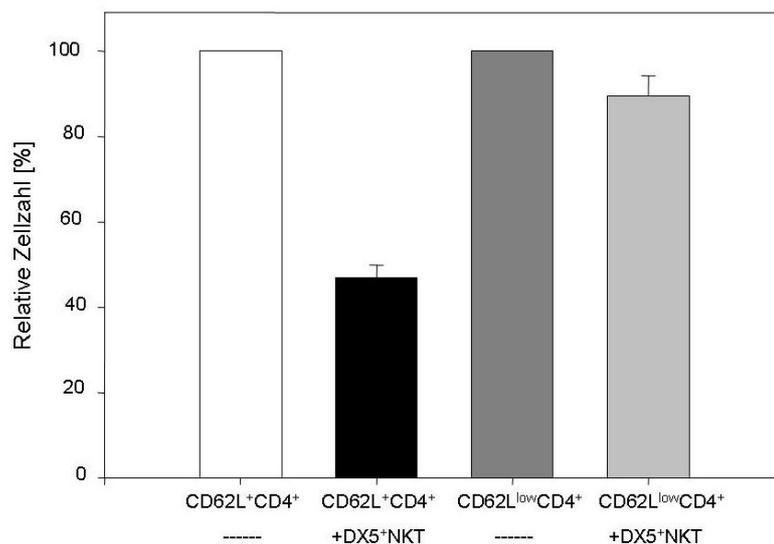


Abbildung 23: Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen: durch Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen wird die Zahl an kolitis-verursachenden CD62L⁺CD4⁺ Zellen signifikant gegenüber der Kontrolle verringert. Die Zahl an nicht-kolitis-verursachenden CD62L^{low}CD4⁺ Zellen wird gegenüber der Kontrolle ohne DX5⁺ NKT-Zellen in Ko-Kultur nicht statistisch signifikant verringert. Im Vergleich wird die Zahl an CD62L⁺CD4⁺ Zellen stärker verringert als die Zahl der CD62L^{low}CD4⁺ Zellen (Mittelwert + SEM; $n = 7$ Versuche)

Bei Verwendung eines Transwell-Einsatzes, der den Austausch löslicher Stoffe erlaubt, aber direkten Zell-Zell-Kontakt verhindert, blieben nach Ko-Kultur durchschnittlich 95,5% ($\pm 4,2\%$) der CD62L⁺CD4⁺ Zellen erhalten (siehe auch Abb. 24). Dies bedeutete keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ohne DX5⁺ NKT-Zellen, die als Referenzwert verwendet wurde ($p= 0,344$; $n= 3$). Im Vergleich zur Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen ohne Transwell-Einsatz ergab sich eine signifikante Erhöhung der Zellzahl ($45,7\% \pm 2,7\%$; $p < 0,001$; $n= 3$).

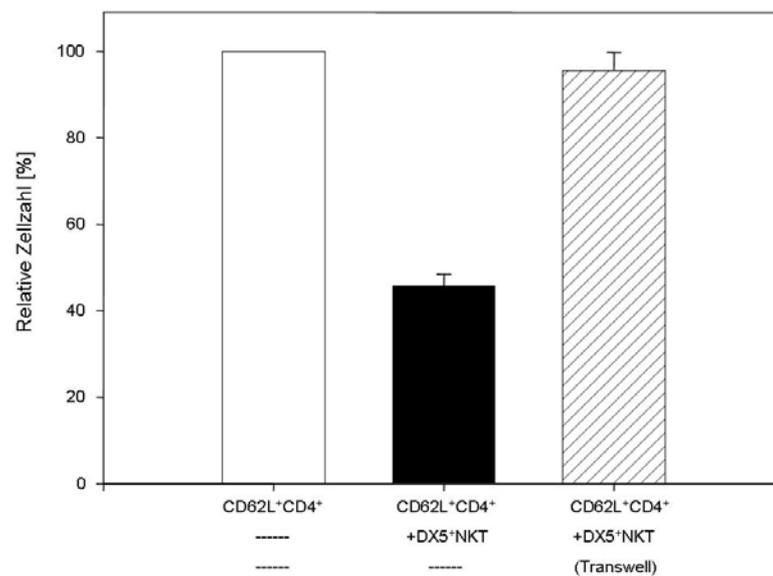


Abbildung 24: Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Inkubierung ohne Zell-Zell-Kontakt: bei Verwendung eines Transwell-Einsatzes, der direkten Zellkontakt verhindert, erhöhte sich die Zellzahl signifikant im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle ohne räumliche Trennung (Mittelwert + SEM; $n= 3$ Versuche)

Um zu untersuchen, ob die Verringerung der Zellzahl durch Apoptose-Induzierung zustande kommt, wurde ein Caspase-Inhibitor (= Z-VAD-FMK) zur Zellkultur zugegeben. Caspasen sind ein wichtiger Vermittler der Apoptose und werden z.B. durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder zytotoxische Lymphozyten angeregt. Sie bewirken in einer kaskaden-artigen Reaktion die Aktivierung von DNasen, die dann die genomische DNA zerschneiden. Der Inhibitor Z-VAD-FMK bindet irreversibel und hemmt die komplette Caspasen-Kaskade. Hier erhöhte sich die Zellzahl durch Zugabe des Caspase-Inhibitors wieder auf 63,8% ($\pm 5,2\%$; siehe auch Abb. 25). Zwischen den Zahlen für die Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen ($42,9\% \pm 5,6\%$) und für die Ko-Kultur mit

Zugabe des Caspase-Inhibitors ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p= 0,0340$; $n= 4$). Im Vergleich zur Ko-Kultur unter Zugabe eines Kontroll-Moleküls ohne inhibitorische Eigenschaften (=Z-FA-FMK) ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($63,8\% \pm 5,2\%$ vs. $45,7\% \pm 2,8\%$; $p= 0,0221$). Es konnte aber durch Zugabe des Caspase-Inhibitors keine Erhöhung der Zellzahl auf 100% erreicht werden. $DX5^+$ NKT-Zellen töten demnach $CD62L^+CD4^+$ Zellen unter anderem durch Apoptose-Induzierung, verfügen daneben aber offensichtlich noch über weitere Möglichkeiten, Zielzellen zu töten.

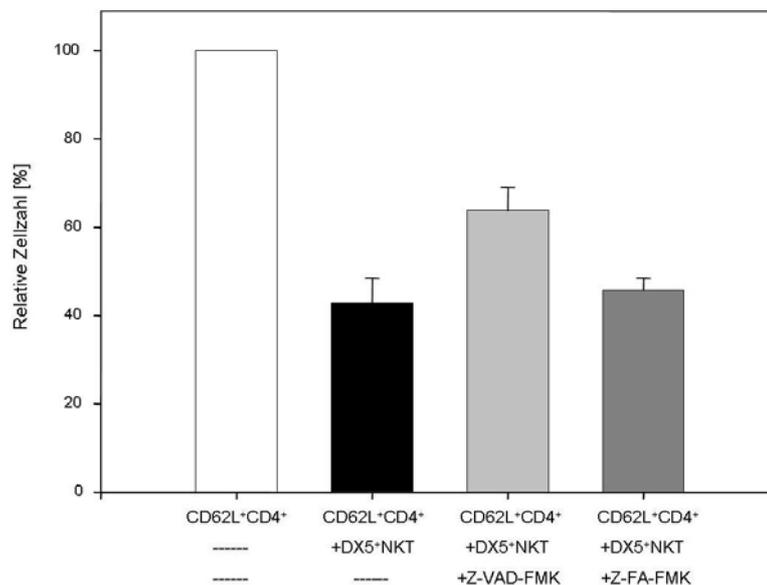


Abbildung 25: Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Zugabe eines irreversiblen Caspase-Inhibitors bzw. eines nicht-inhibierenden Kontroll-Moleküls: durch Zugabe des Caspase-Inhibitors wird die Zellzahl statistisch signifikant im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle gesteigert. Die nicht-inhibierende Kontrollsubstanz zeigte keine Wirkung und unterschied sich nicht von der Ko-Kultur-Kontrolle (Mittelwert + SEM; $n= 4$ Versuche)

Es wurde untersucht, ob der Effekt der $DX5^+$ NKT-Zellen in Ko-Kultur durch Antikörper blockiert werden kann (siehe auch Abb. 26). Ein Zielmolekül war dabei CD1d, das sowohl von $CD62L^+CD4^+$ Zellen als auch von $DX5^+$ NKT-Zellen exprimiert wird und wichtig für die Aktivierung von NKT-Zellen ist. Ein weiterer Marker, der eine Rolle spielen könnte, ist PD-L1 (= B7H1), das ebenfalls von beiden Zelltypen exprimiert wird, co-stimulatorisch wirkt und T-Zell-Antworten negativ reguliert [25; 39].

Durch Blockierung von CD1d mittels eines Antikörpers konnte die Zellzahl nach Ko-Kultur auf 75,3% ($\pm 5,2\%$) erhöht werden (vs. 47,5% $\pm 3,9\%$ für Zellen in Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen; $p= 0,0129$; $n=3$). Ein Isotyp-Kontrollantikörper zeigte mit 55,6% $\pm 8,3\%$ keinen signifikanten Unterschied zur Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen ($p > 0,05$). Aufgrund einer geringen unspezifischen Wirkung des Isotyp-Antikörpers konnte zwischen diesem und dem CD1d-Antikörper kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p= 0,1146$). Diese Wirkung Isotyp-Antikörpers wird vermutlich durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an Fc-Rezeptoren verursacht, die auf der Oberfläche von NKT-Zellen zu finden sind [154].

Die Blockierung von PD-L1 hatte einen starken Effekt auf die Zellen in Ko-Kultur und erhöhte die Zahl der CFSE-Zellen nach 4 Tagen im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle signifikant auf 92,5% ($\pm 5,5\%$ vs. 47,5% $\pm 3,9\%$ bei Zellen in Ko-Kultur; $p= 0,0026$; $n= 3$). Durch die Zugabe des PD-L1-Antikörpers konnte eine Erhöhung der Zellzahl nach Ko-Kultur erreicht werden, die sich von der Kontrolle ohne DX5⁺ NKT-Zellen nicht signifikant unterschied ($p > 0,05$). Ein entsprechender Isotypantikörper zeigte mit einer Erhöhung der Zellzahl auf 60% ($\pm 2,0\%$) einen unspezifischen Effekt, der sich sowohl von der Kontrolle ($p= 0,0463$), als auch vom blockierenden Antikörper signifikant unterschied ($p= 0,0051$).

Yang et al. beschreiben, dass klassische NKT-Zellen aus der Milz im Gegensatz zu NKT-Zellen aus dem Thymus ein aktivierendes Signal über CD40/CD154 brauchen, um zur Zytokin-Produktion stimuliert zu werden [130]. Da auch für DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz eine Abhängigkeit von der Aktivierung über CD40/CD154 wahrscheinlich ist, untersuchten wir zusätzlich die Wirkung blockierender Antikörper gegen CD40 und CD154 (CD40L). Der Antikörper gegen CD154 hatte ebenso einen signifikanten Effekt (73,3% $\pm 1,7\%$ mit CD154-Antikörper vs. 49,3% $\pm 5,0\%$ Ko-Kultur-Kontrolle; $p= 0,0039$; $n= 4$), wie die Blockierung von CD40 (75,6% $\pm 3,3\%$ mit anti-CD40 vs. 49,3% $\pm 5,0\%$ ohne Antikörper; $p= 0,0046$; $n=4$). Der CD40-Isotyp-Antikörper zeigte mit einer Zellzahl von 43,3% ($\pm 8,2\%$) keinen Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$), aber einen signifikanten Unterschied zum blockierenden Antikörper ($p= 0,0107$). Der Isotyp-Kontroll-Antikörper für CD154 zeigte einen geringen unspezifischen Effekt, der sich zwar nicht von der Ko-Kultur-Kontrolle unterschied ($p > 0,05$), aber auch nicht von der Ko-Kultur mit anti-CD154 ($p= 0,0802$) (siehe Abb. 27).

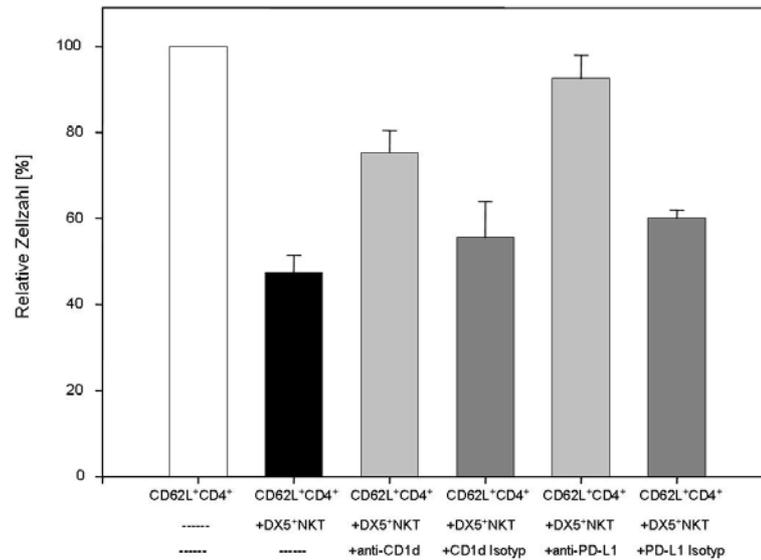


Abbildung 26: Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD1d bzw. PD-L1: sowohl die Zugabe eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d als auch gegen PD-L1 erhöhte die Zellzahl nach Ko-Kultur statistisch signifikant im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle. (Mittelwert + SEM; n= 3 Versuche)

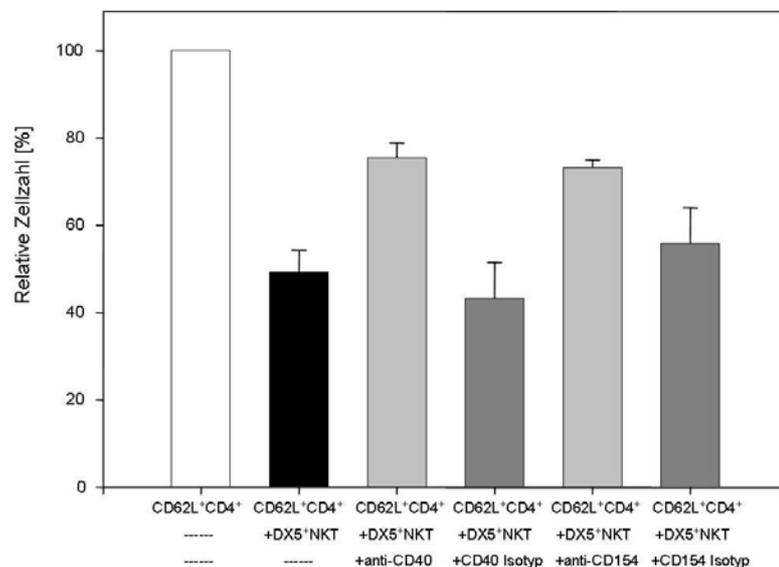


Abbildung 27: Zellzahlen nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD40 und CD154: die Blockierung von CD40 bzw. CD154 bewirkte eine signifikante Steigerung der Zellzahl nach Ko-Kultur im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle. (Mittelwert + SEM; n= 4 Versuche)

DX5⁺ NKT-Zellen verringerten in Ko-Kultur signifikant die Zahl an kolitis-induzierenden CD62L⁺CD4⁺ Zellen, während die Zahl an nicht-kolitis-induzierenden CD62L^{low}CD4⁺ Zellen in Ko-Kultur kaum verringert wurde. Dieser Prozess war zellkontaktabhängig und wurde zumindest teilweise über Caspasen vermittelt. Er war außerdem abhängig von CD1d, das für die Aktivierung von NKT-zellen wichtig ist und von den co-stimulatorischen Molekülen PD-L1, CD40 und CD154.

4.3.3. Effekt in Ko-Kultur mit Lymphozyten aus Tieren mit DSS-Kolitis

Bei Ko-Kultur von DX5⁺ NKT-Zellen mit Lymphozyten aus Tieren mit DSS-Kolitis zeigten sich ähnliche Effekte wie in 4.3.2. beschrieben (siehe auch Abb. 28). Die Zahl an DSS-Lymphozyten wurde durch Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit Lymphozyten alleine (=100%) signifikant auf 51,2% (\pm 9,2%) verringert ($p= 0,0037$; $n= 4$). Die Zahl an Lymphozyten aus gesunden Tieren wurde auf 79,1% (\pm 5,0%) im Vergleich zur Kontrolle mit Lymphozyten aus gesunden Tieren alleine verringert, was zwar eine starke Tendenz, aber keinen signifikanten Unterschied darstellte ($p= 0,0536$; $n= 4$). Die Anzahl der Lymphozyten aus DSS-Tieren wurde im Vergleich zu Lymphozyten aus gesunden Tieren signifikant vermindert ($p= 0,0335$; $n= 4$).

Wurde der Zell-Zell-Kontakt durch Verwendung eines Transwell-Einsatzes verhindert, blieben 90,6% (\pm 4,9%) der Lymphozyten aus DSS-Tieren nach Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen erhalten (siehe auch Abb. 29). Dies war kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit DSS-Zellen alleine ($p= 0,1291$; $n= 3$). Gegenüber der Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen ohne räumliche Trennung mit 56,7% \pm 9,1% bedeutete dies einen signifikanten Unterschied ($p= 0,0398$).

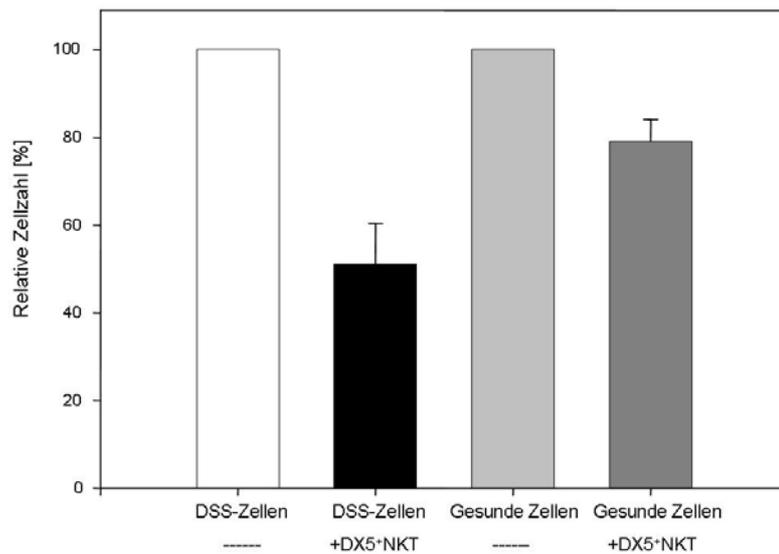


Abbildung 28: Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen: die Zahl der Lymphozyten aus Tieren mit DSS-Kolitis wurde durch Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne DX5⁺ NKT-Zellen und zur Ko-Kultur von DX5⁺ NKT-Zellen mit Lymphozyten aus gesunden Kontrolltieren signifikant verringert. (Mittelwert + SEM; n= 4 Versuche)

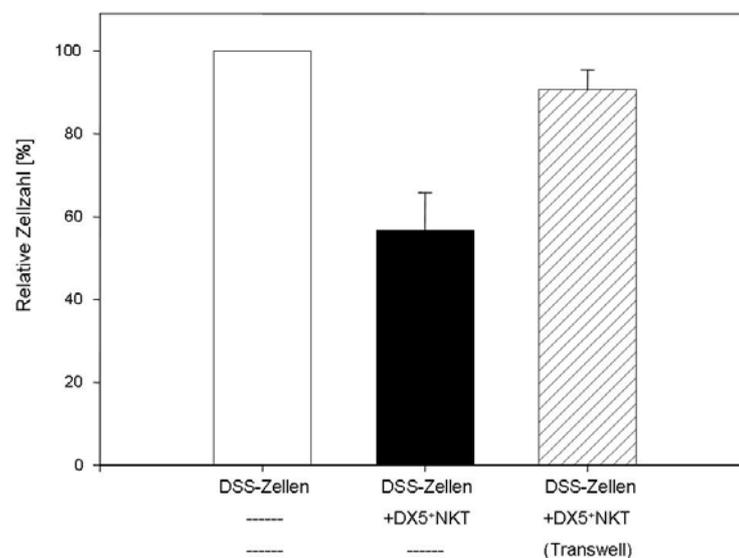


Abbildung 29: Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Inkubierung ohne Zell-Zell-Kontakt: bei Verwendung eines Transwell-Einsatzes, der direkten Zellkontakt verhindert, erhöhte sich die Zahl der DSS-Lymphozyten im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle statistisch signifikant (Mittelwert + SEM; n= 3 Versuche)

In der Ko-Kultur mit DSS-Lymphozyten konnte der Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen durch den Casapase-Inhibitor nicht verhindert werden. Die Zellzahl erhöhte sich zwar auf durchschnittlich 70,9% (\pm 4,2%), aber es ergab sich kein signifikanter Unterschied zur Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen, für die der Wert 55,4% \pm 11,6% betrug ($p= 0,3021$; $n= 3$; siehe auch Abb. 30). Auch zur Ko-Kultur mit dem Kontroll-Inhibitor, die einen Wert von 59,3% \pm 5,6% ergab, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p= 0,2537$). Offensichtlich ist bei Ko-Kultur mit einer gemischten Population aktivierter mononukleärer Zellen aus Tieren mit DSS-Kolitis der Weg der Apoptose-Induzierung über Caspasen weniger wichtig als bei den Versuchen mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen aus gesunden Tieren. Hier könnte möglicherweise der Weg über Perforin eine größere Rolle spielen.

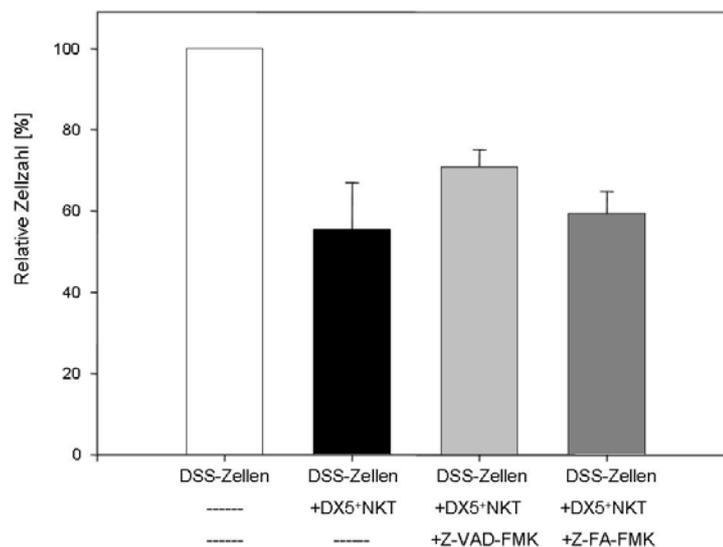


Abbildung 30: Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Zugabe eines Caspase-Inhibitors: durch Zugabe des Caspase-Inhibitors konnte im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle kein statistisch signifikanter Unterschied erreicht werden (Mittelwert + SEM; $n= 3$ Versuche)

Die Blockierung von CD1d mittels eines Antikörpers erhöhte die Zellzahl nach Ko-Kultur auf 78,0% (\pm 7,3%). Dies war eine starke Tendenz, aber kein statistisch signifikanter Unterschied zur Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen mit durchschnittlich 51,2% \pm 9,2% ($p= 0,0631$; $n= 4$; siehe auch Abb. 31). Der Isotyp-Kontrollantikörper zeigte einen minimalen unspezifischen Effekt und erhöhte die Zellzahl auf 59,2% (\pm 9,1%), was aber keinen signifikanten Unterschied zur Ko-Kultur-Kontrolle darstellte ($p= 0,5591$).

Aufgrund dieser unspezifischen Wirkung des Isotyp-Antikörpers konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zum blockierenden Antikörper festgestellt werden ($p=0,1582$).

Die Blockierung von PD-L1 dagegen erhöhte die Zellzahl im Vergleich zur Verwendung eines Isotyp-Antikörpers nach Ko-Kultur signifikant von 65,7% ($\pm 1,3\%$) auf 84,3% ($\pm 1,3$; $p < 0,0001$; $n = 4$). Auch gegenüber der Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen mit einem Wert von 51,2% $\pm 9,2\%$ ergab sich bei Verwendung eines Antikörpers gegen PD-L1 ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0253$; $n = 4$). Der Wert für den Isotyp-Kontroll-Antikörper unterschied sich nicht statistisch signifikant von der ko-Kultur-Kontrolle ($p = 0,1696$).

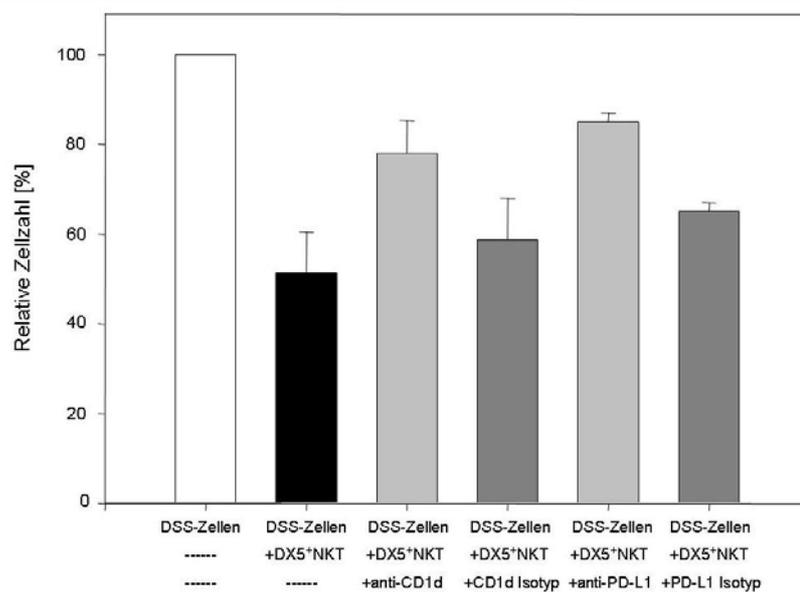


Abbildung 31: Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD1d und PD-L1: die Blockierung von CD1d erhöhte zwar die Zellzahl im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle, zeigte aber keinen statistisch signifikanten Unterschied. Durch Blockierung von PD-L1 konnte die Zellzahl im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle signifikant erhöht werden (Mittelwert + SEM; $n = 4$ Versuche)

Die Blockierung von CD40 bewirkte eine Erhöhung der Zellzahl auf 82,3% ($\pm 2,9\%$), was im Vergleich zum verwendeten Isotyp-Antikörper mit 53,6% ($\pm 6,9\%$) einen signifikanten Unterschied darstellt ($p = 0,0190$; $n = 3$; siehe auch Abb. 32). Im Vergleich zur Ko-Kultur-Kontrolle bewirkte die Blockierung von CD40 ebenfalls eine statistisch

signifikante Steigerung der Zellzahl von auf 82,3% ($\pm 2,9\%$) auf 46,0% $\pm 10,7\%$ ($p=0,0304$; $n=3$).

Der Antikörper gegen CD154 erhöhte die Zellzahl auf 76,5% ($\pm 4,9\%$) im Vergleich zu 52,5% $\pm 4,9\%$ bei Verwendung eines Isotyp-Antikörpers ($p=0,0259$; $n=3$).

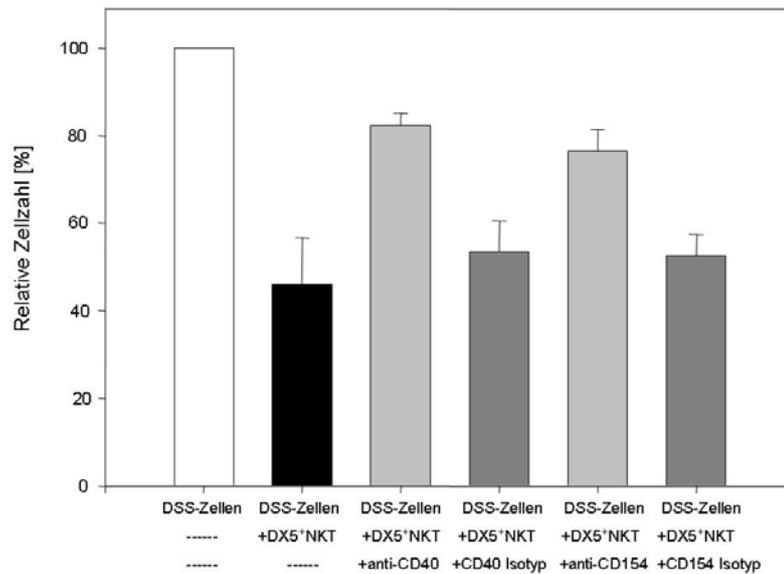


Abbildung 32: Lymphozytenzahl nach 4 Tagen Ko-Kultur bei Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen CD40 und CD154: sowohl die Blockierung von CD40 als auch von CD154 bewirkte eine statistisch signifikante Erhöhung der Zellzahl nach Ko-Kultur im Vergleich zum Isotyp-Antikörper (Mittelwert + SEM; $n=3$ Versuche)

Insgesamt zeigten sich für Lymphozyten aus Tieren mit DSS-Kolitis ähnliche Effekte in Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen wie bei CD62L⁺CD4⁺ Zellen aus gesunden Tieren. Es erwies sich aber bei diesen sehr stark voraktivierten Zellen als schwerer, die durch die DX5⁺ NKT-Zellen vermittelten Effekte zu blockieren. Die Verringerung der Zellzahl war bei Zellen aus Tieren mit DSS-Kolitis ebenfalls abhängig von den co-stimulatorischen Molekülen CD40, CD154 und PD-L1, sowie von der Aktivierung über CD1d. Allerdings schien hier der Weg der Apoptose-Induzierung mittels Caspasen eine sehr viel geringere Rolle zu spielen als in den Versuchen mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen aus gesunden Mäusen.

In den Versuchen zur Ko-Kultur von DX5⁺ NKT-Zellen mit kolitis-induzierenden Zellen aus gesunden Mäusen und mit mononukleären Zellen aus Tieren mit DSS-Kolitis zeigte sich, dass DX5⁺ NKT-Zellen deren Zellzahl signifikant verringern. Nicht-kolitis-
verursachende Zellen aus gesunden Tieren, sowie mononukleäre Zellen aus gesunden Tieren waren dagegen von diesem Effekt nicht betroffen. Die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen beruht vermutlich auf mehreren Phänomenen, von denen die Apoptose-Induzierung über Caspasen nur einen Aspekt darstellt. Es besteht eine Abhängigkeit der DX5⁺ NKT-Zellen vom aktivierenden Molekül CD1d, sowie von den co-stimulatorischen Molekülen CD40, CD154 und PD-L1.

4.4. *In vivo* Versuche

4.4.1. Etablierung des CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis-Modells

Nach Injektion von CD62L⁺CD4⁺ Zellen bzw. CD62L^{low}CD4⁺ Kontrollzellen in C.B17-SCID-Mäuse, verloren diese zunächst leicht an Gewicht. Dies wurde vermutlich durch den Stress bei der Injektion bzw. Stress in Kombination mit der Rekonstitution mit T-Helfer-Zellen verursacht. Dieser Effekt wurde mit zunehmender Erfahrung beim Injizieren von Zellen nicht mehr beobachtet. Beide Versuchs-Gruppen nahmen dann bis ca. 35 Tage nach Kolitis-Induzierung zunächst im Durchschnitt an Gewicht zu. Bei der Gruppe mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen zeigten sich allerdings Krankheitssymptome wie struppiges Fell, Durchfall und leichter Gewichtsverlust bei einzelnen Tieren bereits nach 21 Tagen. Mit zunehmender Versuchsdauer konnten die Symptome bei 75% bis 90% der Tiere mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen beobachtet werden, und es kam zu länger anhaltenden Episoden mit Durchfällen und zu deutlichem Gewichtsverlust (bis zu 10% des Gewichts bei erstem Auftreten der Symptome). Kontrolltiere, die CD62L^{low}CD4⁺ Zellen erhielten, zeigten keinerlei Symptome und nahmen kontinuierlich an Gewicht zu. Zu Versuchsende wiesen Tiere mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen ein durchschnittliches Gewicht von 96,9% des Anfangsgewichts ($\pm 3,57\%$) auf. Tiere mit CD62L^{low}CD4⁺ Kontrollzellen wiesen ein Gewicht von 107,2% des Anfangsgewichts ($\pm 3,05\%$) auf (siehe Abb. 33). Dies bedeutete einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen ($p= 0,0498$).

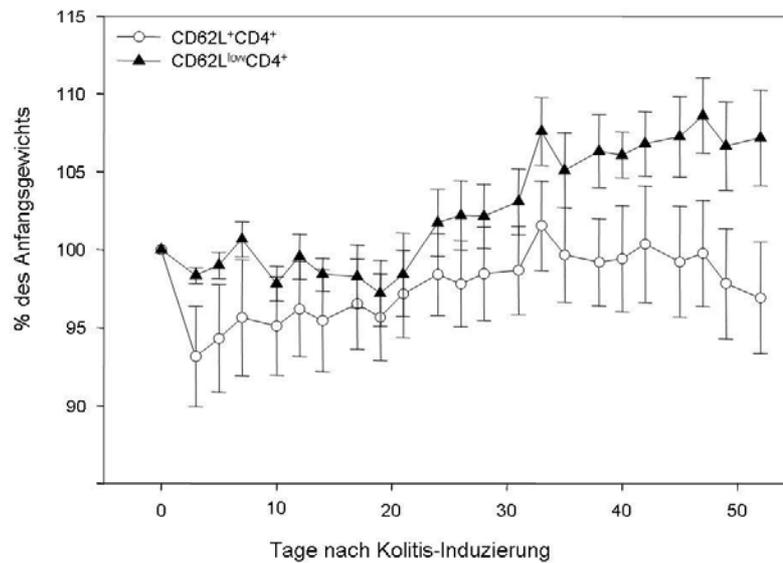


Abbildung 33: Gewichtsverlauf bei Transferkolitis: Nach anfänglichem stressbedingtem Gewichtsverlust nahmen Tiere beider Gruppen bis Tag 35 kontinuierlich an Gewicht zu; Tiere mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen verloren ab Tag 35 bis zu Versuchsende im Durchschnitt 7% ihres Gewichts im Vergleich zum Gewicht an Tag 35; Tiere mit CD62L^{low}CD4⁺ Kontrollzellen nahmen dagegen weiterhin an Gewicht zu (Mittelwert \pm SEM; n= 10 für CD62L⁺CD4⁺ bzw. n= 8 für CD62L^{low}CD4⁺)

Im histologischen Bild zeigten sich bei Tieren, die CD62L⁺CD4⁺ Zellen erhielten, auffallende morphologische Veränderungen. Es kam zu einer starken Verdickung der Mukosa, einem Verlust der Becherzellen und einer pathologischen Verlängerung der Krypten (siehe auch Abb. 34). Tiere mit CD62L^{low}CD4⁺ Zellen zeigten nur minimale histologische Veränderungen und unterschieden sich kaum von gesunden Tieren.

Für Tiere, die CD62L⁺CD4⁺ Zellen erhielten, ergab sich ein Histologischer Score von $2,83 \pm 0,48$ gegenüber einem Histologischen Score von $0,83 \pm 0,65$ für Tiere, die CD62L^{low}CD4⁺ Zellen erhielten (siehe Abb. 35). Dies bedeutete einen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,0331$).

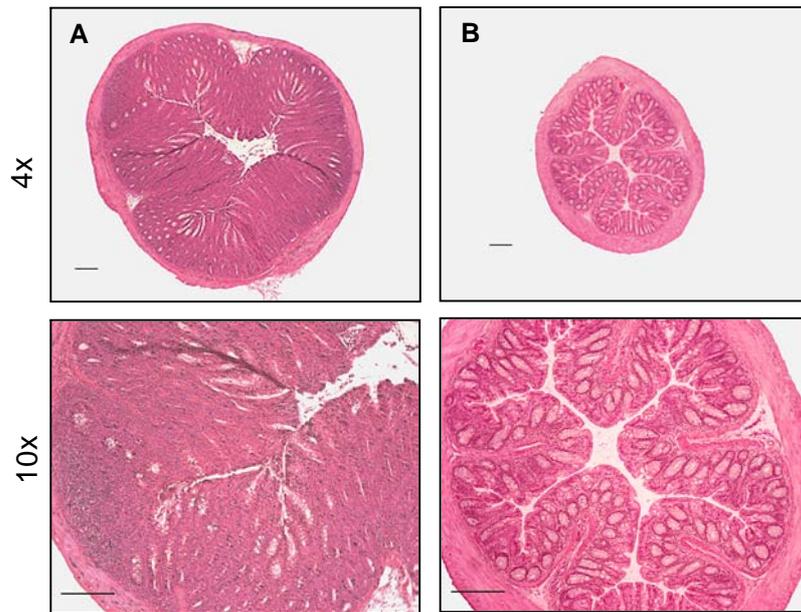


Abbildung 34: Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der zwei Versuchsgruppen zur Etablierung des Transferkolitis-Modells: A) Tier mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen: massive zelluläre Infiltrate, Verdickung der Mukosa und pathologische Verlängerung der Krypten; B) Tier mit CD62L^{low}CD4⁺ Kontrollzellen: nahezu normale Morphologie mit minimalen zellulären Infiltraten (Größenbalken entspricht 200µm)

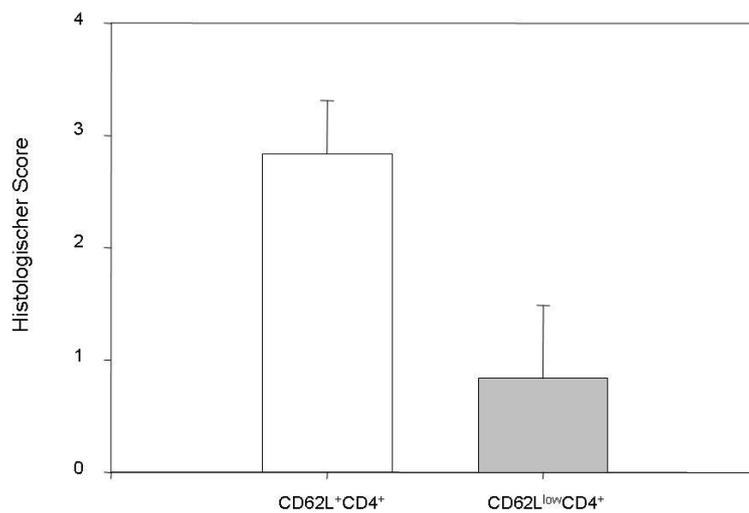


Abbildung 35: Histologischer Score von Tieren mit CD62L^{low}CD4⁺ Zellen und Tieren mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen: Tiere mit CD62L^{low}CD4⁺ Kontrollzellen zeigen einen signifikant niedrigeren Histologischen Score als Tiere mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen (Mittelwert + SEM)

Dieser Versuch wurde noch zweimal wiederholt. In allen Experimenten war zu beobachten, dass zwischen 10% und 25% der Kontrolltiere keine Kolitis entwickelten. Hierdurch ergab sich eine relativ hohe Schwankungsbreite der Werte. Dies zeigte sich sowohl im Gewichtsverlauf, als auch im histologischen Bild und im histologischen Score. Die Tatsache, dass die Kolitis im Transferkolitismodell nicht zu 100% reproduzierbar ist, wurde bereits für das CD45RB^{high}-Modell beschrieben. Hier kann nur in 60% bis 80% der Tiere, die mit CD4⁺CD45RB^{high} Zellen rekonstituiert werden tatsächlich eine Kolitis ausgelöst werden [147].

4.4.2. Präventive Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen im CD62L⁺CD4⁺ Modell

4.4.2.1. Effekt auf die Kolitis im Vergleich zu Kontrollzellen

Nachdem das CD62L⁺CD4⁺ Modell etabliert wurde, sollte zunächst untersucht werden, ob die Gabe von DX5⁺ NKT-Zellen die Ausprägung dieser Kolitis verhindern kann. Die Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe eins erhielt nur die kolitis-induzierenden CD62L⁺CD4⁺ Zellen (Kontrollgruppe). Tiere der Gruppe zwei erhielten zusätzlich an den Tagen -2, +14, +28 und +42 eine Injektion mit $0,5 \times 10^6$ DX5⁺ NKT-Zellen. Anfänglich zeigte sich bei der Kontrollgruppe wie schon bei den Versuchen zur Etablierung des Tiermodells ein leichter Gewichtsverlust, der vermutlich durch den Stress der Zellinjektion in Kombination mit ersten Effekten der CD62L⁺CD4⁺ Zellen verursacht wurde. Nach einer kurzen Erholungsphase blieb das Gewicht in beiden Versuchsgruppen konstant bzw. die Tiere nahmen leicht zu. Nach ca. 6 Wochen begannen die Tiere der Kontrollgruppe deutlich an Gewicht zu verlieren während die Tiere, die DX5⁺ NKT-Zellen erhielten, weiterhin an Gewicht zunahmen (siehe auch Abb. 36). Zu Versuchsende wiesen die Tiere der Kontrollgruppe im Vergleich zum Anfangsgewicht ein Gewicht von $87,3\% \pm 7,39\%$ auf. Das Gewicht der mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelten Tiere, betrug $110,1\% \pm 2,12\%$. Die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelten Tiere wiesen zu Versuchsende ein signifikant höheres Gewicht auf als die Tiere der Kontrollgruppe ($p=0,0113$).

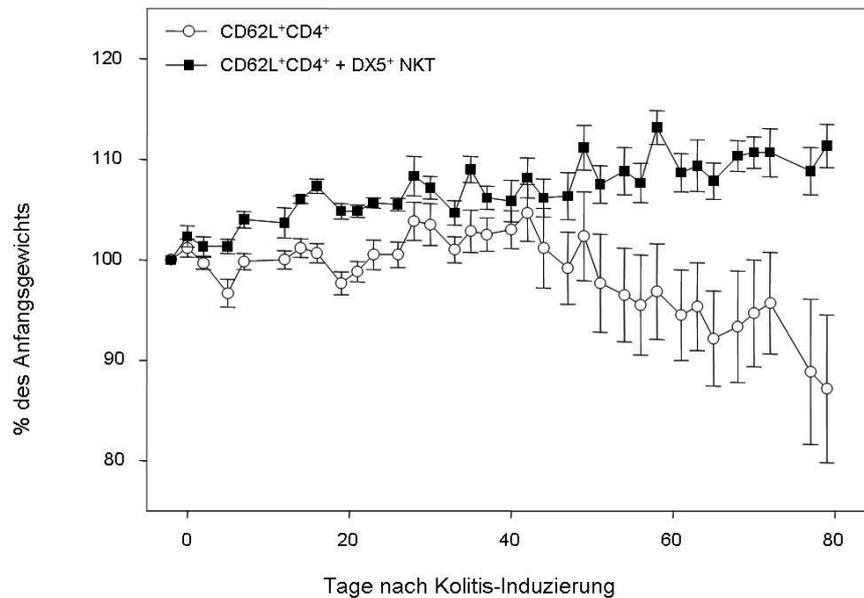


Abbildung 36: Gewichtsverlauf nach Injektion von CD62L⁺CD4⁺ Zellen mit bzw. ohne zusätzliche Injektion von DX5⁺ NKT-Zellen: Tiere der Kontrollgruppe verloren im Vergleich zu Tieren, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden deutlich an Gewicht. Ab Tag 54 bis zu Versuchsende wiesen Tiere mit DX5⁺ NKT-Zellen ein signifikant höheres Gewicht auf als Tiere der Kontrollgruppe (Mittelwert ± SEM)

Auch im histologischen Bild zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe auch Abb. 37). Bei Tieren der Kontrollgruppe fanden sich zelluläre Infiltrate im Kolongewebe, eine pathologische Verlängerung der Krypten, sowie eine massive Verdickung der Mukosa. Mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere wiesen entweder keines der genannten Merkmale auf bzw. nur in abgemilderter Form.

Die im Gewichtsverlauf der Tiere und den histologischen Schnitten beobachtete Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen zeigte sich auch im histologischen Score. Mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere wiesen einen signifikant niedrigeren histologischen Score auf als Tiere der Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,418$ vs. $3,125 \pm 0,591$; $p = 0,0193$; siehe auch Abb. 38).

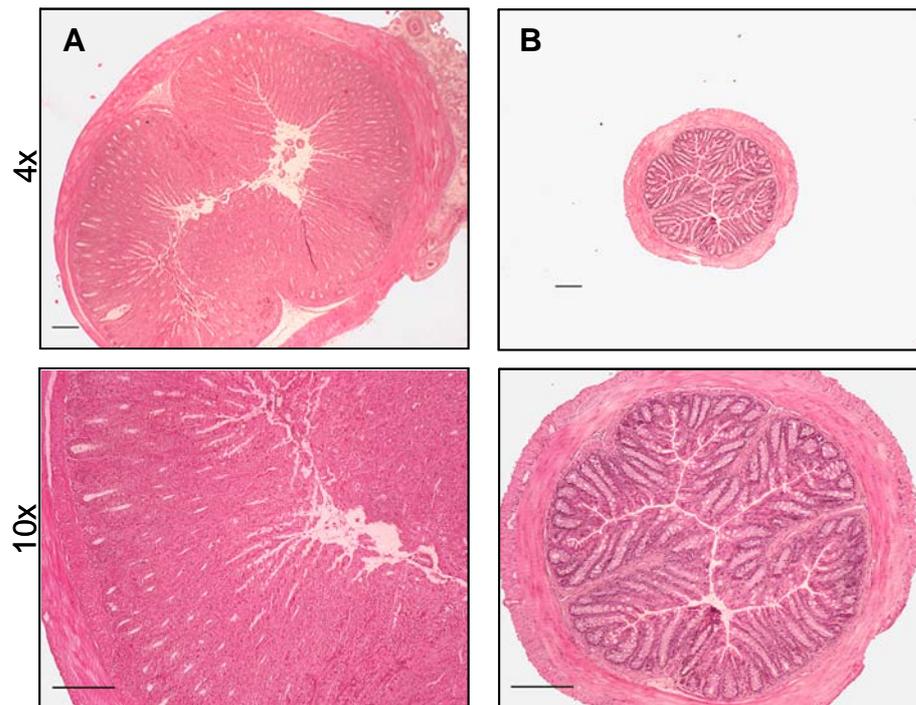


Abbildung 37: Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der zwei Versuchsgruppen zur Untersuchung der präventiven Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen: A) Tier mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen; B) mit DX5⁺ NKT-Zellen behandeltes Tier: die Morphologie der Darmwand bleibt erhalten und es zeigen sich weniger zelluläre Infiltrate (Größenbalken entspricht 200µm)

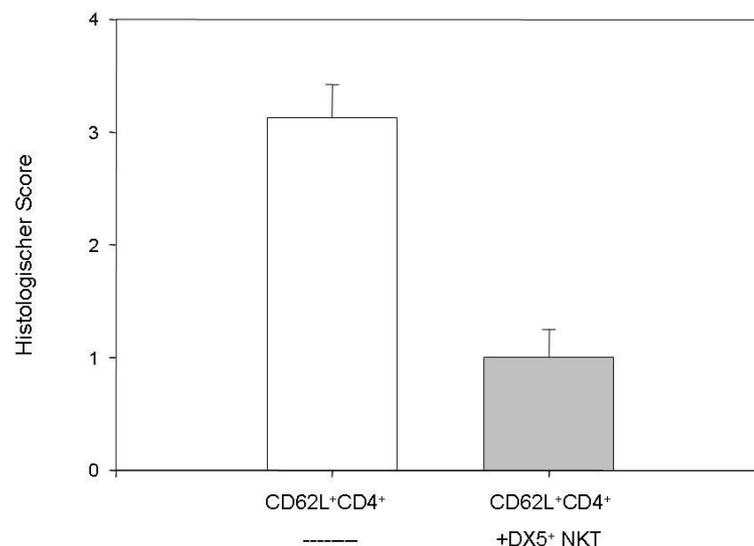


Abbildung 38: Histologischer Score von Tieren der Kontrollgruppe und Tieren mit DX5⁺ NKT-Zellen: Tiere, die präventiv mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, weisen einen signifikant niedrigeren histologischen Score auf als Tiere der Kontrollgruppe (Mittelwert + SEM)

Um zu überprüfen, ob eine Zellinjektion unabhängig vom verwendeten Zelltyp zu den beobachteten Ergebnissen führt oder ob es sich um einen spezifisch durch DX5⁺ NKT-Zellen verursachten Effekt handelt, wurde ein Versuch mit einer Injektion einer Kontrollzellpopulation durchgeführt. Als Kontrollzellen wurden dabei CD8⁺ T-Zellen verwendet. Es handelt sich hier um T-Zellen, die ähnlich wie NKT-Zellen andere Zellen über Perforin/Granzym lysieren können. Sie unterscheiden sich aber deutlich von DX5⁺ NKT-Zellen, da diese entweder DN oder CD4⁺ sind und nicht CD8⁺. Um zu untersuchen, ob DX5⁺ NKT-Zellen einen Effekt im Vergleich zu CD8⁺ Kontrollzellen bewirken, wurden drei Gruppen untersucht (n= 8 Tiere pro Gruppe). Tiere der Gruppe eins erhielten nur CD62L⁺CD4⁺ Zellen. Tieren der Gruppe zwei wurden an den Tagen -2, +14, +28 und +42 $0,5 \times 10^6$ DX5⁺ NKT-Zellen injiziert. Die Tiere der Gruppe drei erhielten an den genannten Zeitpunkten $0,5 \times 10^6$ CD8⁺ Kontrollzellen.

Mit CD8⁺ Zellen behandelte Tiere wiesen einen ähnlichen Gewichtsverlauf auf wie Tiere, die nur CD62L⁺CD4⁺ Zellen erhielten und verloren am Ende des Versuchs sogar Gewicht im Vergleich zu Kontrolltieren (102,9% des Anfangsgewichts \pm 6,8% vs. 112,7% des Anfangsgewichts \pm 3,5; p= 0,1691; siehe auch Abb. 39). In beiden Gruppen zeigten sich als weitere Kolitissymptome ein struppiges Fell und Durchfall. Mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere hatten dagegen im Vergleich zu den anderen Gruppen ab Tag 72 bis zum Versuchsende ein signifikant höheres Gewicht und wiesen auch keine Krankheitssymptome auf (bei Versuchsende: 123,0% des Anfangsgewichts \pm 1,2%; p= 0,0495 vs. Kontrollgruppe; p= 0,0175 vs. CD8-Gruppe).

Im histologischen Bild zeigte sich bei mit CD8⁺ Zellen behandelten Tieren ein ähnliches Bild wie bei den Kontrolltieren (siehe auch Abb. 40). Die Mukosa war verdickt, die Krypten stark verlängert und es waren massive zelluläre Infiltrate zu sehen. Mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere wiesen dagegen keine der genannten Krankheitsmerkmale bzw. nur in abgemilderter Form auf.

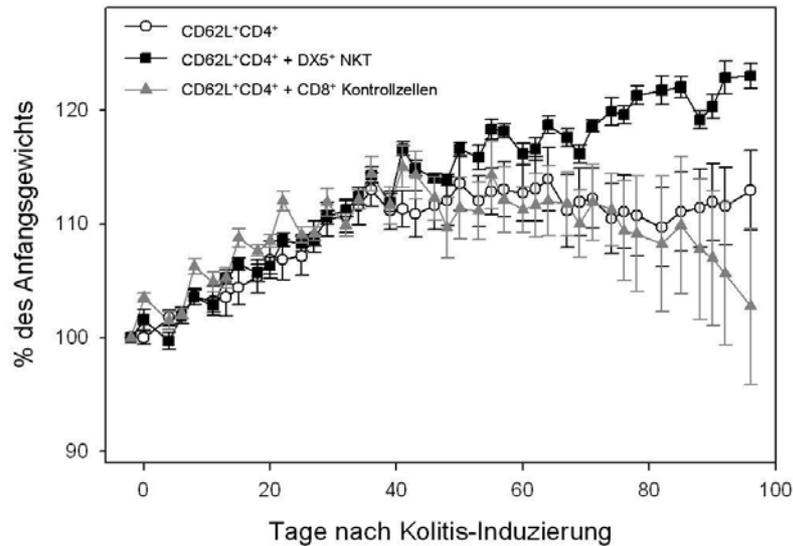


Abbildung 39: Gewichtsverlauf der drei Versuchsgruppen zur Untersuchung der präventiven Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen im Vergleich zu CD8⁺ Kontrollzellen: Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, wiesen ab Tag 72 ein signifikant höheres Gewicht auf als Kontrolltiere ohne Behandlung bzw. Tiere, die CD8⁺ Kontrollzellen erhielten (Mittelwert \pm SEM)

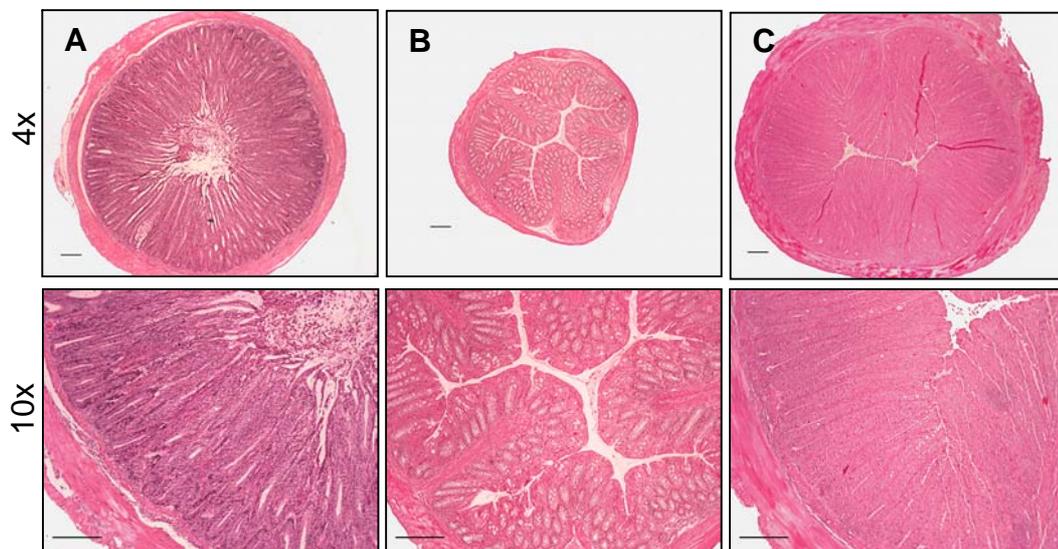


Abbildung 40: Repräsentative histologische Schnitte des Kolons von Tieren mit CD8⁺ Kontrollzellen, Tieren mit DX5⁺ NKT-Zellen und Kontrolltieren: A) Tier mit CD8⁺ Zellen B) Tier mit DX5⁺ NKT-Zellen; C) Kontrolltier (CD62L⁺CD4⁺): sowohl bei Kontrolltieren als auch bei Tieren mit CD8⁺ Kontrollzellen zeigte sich eine deutliche Verdickung der Mukosa, eine pathologische Verlängerung der Krypten, sowie massive zelluläre Infiltrate. Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, zeigten keine solchen Veränderungen (Größenbalken entspricht 200 μ m)

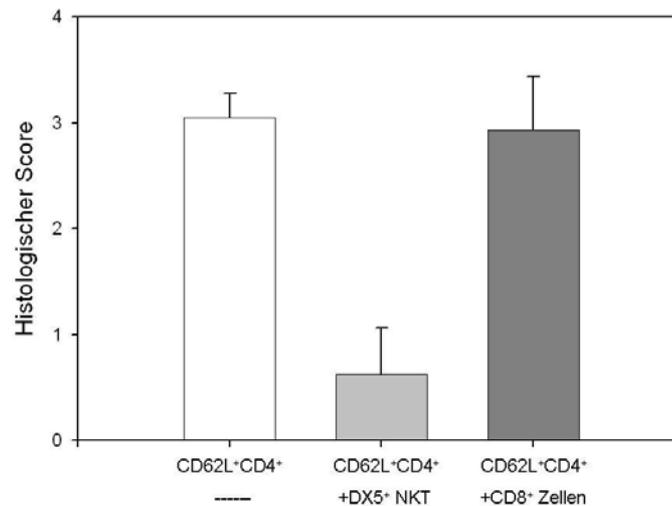


Abbildung 41: Histologischer Score von Kontrolltieren, Tieren mit DX5⁺ NKT-Zellen und Tieren mit CD8⁺ Kontrollzellen: für Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, konnte im Vergleich zu Tieren mit CD8⁺ Zellen und Kontrolltieren ohne Behandlung ein signifikant niedrigerer histologischer Score festgestellt werden (Mittelwert + SEM)

Mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere wiesen mit $0,62 \pm 0,4$ einen signifikant niedrigeren histologischen Score auf als Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe mit $3,05 \pm 0,2$ ($p < 0,0001$; siehe auch Abb. 41). Auch im Vergleich mit der CD8-Gruppe ($2,93 \pm 0,5$) ergab sich für Tiere der NKT-Gruppe ein signifikant niedrigerer Wert ($p = 0,0042$).

4.4.2.2. Blockierung der NKT-Zell-Wirkung durch anti-CD1d-Antikörper

In den bisher gezeigten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass DX5⁺ NKT-Zellen eine CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis verhindern können und dieser Effekt spezifisch durch DX5⁺ NKT-Zellen vermittelt wird. In den in Abschnitt 4.3.2. beschriebenen *in vitro*-Versuchen zeigte sich eine Abhängigkeit der DX5⁺ NKT-Zellen von CD1d, sowie den co-stimulatorischen Molekülen CD40, CD154 und PD-L1. In den folgenden *in vivo*-Untersuchungen wurde nur die Wirkung eines Antikörpers gegen CD1d untersucht. Auf eine Blockierung von CD40, CD154 oder PD-L1 mussten wir aus technischen Gründen verzichten. Antikörper gegen diese co-stimulatorischen Moleküle hätten neben der potenziellen Blockierung von DX5⁺ NKT-Zellen noch einen zweiten Effekt. Dieser

besteht in einer Unterdrückung der Koltis-Induzierung, da für diese co-stimulatorische Moleküle gebraucht werden [70; 155]. Infolgedessen würden die Versuchstiere keine Kolitis entwickeln und es könnten keine Rückschlüsse auf die Wirkung des Antikörpers in Bezug auf DX5⁺ NKT-Zellen gezogen werden. CD1d dagegen spielt bei der Kolitis-Induzierung keine Rolle, weshalb die Blockierung dieses Moleküls in unserem Versuchsaufbau sich nur auf die Funktion der DX5⁺ NKT-Zellen auswirkt.

In den folgenden Versuchen sollte daher untersucht werden, ob *in vivo* eine Abhängigkeit der DX5⁺ NKT-Zellen in ihrer Funktion von CD1d besteht. Für klassische NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen wird beschrieben, dass diese über CD1d aktiviert werden und von diesem Molekül abhängig sind. Um dies auch für DX5⁺ NKT-Zellen zu überprüfen, wurde untersucht, ob die Blockierung von CD1d mittels eines Antikörpers den Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen im Transferkolitismodell verhindert. Dazu wurde den Tieren zwei Stunden vor der Injektion der DX5⁺ NKT-Zellen ein blockierender Antikörper gegen CD1d in die Schwanzvene injiziert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um eine ausreichende Blockierung von CD1d auf Epithelzellen vor der Injektion der DX5⁺ NKT-Zellen zu erreichen. Im Gewichtsverlauf zeigte sich, dass mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere konstant an Gewicht zunahmten (122,2% des Anfangsgewichts \pm 2,2% zu Versuchsende; siehe auch Abb. 42). Kontrolltiere begannen nach 4 bis 5 Wochen in ihrem Gewichtsverlauf zu stagnieren (111,6% des Anfangsgewichts \pm 4,1% zu Versuchsende). Tiere, die DX5⁺ NKT-Zellen und einen anti-CD1d-Antikörper erhielten, zeigten eine ähnliche Gewichtsentwicklung wie die Kontrolltiere (107,6% des Anfangsgewichts \pm 5,1% zu Versuchsende).

Die Gruppe mit DX5⁺ NKT-Zellen und Isotyp-Antikörper wies dagegen eine ähnliche Gewichtsentwicklung auf wie die Tiere, die nur DX5⁺ NKT-Zellen erhielten (115,7% des Anfangsgewichts \pm 1,8% zu Versuchsende). Im Vergleich mit Tieren, die einen CD1d-Antikörper erhielten, wiesen mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere am Versuchsende ein signifikant höheres Gewicht auf ($p= 0,0297$). Das Endgewicht der Tiere der Kontrollgruppe und der Tiere der NKT-Gruppe zeigte zwar eine Tendenz zugunsten eines höheren Endgewichts in der NKT-Gruppe, unterschied sich aber nicht signifikant ($p= 0,0511$). Auch zwischen allen anderen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

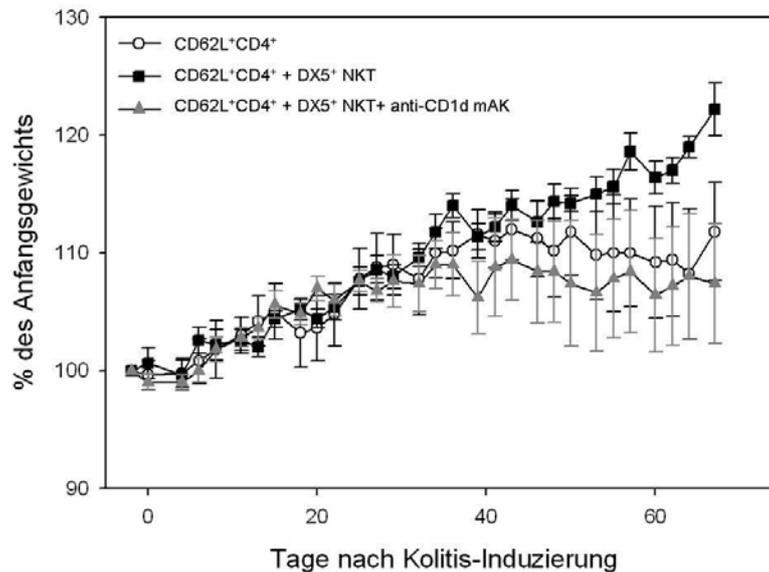


Abbildung 42: Gewichtsverlauf von Kontrolltieren, Tieren mit DX5⁺ NKT-Zellen und Tieren mit DX5⁺ NKT-Zellen + anti-CD1d: Tiere, die neben DX5⁺ NKT-Zellen einen blockierenden Antikörper gegen CD1d erhielten zeigten eine ähnliche Gewichtsentwicklung wie Kontrolltiere und begannen ab Tag 35 in ihrem Gewicht zu stagnieren bzw. Gewicht zu verlieren. Tiere mit DX5⁺ NKT-Zellen nahmen dagegen kontinuierlich an Gewicht zu (Mittelwert ± SEM)

Im histologischen Bild zeigten sich bei Tieren, die einen blockierenden Antikörper gegen CD1d erhielten, ähnliche Effekte wie bei unbehandelten Tieren (siehe auch Abb. 40). Es kam zu massiven zellulären Infiltraten in der Mukosa, zu einer pathologischen Verlängerung der Krypten und zu einer Zerstörung des Kolonepithels. Tiere, die einen Isotypantikörper erhielten, wiesen- ähnlich wie Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden- nur wenige derartige Veränderungen auf. Allerdings waren bei mit Isotyp-Antikörper behandelten Tieren einige zelluläre Infiltrate, sowie eine leichte Kryptenverlängerung zu beobachten (siehe auch Abb. 44).

Die Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, wiesen den niedrigsten histologischen Score auf ($0,6 \pm 0,2$; siehe auch Abb. 43). Tiere, die zusätzlich einen Antikörper gegen CD1d erhielten, hatten mit $2,9 \pm 0,4$ einen ähnlichen Score wie die Kontrolltiere ($3,2 \pm 0,2$). Beide Werte unterschieden sich signifikant von dem für die NKT-Gruppe ($p = 0,0001$ vs. Kontrollgruppe; $p = 0,0008$ vs. CD1d-Gruppe). Der

histologische Score von Tieren mit Isotyp-Antikörper lag mit $1,3 \pm 0,6$ signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, unterschied sich aber nicht signifikant von der NKT-Zell-Gruppe und der CD1d-Gruppe ($p= 0,0363$ vs. Kontrollgruppe; $p= 0,0587$ vs. CD1d-Gruppe; $p= 0,2805$ vs. NKT-Gruppe).

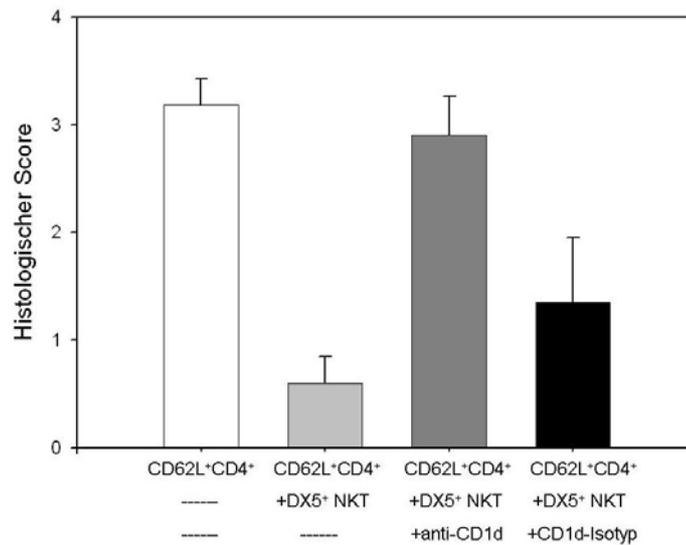


Abbildung 43: Histologischer Score der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der Wirkung eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d: Tiere mit DX5⁺ NKT-Zellen wiesen eine signifikant niedrigeren histologischen Score auf als Kontrolltiere und Tiere, die zusätzlich einen blockierenden Antikörper gegen CD1d erhielten. Der histologische Score der Tiere mit Isotyp-Kontrollantikörper lag trotz einer geringen unspezifischen Wirkung signifikant niedriger als der der Kontrollgruppe (Mittelwert + SEM)

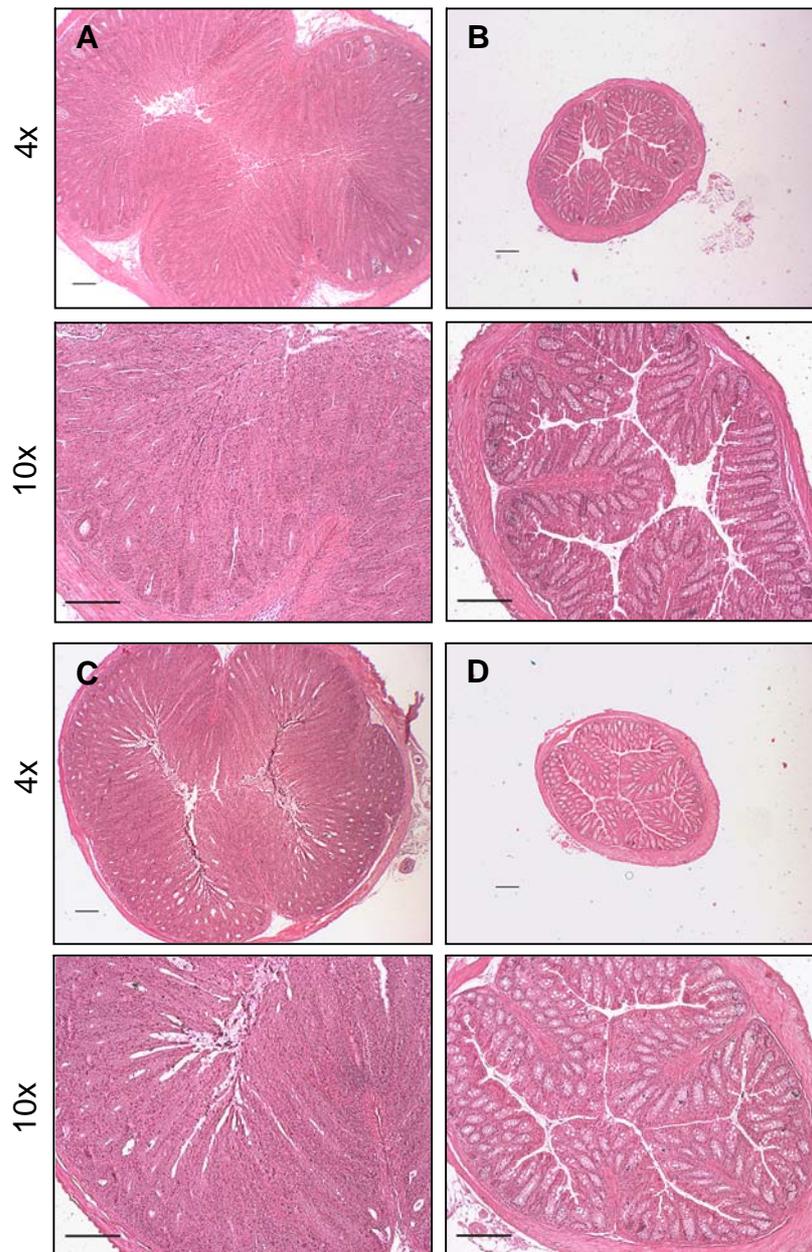


Abbildung 44: Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der Wirkung eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d: A) Kontrolltier (CD62L⁺CD4⁺); B) Tier mit DX5⁺ NKT-Zellen; C) Tier mit DX5⁺ NKT-Zellen + anti-CD1d mAK; D) Tier mit DX5⁺ NKT-Zellen + CD1d-Isotyp mAK: Tiere mit CD1d-Antikörper und Kontrolltiere wiesen im histologischen Bild zelluläre Infiltrate und eine massive Verdickung der Mukosa auf. Mit DX5⁺ NKT-Zellen bzw. zusätzlich Isotyp-Antikörper behandelte Tiere zeigten solche Veränderungen nur in milder Form (Größenbalken entspricht 200µm)

Zusammenfassend kann man feststellen, dass DX5⁺ NKT-Zellen die Entstehung einer CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis verhindern können. Dies zeigt sich sowohl im Gewichtsverlauf der Tiere als auch im histologischen Bild und im daraus resultierenden histologischen Score. Die Wirkung wird spezifisch durch die DX5⁺ NKT-Zellen vermittelt. CD8⁺ Kontrollzellen zeigen keinen Effekt. Die Funktion der DX5⁺ NKT-Zellen ist abhängig von CD1d und kann durch Verwendung eines blockierenden Antikörpers gegen CD1d verhindert werden. DX5⁺ NKT-Zellen stellen daher eine Zellpopulation mit regulatorischen Eigenschaften dar, die in der Lage ist, in Abhängigkeit von CD1d die Kolitis-Entstehung im Tiermodell positiv zu beeinflussen.

4.4.3. Therapeutische Wirkung im CD62L⁺CD4⁺ Modell

In den bisher durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass DX5⁺ NKT-Zellen die Entstehung einer Kolitis verhindern können. Dies entspricht allerdings nicht der klinischen Situation. Hier muss eine bereits bestehende Kolitis behandelt werden. In den folgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob der Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen eine bestehende Kolitis therapieren kann. Nach Therapiebeginn verloren Tiere der Kontrollgruppe an Gewicht (97,2% ± 2,5% des Gewichts bei Therapiebeginn; siehe auch Abb. 45). Tiere, die CD8⁺ Zellen erhielten, verloren ebenfalls Gewicht (90,6% ± 4,2% des Gewichts bei Therapiebeginn). Im Vergleich dazu verloren mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelte Tiere nur leicht an Gewicht (99,6% ± 2,0% des Gewichts bei Therapiebeginn). Gegenüber der mit CD8⁺ Zellen behandelten Gruppe stellte dies einen signifikanten Unterschied dar ($p= 0,0417$), allerdings nicht zur Kontrollgruppe ohne Therapie ($p= 0,4480$). CD8-Gruppe und Kontrollgruppe unterschieden sich nicht statistisch signifikant ($p= 0,170$).

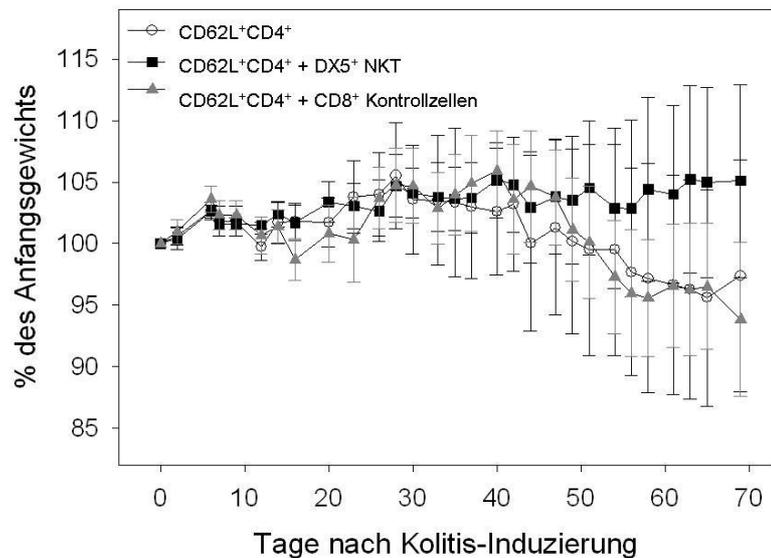


Abbildung 45: Gewichtsverlauf der drei Versuchsgruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen: Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden verloren nach Therapiebeginn kein Gewicht. Tiere, die mit CD8⁺ Kontrollzellen behandelt wurden und Kontrolltiere ohne Behandlung verloren nach Therapiebeginn an Gewicht. Zwischen Tieren der CD8-Gruppe und Tieren, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied (Mittelwert ± SEM)

Kontrolltiere zeigten bei Versuchsende eine ausgeprägte Kolitis mit zellulären Infiltraten in der Mukosa, einer Verlängerung der Krypten, sowie einer Verdickung der Mukosa (siehe auch Abb. 46). Bei mit CD8⁺ Zellen behandelten Tieren waren ähnliche Veränderungen, meist in etwas stärkerer Ausprägung zu beobachten. Für eine Gruppe Kontrolltiere wurde der Versuch nach 6 Wochen zum Nachweis einer sich entwickelnden Kolitis zum Zeitpunkt des Therapiebeginns beendet. Diese Tiere wiesen ebenfalls die genannten histologischen Veränderungen auf, die sich aber gemessen an der Anzahl der zellulären Infiltrate und dem Ausmaß der Verdickung der Mukosa noch in einem frühen Stadium befanden. Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden zeigten bei Versuchsende nur eine minimale Verlängerung der Krypten, einige wenige zelluläre Infiltrate und nur eine leichte Verdickung der Mukosa.

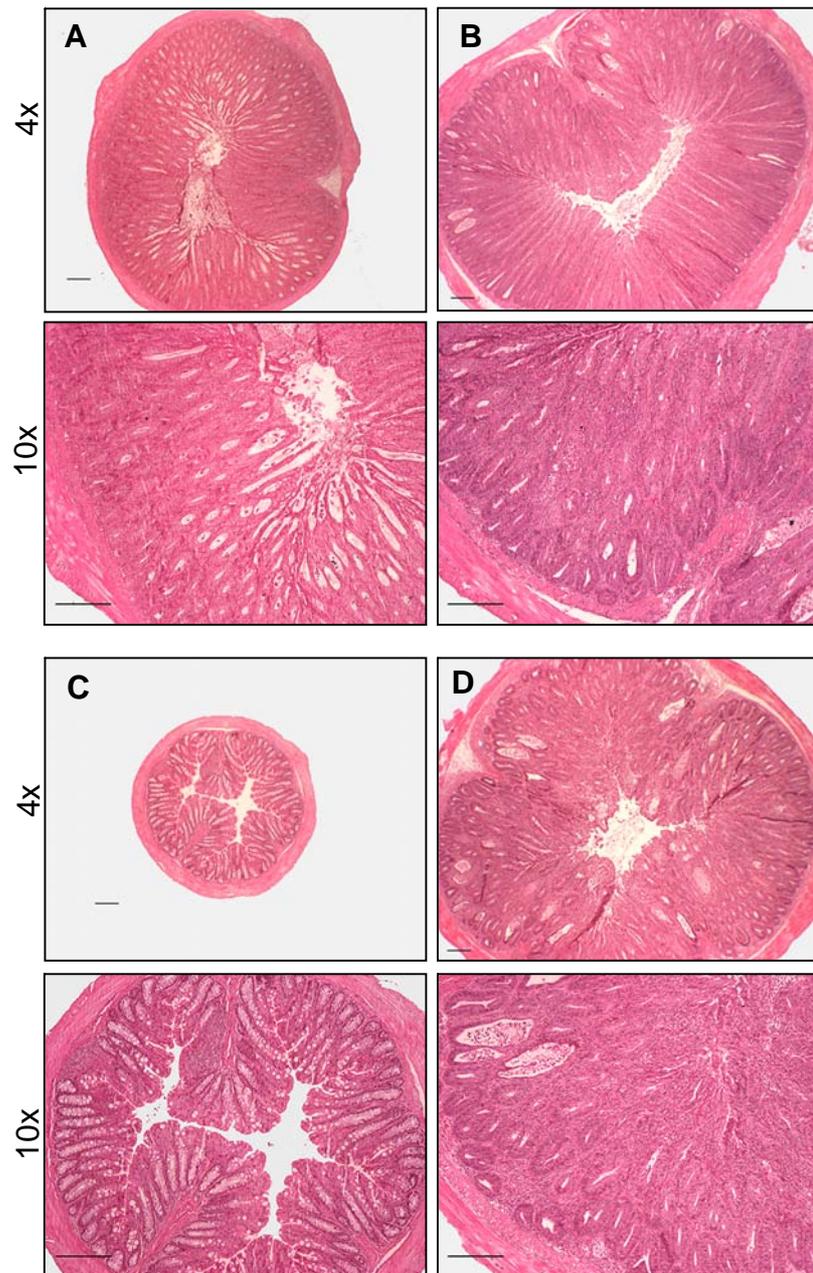


Abbildung 46: Repräsentative histologische Schnitte des Kolons der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen: A) Kontrolle (CD62L⁺CD4⁺) nach 6 Wochen; B) Kontrolle (CD62L⁺CD4⁺) bei Versuchsende; C) Tier mit DX5⁺ NKT-Zellen; D) Tier mit CD8⁺ Kontrollzellen: Tiere der beiden Kontrollgruppen, sowie Tiere mit CD8⁺ Kontrollzellen zeigten im histologischen Bild massive zelluläre Infiltrate, eine pathologische Verlängerung der Krypten und eine massive Verdickung der Mukosa. Im Gegensatz dazu waren bei 73% der Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden, solche Veränderungen nur in abgemilderter Form festzustellen (Größenbalken entspricht 200µm)

Für Tiere, die DX5⁺ NKT-Zellen erhielten ergab sich mit $2,22 \pm 0,27$ gegenüber Tieren mit CD8⁺ Zellen ($3,58 \pm 0,42$) und unbehandelten Kontrolltieren ($3,23 \pm 0,33$) ein signifikant niedrigerer histologischer Score ($p= 0,0127$ vs. CD8-Gruppe; $p= 0,0290$ vs. Kontrollgruppe; siehe auch Abb. 47). Allerdings sprachen 27% der Tiere (3 von 11) nicht auf die Behandlung an, während die restlichen Tiere durch die Behandlung mit DX5⁺ NKT-Zellen sehr gut therapiert werden konnten. Für Kontrolltiere, bei denen nach 6 Wochen Kolonproben entnommen wurden, konnte eine Score von $2,92 \pm 0,53$ festgestellt werden, der sich nicht signifikant von dem der anderen Gruppen unterschied. Unbehandelte Kontrolltiere unterschieden sich nicht von Tieren, die mit CD8⁺ Zellen behandelt wurden ($p= 0,650$).

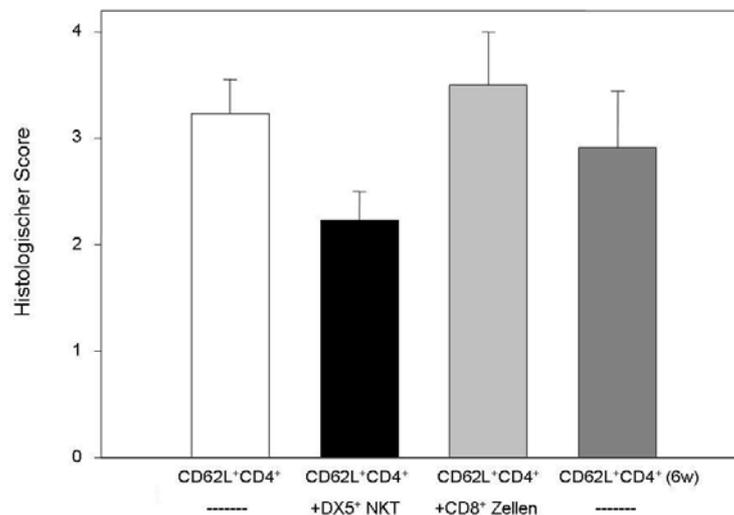


Abbildung 47: Histologischer Score der vier Versuchsgruppen zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen: Tiere, die mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelt wurden wiesen den niedrigsten histologischen Score auf. Tiere mit CD8⁺ Kontrollzellen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Mittelwert + SEM)

DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz können also nicht nur die Entstehung einer CD62L⁺CD4⁺ Kolitis im Tiermodell verhindern, sondern auch eine bereits bestehende Kolitis therapieren. Wie bereits die *in vitro*-Versuche zeigten, sind DX5⁺ NKT-Zellen auch *in vivo* in ihrer Wirkung abhängig von der Aktivierung über CD1d. Über die Bedeutung co-stimulatorischer Moleküle wie CD40, CD154 und PD-L1 für ihre Funktion

kann leider aus den oben genannten Gründen in diesem Tiermodell keine Aussage getroffen werden.

Zusammenfassend zeigten die hier durchgeführten Versuche, dass DX5⁺ NKT-Zellen eine Subpopulation der NKT-Zellen mit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisbarem regulatorischem Potential bei CED darstellen.

5. DISKUSSION

5.1. CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis-Modell

5.1.1. Isolierung der Zellen und Etablierung des Tiermodells

Zur Etablierung des CD62L⁺CD4⁺ Transfermodells wurde die Aufreinigung von naiven T-Helfer-Zellen aus der Milz mittels magnetischer Markierung durchgeführt. Die Isolierung musste in zwei Schritten erfolgen, da naive T-Helfer-Zellen nur durch die Kombination der beiden Marker CD4 und CD45RB bzw. CD4 und CD62L definiert werden. Nach der ersten Sortierung ergab sich für die CD4⁺ Zellen im FACS eine Reinheit von 75-96%. Dies stellt für eine durch Negativselektion gewonnene Zellpopulation ein sehr gutes Ergebnis dar. Ca. 10-25% der Lymphozyten aus der Milz befanden sich in der Fraktion der CD4-positiven Zellen. Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt zeigte sich eine Reinheit von 70-96%. Dies ist ein akzeptables Ergebnis. Es sollte aber bei einer Positivfraktionierung routinemäßig eine Reinheit von mehr als 80% erreicht werden können. Etwa 25-40% der CD4⁺ Zellen befanden sich in der Fraktion der CD62L⁺ Zellen. Laut Literatur sollten dies etwa 50% sein [86; 100]. Dieses Ergebnis war mit der verwendeten Methode der magnetischen Aufreinigung im Vergleich zur Aufreinigung im FACS kaum möglich, da ein Kompromiss zwischen Reinheit der Zellen und Ausbeute gefunden werden musste. Eine Erhöhung der Ausbeute würde zwangsläufig zu einer Verringerung der Reinheit führen. In den vorliegenden Versuchen wurde die Reinheit der CD62L⁺CD4⁺ Zellen als wichtiger eingeschätzt als die Ausbeute, da im Modell der Transferkolitis durch den Ko-Transfer von „verunreinigenden“ Memory-T-Helfer-Zellen (CD62L^{low}CD4⁺ bzw. CD4⁺CD45RB^{low}) die Entstehung einer Kolitis verhindert würde [99; 100]. Wie die von mir durchgeführte FACS-Untersuchung der CD62L⁺CD4⁺ Zellen und der CD62L^{low}CD4⁺ Zellen mit einem Antikörper gegen CD45RB zeigte, waren in der Population der aufgereinigten naiven T-Helfer-Zellen keine Memory-T-Helfer-Zellen mehr enthalten. Dies bedeutet eine hohe Reinheit der kolitis-induzierenden CD62L⁺CD4⁺ Zellen.

Die magnetische Sortierung ist eine gute und schnelle Methode für die Aufreinigung von CD62L⁺CD4⁺ Zellen. Es kann eine hohe Reinheit der isolierten Zellpopulation in Kombination mit einer guten Ausbeute erreicht werden. Die magnetische Sortierung stellt daher eine gute Alternative zur Isolierung im FACS-Sorter dar.

Beim Modell der CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis wird durch den Transfer naiver T-Helfer-Zellen in syngene oder kongene immundefiziente Tiere eine Kolitis induziert. Dieses

Modell weist Ähnlichkeiten zum weiter verbreiteten $CD4^+CD45RB^{high}$ -Modell auf. Auch in diesem Modell werden naive T-Helfer-Zellen zur Induzierung einer Kolitis in immundefiziente syngene oder kongene Empfänger injiziert. Allerdings zeigte sich, dass zwischen den beiden T-Helfer-Zellpopulationen „ $CD62L^{+}$ “ und „ $CD45RB^{high}$ “ doch gewisse Unterschiede bestehen, die weiter unten noch diskutiert werden sollen.

Die Induzierung einer Kolitis im Transfermodell ist möglich, da bei immundefizienten Tieren regulatorische T-Zellen fehlen. Auch in gesunden Tieren sind naive T-Helfer-Zellen zu finden, die potentiell eine Kolitis induzieren könnten. Sie werden hier aber durch regulatorische Zellen kontrolliert [6]. Nach Injektion von $CD62L^+CD4^+$ Zellen aus Balb/c-Mäusen in kongene immundefiziente C.B17-SCID-Mäuse begannen sich erste Kolitis-Symptome bereits sehr früh zu zeigen (3-5 Wochen nach Transfer). Nach ca. 6 Wochen konnte im histologischen Bild eine etablierte Kolitis nachgewiesen werden. Dies deckt sich in etwa mit den in der Literatur beschriebenen Angaben [100]. Allerdings war in unseren Versuchen eine höhere Zellzahl nötig als in den Beschreibungen für das $CD45RB^{high}$ -Transferkolitis-Modell. Dies kann durch die Verwendung des $CD62L^+CD4^+$ Transfermodells erklärt werden. Für dieses Modell wird beschrieben, dass das Auftreten einer Kolitis später zu beobachten ist als beim $CD45RB^{high}$ -Modell und eine höhere Zellzahl benötigt wird, um die Kolitis zu induzieren [87]. Im $CD45RB^{high}$ -Modell, in dem hoch aufgereinigte $CD4^+CD45RB^{high}$ Zellen injiziert werden, kann bei Injektion der gleichen Zellmenge wie in unseren Versuchen bereits nach 4 Wochen eine etablierte Kolitis festgestellt werden. In unseren Versuchen zeigte sich dagegen erst nach 6 Wochen eine etablierte Kolitis. Die durchflusszytometrische Untersuchung von $CD62L^+CD4^+$ Zellen lieferte hierfür eine Erklärung. Es zeigte sich, dass in einer aufgereinigten Fraktion dieser Zellpopulation nicht ausschließlich $CD4^+CD45RB^{high}$ -Zellen zu finden sind. Es gibt auch eine gewisse Zahl von $CD4^+CD45RB^{medium}$ -Zellen, die vermutlich das Entstehen einer Kolitis verzögern, nicht aber verhindern können. Kontrolltiere mit $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen erhielten- wie ebenfalls anhand der durchflusszytometrischen Untersuchung ersichtlich- eine Mischpopulation aus $CD45RB^{low}$ -, $CD45RB^{medium}$ - und $CD45RB^{high}$ -Zellen. Diese Tiere zeigten keinerlei Kolitis-Symptome und nahmen kontinuierlich an Gewicht zu, was beweist, dass die Anwesenheit von Memory-T-Helfer-Zellen das Auftreten einer Transferkolitis verhindern kann. Bei der verursachten Kolitis handelt es sich folglich um einen spezifischen Effekt, der ausschließlich durch aufgereinigte naive T-Helfer-Zellen verursacht wird. Im histologischen Bild zeigten sich bei Tieren mit $CD62L^+CD4^+$ Zellen ähnliche Veränderungen wie bereits für das $CD45RB^{high}$ -Modell beschrieben [86; 100].

Es kam zu massiven Zellinfiltraten, einer starken Verdickung der Mukosa, einem Verlust der Becherzellen und einer Verlängerung der Krypten. Diese Kolitis ähnelt insofern dem Morbus Crohn beim Menschen als sich die Entzündung nicht auf die intestinale Mukosa beschränkt sondern sämtliche Schichten der Darmwand betrifft. Die Transferkolitis wird durch T-Helfer-Zellen verursacht. Es handelt es sich also um eine Th1-Immunantwort, was ebenfalls dem Krankheitsbild bei MC entspricht.

In den Transferkolitis-Versuchen wurde im Durchschnitt bei Kontrolltieren nicht der maximale histologische Score von 4 erreicht und es kam zu Schwankungen im Score der Kontrollgruppen. Der Grund hierfür ist, dass wie bereits beschrieben 10% bis 25% der Tiere keine Kolitis entwickeln. Dies ist für das CD45RB^{high}-Modell bereits bekannt, wobei in der Literatur sogar von 20% bis 40% an Kontrolltieren berichtet wird, in denen die Kolitisinduzierung scheitert [147]. Dies zeigt sich auch im von uns verwendeten CD62L⁺CD4⁺ Modell. Allerdings ist die Erfolgsrate hier deutlich höher, da in 75% bis 90% der Tiere eine Kolitis induziert werden kann.

5.1.2. Charakterisierung der CD62L⁺CD4⁺ Zellen im FACS

Die durchflusszytometrische Charakterisierung der CD62L⁺CD4⁺ Zellen und der CD62L^{low}CD4⁺ Zellen zeigte neben den definitionsgemäßen Unterschieden weitere Abweichungen, aber auch Gemeinsamkeiten zwischen diesen Populationen. Beide Populationen zeigen in etwa die gleiche Expression von PD-L1 und dessen Ligand PD1. PD-L1 kann T- und B-Zell-Antworten inhibieren und T-Zell-Apoptose induzieren [25; 39]. Untersuchungen zeigten, dass es neben PD1 weitere, noch nicht bekannte Liganden für PD-L1 geben muss, da hier Effekte, die über PD-L1 vermittelt werden, keine Abhängigkeit von PD1 zeigten [25]. Für die fehlenden Unterschiede in der Expression von PD1 und PD-L1 kommen daher zwei alternative Erklärungen in Betracht. Die erste Möglichkeit ist, dass eventuelle Unterschiede in der Interaktion mit DX5⁺ NKT-Zellen nicht durch PD1/PD-L1, sondern ausschließlich mittels anderer Moleküle verursacht werden. Diese Erklärung erscheint angesichts des Effekts, den eine Blockierung von PD-L1 *in vitro* hat, unwahrscheinlich (siehe 5.2.2.). Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass es entweder auf T-Helfer-Zellen oder auf DX5⁺ NKT-Zellen einen weiteren Liganden für PD-L1 gibt, der für die Interaktionen dieser Zellpopulationen entscheidend ist.

Ein großer Unterschied ergab sich für die Expression von CD1d. Es ist auf CD62L⁺CD4⁺ Zellen 0,5x bis 2x häufiger zu finden als auf CD62L^{low}CD4⁺ Zellen. Im Hinblick auf eine immunregulatorische Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen im CD62L⁺CD4⁺ Modell ist dies ein sehr wichtiger Unterschied zwischen diesen Zellpopulationen, da CD1d entscheidend ist für die Aktivierung von DX5⁺ NKT-Zellen [46]. Das bedeutet, dass naive T-Helfer-Zellen ein größeres Potential haben, DX5⁺ NKT-Zellen zu aktivieren als Memory-T-Helfer-Zellen.

Auch für die co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD154 (=CD40L) ergaben sich Unterschiede zwischen CD62L⁺CD4⁺ Zellen und CD62L^{low}CD4⁺ Zellen. CD40 wird von 79% bis 90% der CD62L⁺CD4⁺ Zellen, aber nur von halb so vielen CD62L^{low}CD4⁺ Zellen exprimiert. CD154 ist auf CD62L⁺CD4⁺ Zellen deutlich, aber auf CD62L^{low}CD4⁺ Zellen kaum nachweisbar. Insgesamt unterscheiden sich die beiden untersuchten Zellpopulationen deutlich in ihrem Aktivierungsstatus [89; 104]. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sie auch unterschiedliche Reaktionen bei anderen Lymphozytenpopulationen induzieren. Die großen Unterschiede in der Expression von CD40 und CD154 resultieren aus diesem unterschiedlichen Aktivierungsstatus. Dies bedeutet auch, dass CD62L⁺CD4⁺ ein höheres Potential haben, NKT-Zellen aus der Milz zu stimulieren, die laut Literatur auf eine solche Aktivierung über CD40/CD154 angewiesen sind [142]. Sehr wichtig für die Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen auf CD4⁺ Subpopulationen ist die unterschiedliche Anwesenheit von CD1d auf CD62L⁺CD4⁺ und CD62L^{low}CD4⁺ Zellen. Durch die höhere Expression von CD1d auf CD62L⁺CD4⁺ Zellen werden DX5⁺ NKT-Zellen durch diese stärker aktiviert als durch CD62L^{low}CD4⁺ Zellen. Dies könnte als Ansatzpunkt für eine Therapie genutzt werden.

5.2. Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen

5.2.1. Isolierung und Charakterisierung von DX5⁺ NKT-Zellen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Methode zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz von Balb/c-Mäusen etabliert. DX5 wurde als Marker gewählt, da es eine gute Alternative zum klassischen NKT-Zell-Marker NK1.1 darstellt, der von den im Versuch verwendeten Balb/c-Mäusen nicht exprimiert wird. Darüber hinaus wurde die immunregulatorische Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen bereits in anderen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen beschrieben [49; 135]. Zur Aufreinigung von DX5⁺ NKT-Zellen wurde eine Sortierung in zwei Schritten gewählt, da NKT-Zellen nicht durch

einen spezifischen Marker sondern nur durch die Kombination mehrerer Marker definiert werden (z.B. $\alpha\beta$ TCR und NK1.1). Eine Negativsortierung von T-Zellen, gefolgt von einer Positivselektion der DX5⁺ NKT-Zellen erwies sich hier als die effektivste Methode. Durch Aufreinigungen mit zwei aufeinanderfolgenden Positivselektionen konnten keine vergleichbaren Ergebnisse erreicht werden. Die Ausbeute der DX5⁺ NKT-Zellen entsprach mit $0,75 \times 10^6$ bis 1×10^6 DX5⁺ NKT-Zellen aus einer Milz den Angaben in der Literatur [62; 125]. Faunce et al. beschreiben, dass die Zahl an NKT-Zellen in der Milz mit zunehmendem Alter der Tiere wächst [125]. Dies könnte eine Erklärung für abgeschwächte Immunantworten in älteren Menschen liefern. NKT-Zellen unterdrücken hier vermutlich Immunantworten über einen IL-10-abhängigen Mechanismus [125]. In der Milz von 3 Monate alten Mäusen finden sich insgesamt nur ca. $0,75 \times 10^6$ NKT-Zellen, während in der Milz von 18 Monate alten Mäusen bereits $1,4 \times 10^6$ NKT-Zellen zu finden sind. Im Alter von 22 Monaten steigt die Zahl der NKT-Zellen in der Milz sogar auf $3,25 \times 10^6$ an [125]. In dieser Arbeit wurden zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen Mäuse im Alter zwischen 3 und 6 Monaten verwendet, so dass die Zahl an NKT-Zellen bei diesen Tieren entsprechend den Ergebnissen von Faunce et al. zwischen $0,75 \times 10^6$ und $1,4 \times 10^6$ pro Milz liegen sollte. Die Ausbeute an DX5⁺ NKT-Zellen mit unserer Methode der magnetischen Sortierung liegt exakt in diesem Bereich.

Die Aufreinigung zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit und gute Reinheiten der isolierten Populationen. Nach dem ersten Aufreinigungsschritt, konnte für die isolierten T-Zellen routinemäßig eine Reinheit von >87% festgestellt werden. Dies stellt für eine Negativselektion ein sehr gutes Ergebnis dar. Nach dem zweiten Isolierungsschritt konnte für die DX5⁺ NKT-Zellen eine Reinheit von bis zu 94% erreicht werden, mit einer durchschnittlichen Reinheit von 91%. Die Isolierung von NKT-Zellen mittels einer magnetischen Sortierung in zwei Schritten stellt eine vollkommen neue Methode dar. Bisherige Versuche zur Aufreinigung von NKT-Zellen verwendeten meist eine Aufreinigung von T-Zellen durch magnetische Sortierung mit nachfolgender Sortierung im FACS entsprechend der Expression eines $\alpha\beta$ TCR und des Oberflächenmoleküls NK1.1 [158]. In diesen Versuchen konnten durch Verwendung des FACS-Sorters höhere Reinheiten der Zellen erreicht werden (> 95%). Allerdings handelt es sich hier um eine langwierige Isolierungsmethode, die das Vorhandensein eines teuren FACS-Sorters voraussetzt. Zusätzlich kann es durch die zur Sortierung eingesetzten elektrischen Spannungen zu einer Aktivierung der isolierten Zellen bereits während der Sortierung kommen, was eigentlich nicht erwünscht ist. Die von mir entwickelte

Methode ist dagegen in jedem Labor, ohne die Anschaffung kostspieliger Geräte möglich und führt zu keiner oder nur einer minimalen Aktivierung der isolierten Zellen. Mit der Methode der magnetischen Sortierung kann eine sehr gute Reinheit der isolierten Zellen erreicht werden, die der hohen Reinheit, die im FACS-Sorter erzielt werden kann, sehr nahe kommt. Meine Ergebnisse zeigen, dass es mit dieser Methode möglich ist, NKT-Zellen auch aus Mausstämmen zu isolieren, bei denen der klassische Marker NK1.1 nicht vorkommt. So kann die Funktion von NKT-Zellen auch in Tiermodellen für CED untersucht werden, die häufig mit Balb/c-Mäusen durchgeführt werden, die NK1.1 nicht exprimieren.

Bei den nach unserer Methode aufgereinigten DX5⁺ NKT-Zellen handelt es sich um NKT-Zellen der Kategorie 4 nach Park et al. dar, die als unabhängig von CD1d beschrieben werden [96]. Dies konnten unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Wie sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo*-Versuche zeigten (s.u.), sind die Zellen in ihrer Aktivierung abhängig von CD1d und exprimieren selbst CD1d. Laut Eberl et al. und Hammond et al. sind CD1d-abhängige Zellen meist DX5-negativ und daher nicht in der Population der CD3⁺/DX5⁺ Zellen enthalten [27; 51]. Auch dies konnten unsere Versuche nicht bestätigen. Allerdings wurden die Untersuchungen von Hammond et al. und Eberl et al. an NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen durchgeführt. DX5⁺ NKT-Zellen aus Balb/c-Mäusen, die wir in den hier beschriebenen Untersuchungen verwendet haben, könnten durchaus abweichende Charakteristika betreffend die Abhängigkeit von CD1d aufweisen. Die Charakterisierung im FACS zeigte, dass die von uns verwendeten DX5⁺ NKT-Zellen eine Mischpopulation zwischen CD4⁺ und DN Zellen darstellen, wobei die DN Zellen dominieren. Die von uns isolierten DX5⁺ NKT-Zellen exprimieren als β -Kette ihres TCR weder V β 8.1 noch V β 8.2, die laut Literatur bei 50% der NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen gefunden werden [46]. Sie unterscheiden sich hierin also von den am besten charakterisierten NK1.1⁺ NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Es zeigte sich eine deutliche Expression von $\alpha\beta$ TCR, die aber im Vergleich zu „normalen“ T-Zellen auf eine geringere Oberflächendichte hinweist. Dies wurde in der Literatur bereits für $\alpha\beta$ TCR⁺NK1.1⁺ T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen beschrieben, weshalb NKT-Zellen auch als „TCR^{intermediate} cells“ beschrieben werden [74]. Dies konnte hier für DX5⁺ NKT-Zellen aus Balb/c-Mäusen bestätigt werden.

DX5⁺ NKT-Zellen zeigen, wie auch in der Literatur für klassische NKT-Zellen angegeben, einen Memory-/Effektor-Phänotyp [51] und exprimieren CD45RB und CD38, nicht aber CD62L. CD25, einen Marker, der normalerweise mit regulatorischen

T-Zellen in Verbindung gebracht wird, konnten wir auf den von uns verwendeten DX5⁺ NKT-Zellen nicht nachweisen. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur klassischen Population an regulatorischen T-Helfer-Zellen, die als CD4⁺CD25⁺ beschrieben wird (=Treg). Ein weiteres Molekül, dem regulatorische Funktionen v.a. im Darm zugeschrieben werden, ist CD103. Es wird auf weniger als 5% der Lymphozyten im peripheren Blut, aber auf 45-50% der mononukleären Zellen in der Lamina propria (= intraepitheliale Lymphozyten= IEL) exprimiert [143]. CD103 vermittelt Adhäsion zwischen T-Zellen und Epithelzellen und kann über intrazelluläre Signale T-Zell-Funktionen beeinflussen. Auf DX5⁺ NKT-Zellen wird CD103 nicht exprimiert, so dass diese sich eindeutig von IEL unterscheiden.

Wichtig für die Funktion von Treg-Zellen ist CTLA-4. Dies ist ein Molekül, das Ähnlichkeiten zu CD28 aufweist, aber anders als CD28 nicht co-stimulatorisch wirkt, sondern vielmehr ein negativer Regulator von Immunantworten ist [57; 76; 102; 121]. Wie bereits in der Literatur für klassische $\alpha\beta$ TCR⁺NK1.1⁺ NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen beschrieben [142], konnte wir auch auf den von uns verwendeten DX5⁺ NKT-Zellen keine Expression von CTLA-4 nachgewiesen. Sie stellen demnach eine eigenständige Population an immunregulatorischen Zellen dar, die sich vermutlich auch in ihrer Funktionsweise von klassischen Treg-Zellen unterscheidet. Die co-stimulatorisch wirksamen Moleküle CD40 und dessen Ligand CD154 (=CD40L) werden von frisch isolierten DX5⁺ NKT-Zellen nicht exprimiert. Dies muss aber nicht bedeuten, dass CD154 von DX5⁺ NKT-Zellen grundsätzlich nicht exprimiert wird. Es sollten hier naive DX5⁺ NKT-Zellen charakterisiert werden. CD154 wird erst nach 6-8 Stunden auf aktivierten T-Zellen exprimiert, könnte also auch auf DX5⁺ NKT-Zellen erst nach Aktivierung zu finden sein [89; 104]. Experimente von Hayakawa et al., die *in vitro* eine Expression von CD154 auf klassischen NKT-Zellen nach 3stündiger Aktivierung mit α -GalCer beobachten konnten, bestätigen dies [142]. Eine Co-Stimulierung von T-Zellen durch DX5⁺ NKT-Zellen mittels CD154 ist also durchaus vorstellbar, auch wenn wir diesen Marker auf frisch isolierten DX5⁺ NKT-Zellen nicht nachweisen konnten. Ein weiteres co-stimulatorisches Molekül, das auf DX5⁺ NKT-Zellen zu finden ist, ist PD-L1. PD-L1 kann T- und B-Zell-Antworten inhibieren und spielt daher bei der Immunregulation eine wichtige Rolle [39]. Der einzig bekannte, aber wohl nicht einzige, Ligand für PD-L1, PD1, wird von DX5⁺ NKT-Zellen nur sehr schwach exprimiert: Einerseits könnte das darauf hinweisen, dass die Interaktion zwischen T-Zellen und DX5⁺ NKT-Zellen auf der Expression von PD-L1 und nicht PD1 durch DX5⁺ NKT-Zellen beruht. PD1 ist nicht auf allen CD62L⁺CD4⁺ Zellen zu finden. Zudem unterschieden

sich $CD62L^+CD4^+$ und $CD62L^{low}CD4^+$ Zellen in der Expression von PD1 nicht wesentlich. Da die beiden Zellpopulationen aber dennoch unterschiedlich mit $DX5^+$ NKT-Zellen interagieren (s.u.), wäre es möglich, dass hier ein noch nicht näher definierter anderer Ligand von PD-L1 für die Interaktion wichtig ist.

Marker, die für das Lymphozytenhoming wichtig sind, werden ebenfalls von $DX5^+$ NKT-Zellen exprimiert. So sind $DX5^+$ NKT-Zellen positiv für ICAM-1 und LFA-1, nicht aber für das Integrin $\alpha4\beta7$. Dies widerspricht den Ergebnissen von Kim et al., die in ihren Experimenten auf 60-90% der NKT-Zellen $\alpha4\beta7$ nachweisen konnten [59]. Allerdings wurden die Untersuchungen von Kim et al. an humanen Blutproben durchgeführt, was den Unterschied erklären könnte. Die von uns verwendeten $DX5^+$ NKT-Zellen besitzen also Oberflächenmoleküle, die es ihnen ermöglichen in entzündetes Gewebe zu migrieren. Es fehlen ihnen allerdings mit $CD62L$ und $\alpha4\beta7$ zwei Moleküle, die als sehr wichtig für das Migrationsverhalten in Darmgewebe beschrieben werden [144].

Es konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob $DX5^+$ T-Zellen den klassischen NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen entsprechen [51, 52, 130]. Die durchflusszytometrische Charakterisierung der von uns aus der Milz von Balb/c-Mäusen isolierten $DX5^+$ NKT-Zellen zeigt, dass diese Eigenschaften klassischer $\alpha\beta TCR^+NK1.1^+$ NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen aufweisen. Sie sind $CD4^+$ oder DN. Sie sind positiv für $CD45RB$ aber gleichzeitig $CD62L^{low}$. Sie sind genau wie klassische NKT-Zellen $\alpha\beta TCR^{intermediate}$ und weisen keine Marker von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen wie $CD25$ oder $CTLA-4$ auf. Diese FACS-Analyse zeigt also deutlich, dass $DX5^+$ NKT-Zellen ein Expressionsmuster von Oberflächenmarkern aufweisen wie es für NKT-Zellen charakteristisch ist.

5.2.2. Wirkung von $DX5^+$ NKT-Zellen im $CD62L^+CD4^+$ Modell

Die Ergebnisse unserer *in vitro* Versuche zeigen, dass $DX5^+$ NKT-Zellen Lymphozyten in Ko-Kultur zur Zytokinproduktion anregen können. Besonders interessant ist hier, dass die Bildung von IL-10 durch $CD4^+$ Zellen massiv gesteigert wird. IL-10 spielt bei CED eine sehr wichtige Rolle. Es trägt dazu bei, Th1-Zellen und Makrophagen in ihrer Entzündungsaktivität zu hemmen. IL-10-produzierende Lymphozyten können im $CD45RB^{high}$ -Transfermodell in SCID-Mäusen die Kolitis verhindern [124]. Auch in immunkompetenten Tieren spielt IL-10 eine Rolle bei der Immunregulierung. Asseman

et al. konnten zeigen, dass kolitis-induzierende Zellen auch in gesunden Tieren vorhanden sind, aber durch regulatorische T-Zellen über einen IL-10-abhängigen Mechanismus kontrolliert werden [6]. Die in unseren Versuchen ebenfalls zu beobachtende massive Steigerung der IFN γ -Bildung (eines Th1-Zytokins, das u.a. zur Aktivierung von Makrophagen führt) und der IL-4-Bildung (eines Th2-Zytokins) durch CD4⁺ Zellen, deutet auf zwei getrennt zu sehende Prozesse hin, die *in vitro* durch DX5⁺ NKT-Zellen induziert werden. Möglicherweise ist dieser Effekt auf die Anwesenheit zweier unterschiedlicher NKT-Zell-Populationen zurückzuführen (CD4⁺ und DN NKT-Zellen), die verschiedene Funktionen ausüben. So könnte die eine NKT-Population T-Helfer-Zellen in Richtung einer Th1-Antwort beeinflussen, während die zweite Population die Sezernierung von Th2-Zytokinen induziert. Eine gleichzeitige Ausschüttung von IFN γ und IL-4 durch ein und dieselbe T-Helfer-Zell-Population ist unwahrscheinlich. Es kommt also vermutlich zu einer Entstehung von zwei verschiedenen T-Helfer-Zell-Populationen, von denen die eine Th1-Zytokine und die andere Th2-Zytokine produziert, auch wenn dies mit den von uns verwendeten Methoden nicht aufgeklärt werden kann. Allerdings ist die Steigerung der IFN γ -Produktion nach Ko-Kultur im Vergleich zur IL-4- und IL-10-Produktion deutlich höher. DX5⁺ NKT-Zellen scheinen also *in vitro* in erster Linie eine Th1-Antwort zu induzieren. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen in der Literatur. So konnten Yang et al. zeigen, dass NKT-Zellen, aus verschiedenen Geweben unterschiedliche Wirkungen zeigen [130]. NKT-Zellen aus dem Thymus sind laut Yang et al. leichter aktivierbar und zeigen *in vitro* ein Zytokin-Profil, das mit einer gesteigerten IL-4-Produktion stark in Richtung einer Th2-Antwort geht. NKT-Zellen der Milz zeigen dagegen nach Aktivierung eine geringere Zytokin-Produktion, bei der sowohl IL-4 als auch IFN γ vermehrt gebildet werden. Die induzierte Immunantwort scheint in diesem Fall mehr in Richtung Th1 zu gehen. Yang et al. schließen aus ihren Ergebnissen, dass die unterschiedlichen Wirkungen von NKT-Zellen aus Thymus und Milz durch das jeweilige Umgebungsmilieu kontrolliert und durch die Antigenpräsentierenden Zellen des jeweiligen Gewebes geprägt werden [130].

Die Experimente mit CFSE-gefärbten Lymphozyten in Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen zeigten, dass DX5⁺ NKT-Zellen die Zahl an kolitis-verursachenden Lymphozyten in Ko-Kultur verringern. Nicht-aktivierte Lymphozyten werden dagegen gar nicht oder in geringerem Ausmaß beeinflusst. Der Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen scheint also spezifisch gegen aktivierte Lymphozyten gerichtet zu sein. Dies zeigte sich sowohl in den Versuchen mit aufgereinigten T-Helfer-Zellen aus gesunden Spendern als auch in

den Versuchen mit gemischten Lymphozytenpopulationen aus DSS-Tieren bzw. gesunden Tieren. Die Experimente mit einem irreversiblen Caspase-Inhibitor zeigten, dass die Verringerung der Zellzahl an Lymphozyten durch DX5⁺ NKT-Zellen zum Teil durch die Induzierung von Apoptose mittels Caspasen vermittelt wird. Die Wirkung dürfte einerseits auf Interaktionen zwischen Fas und FasL und in der daraus resultierenden Aktivierung von Caspasen beruhen, da NKT-Zellen konstitutiv FasL exprimieren [4]. Eine zweite Möglichkeit ergibt sich über den Perforin/Granzym-Weg [126]. Perforin bildet dabei Kanäle in der Membran der Zielzelle, durch die Granzyme ins Zellinnere vordringen können. Es handelt sich hier um Serinproteasen, die die Fragmentierung der DNA induzieren und so die Apoptose auslösen. Es konnte allerdings durch Verwendung des Caspase-Inhibitors keine vollkommene Unterdrückung des NKT-Zell-Effekts erreicht werden (Erhöhung der Zellzahl auf 63,8%, nicht aber auf 100% in den Versuchen mit naiven T-Helfer-Zellen). In den Versuchen mit Zellen aus DSS-Tieren zeigte der Inhibitor keine signifikante Wirkung. Dies zeigt, dass weitere Phänomene an der Verminderung der Lymphozytenzahl beteiligt sein müssen. Die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen in Ko-Kultur ist Zell-Zell-Kontakt-abhängig und geht bei Verwendung eines Transwell-Einsatzes verloren.

Verschiedene Oberflächenmoleküle scheinen für die Funktion der DX5⁺ NKT-Zellen wichtig zu sein. Ein Molekül, das im Zusammenhang mit NKT-Zellen gut bekannt ist, ist CD1d. Es wird beschrieben, dass NKT-Zellen über CD1d im Thymus selektioniert werden [11] und auch in der Peripherie in ihrer Aktivierung von CD1d abhängig sind [46]. Das zeigte sich auch für die von uns verwendeten DX5⁺ NKT-Zellen, die in der Literatur teilweise als CD1d-unabhängig beschrieben werden [51]. In unserem System mit DX5⁺ NKT-Zellen zeigte sich aber eine deutliche Abhängigkeit von CD1d. Die Blockierung von CD1d bewirkte in Ko-Kultur mit naiven T-Helfer-Zellen eine signifikante Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zur Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen und zeigte in Ko-Kultur mit DSS-Zellen zumindest eine Tendenz zu einer erhöhten Zellzahl. Die bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Abhängigkeit von NKT-Zellen von CD1d wurden an C57/BL6-Mäusen durchgeführt. Die DX5⁺ NKT-Zellen in meinen Versuchen stammen aus Balb/c-Mäusen. Offensichtlich gibt es zwischen NKT-Zellen aus diesen beiden Tierstämmen deutliche Unterschiede und die Ergebnisse aus der Literatur zu NKT-Zellen aus C57BL/6-Mäusen lassen sich nicht direkt auf NKT-Zellen aus Balb/c-Mäusen übertragen. Die Ergebnisse meiner Versuche zeigen eindeutig, dass die Aktivierung der DX5⁺ NKT-Zellen über CD1d erfolgt. Der blockierende Antikörper übt daher wahrscheinlich in erster Linie zu einem sehr frühen Zeitpunkt

seine Wirkung aus, da hierdurch die Aktivierung verhindert werden kann. Sehr wichtig für den Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen ist das Oberflächenmolekül PD-L1. Eine Blockierung von PD-L1 führt sowohl in Ko-Kultur mit naiven T-Helfer-Zellen als auch in Ko-Kultur mit DSS-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zur Ko-Kultur ohne blockierenden Antikörper. Allerdings ist noch unklar ob hier das auf DX5⁺ NKT-Zellen oder das auf CD4⁺-Lymphozyten exprimierte PD-L1 wichtig ist, da PD-L1 auf beiden Zellpopulationen zu finden ist. Der einzige bekannte Ligand von PD-L1 ist PD1, das auch durchflusszytometrisch auf T-Helfer-Zellen untersucht wurde. Dieses Molekül spielt aber offenbar keine Rolle. Die FACS-Analyse zeigte, dass es von naiven und von Memory-T-Helfer-Zellen gleich stark exprimiert wird, obwohl diese unterschiedlich mit DX5⁺ NKT-Zellen interagieren. Auf DX5⁺ NKT-Zellen ist PD1 dagegen überhaupt nicht vorhanden. Es muss also einen weiteren, noch unbekanntem, Liganden für PD-L1 geben, der entweder auf T-Helfer-Zellen oder auf DX5⁺ NKT-Zellen exprimiert wird und den Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen vermittelt.

Ergebnisse in der Literatur lassen darauf schließen, dass es bei der Regulierung der NKT-Zell-Wirkung zwischen CD1d und PD-L1 einen Zusammenhang geben könnte. Ikarashi et al. beschreiben, dass Dendritische Zellen (DC) in der Lage sind, NKT-Zellen sowohl zu aktivieren als auch zu inhibieren [151]. Unreife DC unterdrücken die IFN γ -Bildung durch NKT-Zellen über das MHC-Klasse-I-Molekül H2D, das durch Interaktion mit seinem Liganden Ly49 auf NKT-Zellen inhibierend wirkt. Ein gleichzeitig vorhandenes aktivierendes Signal über CD1d auf Dendritischen Zellen und den $\alpha\beta$ TCR auf den NKT-Zellen wird durch das sehr viel stärkere inhibierende Signal (H2D/Ly49) dominiert. Nach Aktivierung und Ausreifung der DC kommt ein drittes Signal hinzu. Dieses ist ein aktivierendes Signal und wird durch CD28 auf der DC und B7 auf der NKT-Zelle vermittelt. Es schwächt das inhibierende Signal ab, bewirkt eine Verstärkung des aktivierenden Signals über CD1d/ $\alpha\beta$ TCR und induziert so eine Aktivierung der NKT-Zelle [151]. Das von Ikarashi et al. beschriebene co-stimulatorische Molekül B7 ist eng mit PD-L1 verwandt, das von DX5⁺ NKT-Zellen exprimiert wird. Ich halte es daher für denkbar, dass eine solche Aktivierung von DX5⁺ NKT-Zellen auch durch CD62L⁺CD4⁺ Zellen verursacht werden kann, die ebenfalls das hierfür erforderliche MHC-Klasse-I-Molekül H2D exprimieren [152]. Allerdings ist noch unklar, welches Molekül auf der Oberfläche der CD62L⁺CD4⁺ Zellen als Ligand für PD-L1 dient (siehe auch Abbildung 48).

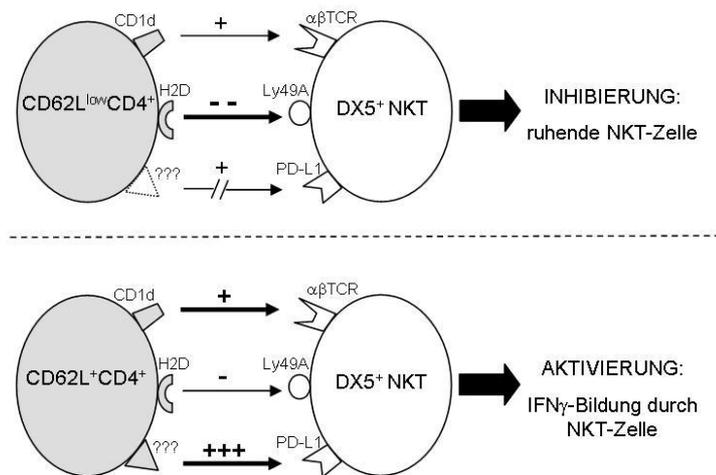


Abbildung 48: Schematische Darstellung zur möglichen Aktivierung von DX5⁺NKT-Zellen durch CD62L⁺CD4⁺ Zellen: die Interaktion von CD62L^{low}CD4⁺ Zellen mit DX5⁺ NKT-Zellen führt zu einer Inhibierung der NKT-Zell-Wirkung, da hier das inhibierende Signal, das durch H2D und Ly49 vermittelt wird, dominiert (oben). Die Interaktion von CD62L⁺CD4⁺ Zellen mit DX5⁺ NKT-Zellen dagegen bewirkt eine Aktivierung der NKT-Zelle. CD62L⁺CD4⁺ Zellen liefern ein starkes aktivierendes Signal, das über PD-L1 auf der NKT-Zelle vermittelt wird. Dies bewirkt eine Dominanz der aktivierenden Signale durch PD-L1, sowie CD1d/αβTCR über das inhibierende Signal und führt zu einer Aktivierung der NKT-Zelle (unten) [modifiziert nach 151].

Eine wichtige Rolle bei der Interaktion von DX5⁺ NKT-Zellen mit anderen Zellen spielen CD40 und CD154 (=CD40-Ligand). CD40 wird von DX5⁺ NKT-Zellen nicht exprimiert, ist aber auf 87% der naiven T-Helfer-Zellen und nur auf 45% der Memory-T-Helfer-Zellen zu finden. Dies würde auch erklären, warum naive T-Helfer-Zellen vom Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen sehr viel stärker betroffen sind als Memory-T-Helfer-Zellen. Gleichzeitig bedeutet dies aber auch, dass auf NKT-Zell-Seite der Effekt über den CD40-Liganden CD154 vermittelt werden muss. Auf frisch isolierten DX5⁺ NKT-Zellen konnten wir CD154 nicht nachweisen. Es wird also vermutlich erst nach Aktivierung hochreguliert. Eine Blockierung von CD40 oder CD154 führt zu einer Unterdrückung der NKT-Zell-Wirkung. Der Effekt des Antikörpers gegen CD40 ist deutlicher ausgeprägt als der des CD154-Antikörpers. Dies zeigte sich sowohl in den Versuchen mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen als auch in den Versuchen mit DSS-Zellen. Die Reduzierung der Lymphozytenzahl nach Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen entspricht vermutlich einer

Th1-Antwort. In der Literatur wird beschrieben, dass über CD40/CD154 Th1-Antworten von NKT-Zellen induziert werden und gleichzeitig Th2-Antworten unterdrückt werden [142]. Dieser Effekt beruht auf der Hochregulation von IFN γ . Dadurch wird die CD28-Co-Stimulierung und Entstehung einer Th2-Antwort unterdrückt.

Bei Versuchen mit gemischten Populationen mononukleärer Zellen aus der Milz von DSS-Mäusen sind die Wirkungen der DX5⁺ NKT-Zellen geringer. Auch die Blockierung dieser Effekte erweist sich hier als schwieriger als in Ko-Kultur mit aufgereinigten T-Helfer-Zellen. Dieses Ergebnis ist nachvollziehbar, da die gemischten Zellpopulationen aus der Milz mit zytotoxischen T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Dendritischen Zellen neben T-Helfer-Zellen auch andere Zellpopulationen beinhalten. Es handelt sich hier um aktivierte Zellen, die durch die Anwesenheit von APZ und von proinflammatorischen Faktoren (z.B. Zytokine) weiterhin stark stimuliert werden. Diese Populationen sind daher schwieriger zu kontrollieren als eine definierte Population, die nur aus T-Helfer-Zellen besteht.

Die Prozesse, die während der Ko-Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen ablaufen, kann man sich wie folgt vorstellen: Zunächst kommt es zu einer Aktivierung von DX5⁺ NKT-Zellen in Abhängigkeit von CD1d. Welches Molekül hierbei von CD1d präsentiert wird, ist unklar. Es muss sich aber hier anders als bei der Kontrolle von Infektionen um ein körpereigenes Molekül handeln. Anschließend werden die Zielzellen über einen PD-L1- und/oder CD40/CD154-abhängigen Weg getötet. Dies geschieht zumindest teilweise durch Caspase-Aktivierung und daraus resultierende Apoptose-Induzierung und entspricht einer Th1-Antwort.

In vitro zeigten DX5⁺ NKT-Zellen vielversprechende Wirkungen auf kolitis-induzierende Zellen. Diese Wirkung wurde anschließend auch in einem Tiermodell für CED untersucht. Es wurden zuerst die Auswirkungen einer präventiven Gabe von DX5⁺ NKT-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass durch den Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen die Entstehung einer Kolitis im CD62L⁺CD4⁺ Transfermodell verhindert werden kann. Dies zeigt sich in der positiven Gewichtsentwicklung der Tiere und im Fehlen kolitis-assoziiierter histologischer Veränderungen. CD8⁺ Kontrollzellen zeigen keine vergleichbare Wirkung und unterscheiden sich in ihrer Wirkung nicht von der unbehandelten Kontrollgruppe. Der Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen ist also spezifisch auf diese Zellen zurückzuführen. Die regulatorische Wirkung von NKT-Zellen konnte bereits in anderen Kolitis-Modellen gezeigt werden. So konnten z.B. Saubermann et al.

durch Aktivierung von NKT-Zellen mit α GalCer eine deutliche Verbesserung einer DSS-Kolitis erreichen [106]. Im TNBS-Kolitis-Modell konnte nachgewiesen werden, dass NK1.1⁺ T-Zellen aus der Leber zur Induzierung einer Immuntoleranz notwendig sind [157]. Meine Arbeit ist allerdings die erste, die sich mit der Wirkung eines Transfers aufgereinigter DX5⁺ NKT-Zellen in einem Kolitis-Modell beschäftigt. In Untersuchungen, die die Wirkung regulatorischer T-Zellen bzw. IL-10-produzierender T-Zellen im Transferkolitis-Modell überprüften, zeigten sich ähnlich positive Effekte wie sie auch in unseren Versuchen durch DX5⁺ NKT-Zellen verursacht wurden [124; 145]. In den genannten Veröffentlichungen zeigten sich ebenfalls nur geringe histologische Veränderungen und kein Gewichtsverlust der Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen. DX5⁺ NKT-Zellen sind also in ihrer Wirkung im Transferkolitis-Modell durchaus mit klassischen regulatorischen T-Zellen zu vergleichen.

Es besteht eine Abhängigkeit der Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen von CD1d. Wird die Aktivierung der DX5⁺ NKT-Zellen durch die Gabe eines Antikörpers gegen CD1d verhindert, wird dadurch der Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen unterdrückt. Da monoklonale Antikörper *in vivo* eine Halbwertszeit von bis zu 28 Tagen aufweisen, kann durch die Gabe des Antikörpers zum Zeitpunkt des Transfers der DX5⁺ NKT-Zellen die Aktivierung der frisch injizierten DX5⁺ NKT-Zellen im vollen Ausmaß verhindert werden. In der zwischen den Injektionen liegenden Zeit von 14 Tagen kommt es zu keinem Wirkungsverlust des Antikörpers. Wie also auch bereits *in vitro* zu beobachten sind DX5⁺ NKT-Zellen auch *in vivo* in ihrer Aktivierung abhängig von CD1d. Die wichtige Bedeutung von CD1d, gerade im CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitismodell, unterstreichen auch weitere in unserer Arbeitsgruppe festgestellte Ergebnisse. Mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR am Lightcycler wurden Kolon-Epithelzellen aus gesunden Balb/c-Mäusen, aus C.B17-SCID-Mäusen, die mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen rekonstituiert wurden und aus C.B17-SCID-Mäusen mit CD62L^{low}CD4⁺ Zellen auf die Expression von CD1d untersucht. Es zeigte sich, dass Epithelzellen aus gesunden Mäusen und aus Mäusen mit CD62L^{low}CD4⁺ Zellen in etwa die gleiche Expression von CD1d aufweisen. Epithelzellen des Kolons von Tieren mit CD62L⁺CD4⁺ Zellen dagegen exprimieren ca. doppelt soviel CD1d wie die beiden erstgenannten Gruppen [unveröffentlichte Daten]. Im CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitismodell findet sich daher eine Umgebung, die für die Aktivierung der injizierten DX5⁺ NKT-Zellen optimal ist. Durch die systemische Gabe eines Antikörpers gegen CD1d wird diese Aktivierung verhindert und dadurch der regulatorische Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen unterdrückt. Auch im Menschen könnte es bei CED zu einer Hochregulierung von CD1d auf Epithelzellen des Darms kommen. In

einem solchen Milieu wäre der Einsatz regulatorisch wirksamer NKT-Zellen, die spezifisch durch dieses Molekül auf den Epithelzellen aktiviert werden, ein vielversprechender Ansatz.

Die präventive Gabe von DX5⁺ NKT-Zellen entspricht natürlich nicht dem klinischen Problem. Hier muss eine Möglichkeit gefunden werden, einen Patienten mit bereits existierender Kolitis zu therapieren. Unsere Versuche zeigten, dass durch den Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen auch eine bereits bestehende Kolitis therapiert werden kann. Dies zeigte sich sowohl in der Gewichtsentwicklung als auch im histologischen Bild. Die Injektion von CD8-Kontrollzellen zeigt bei der therapeutischen ebenso wenig eine Wirkung wie bei der präventiven Gabe.

Im Tiermodell zeigt sich, dass DX5⁺ NKT-Zellen immunregulatorische Eigenschaften besitzen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Population tatsächlich um „NKT-Zellen“ handelt. Der Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen kann nicht nur eine Kolitis verhindern sondern auch eine bestehende Kolitis therapieren. Am deutlichsten wird der Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen im histologischen Bild, wo signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den mit DX5⁺ NKT-Zellen behandelten Gruppen festzustellen sind. Auch der Gewichtsverlauf ist bei behandelten Tieren gegenüber Kontrolltieren deutlich verbessert. Auf welche Art und Weise die Kolitis durch den Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen verhindert bzw. therapiert wird, konnte im vorliegenden Versuchsaufbau nicht festgestellt werden. Da es sich aber bei der CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis um eine Th1-vermittelte Kolitis handelt, liegt der Schluss nahe, dass DX5⁺ NKT-Zellen ihre Funktion ausüben, indem sie diese Th1-Immunantwort unterdrücken (siehe auch Abb. 49). Dies wurde bereits mehrfach für $\alpha\beta$ TCR⁺NK1.1⁺ NKT-Zellen beschrieben [19; 50; 60; 115; 137] und liefert für die beobachteten Effekte die sinnvollste Erklärung.

Die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen ist abhängig von der Aktivierung über CD1d und kann durch einen blockierenden Antikörper gegen CD1d unterdrückt werden. Die Expression von CD1d durch Zellen am Entzündungsort ist daher von essentieller Bedeutung für die Effektivität der injizierten NKT-Zellen. Ohne CD1d kommt es zu keiner Aktivierung und damit auch nicht zu den regulatorischen Effekten der NKT-Zellen. Unsere Versuche zeigen, dass DX5⁺ NKT-Zellen *in vivo* Th1-Immunantworten unterdrücken. Sie stellen daher eine vielversprechende Zellpopulation dar, um

Autoimmunerkrankungen zu therapieren, die durch eine Th1-Antwort verursacht werden.

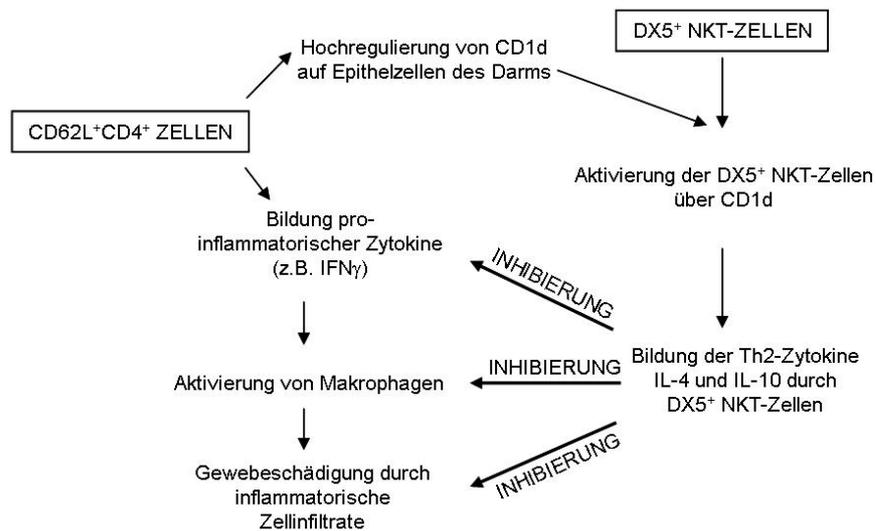


Abbildung 49: Schematische Darstellung der möglichen Wirkungsweise von DX5⁺ NKT-Zellen im Transferkolitis-Modell: DX5⁺ NKT-Zellen werden durch CD1d auf den Epithelzellen des Darms aktiviert. Sie bilden daraufhin die Th2-Zytokine IL-4 und/oder IL-10. Dadurch werden die inflammatorischen Prozesse, die normalerweise zur Entzündungsreaktion mit nachfolgender Gewebszerstörung führen würden, inhibiert.

5.3. Ausblick

Wir konnten hier zeigen, dass die NKT-Zellpopulation der DX5⁺ NKT-Zellen das Potential hat CED im Tiermodell zu therapieren. Dies stellt einen vielversprechenden Ansatz für eine CED-Therapie auch beim Menschen dar, wo sich die medikamentöse Behandlung oft als sehr schwer erweist. Allerdings ist noch sehr wenig über die Mechanismen bekannt, die der Wirkung von NKT-Zellen zugrunde liegen. Die Theorie, dass NKT-Zellen Th1-Immunantworten zugunsten von Th2-Antworten unterdrücken, liefert zwar eine gute Erklärung für die durch NKT-Zellen verursachten Effekte, konnte aber bisher nicht eindeutig bewiesen werden. Vor einer therapeutischen Anwendung von NKT-Zellen in Patienten sollte erst mehr über die Funktionsweise dieser Zellen bekannt sein. Das immunregulatorische Potential von NKT-Zellen, das bereits

mehrfach beschrieben wurde, ist immens. NKT-Zellen könnten nicht nur eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen spielen, sondern auch immunologische Prozesse nach Transplantationen kontrollieren, sowie stimuliert werden, aktiv Tumore zu bekämpfen.

Wichtig für die therapeutische Verwendung von NKT-Zellen sind genaue Informationen über das Krankheitsbild. Der Einsatz von NKT-Zellen bei Autoimmunkrankheiten, die durch eine Th2-Immunantwort vermittelt werden, wäre angesichts der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse aus Tierversuchen sehr bedenklich. Für die chronisch entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa stellen daher NKT-Zellen vermutlich keine sinnvolle Therapie dar. Bei Morbus Crohn dagegen- einer Th1-vermittelten Erkrankung- könnte der Einsatz von NKT-Zellen erfolgversprechend sein.

Man muss allerdings bedenken, dass sich die experimentellen Ergebnisse aus Tiermodellen nicht immer direkt auf die Situation beim Menschen übertragen lassen. So ist bei der Maus eine strikte Unterscheidung von Th1- und Th2-Zellen und den dadurch vermittelten Immunantworten möglich. Beim Menschen dagegen kann bei vielen Erkrankungen keine klare Abtrennung dieser Immunantworten getroffen werden, und Th1-Zellen kommen gleichzeitig mit Th2-Zellen vor [81]. Dennoch scheinen NKT-Zellen auch beim Menschen regulatorisches Potential zu haben bzw. spielen eine Rolle bei einigen Erkrankungen.

Da bei Autoimmunerkrankungen wie CED häufig eine NKT-Zell-Defizienz bzw. eine eingeschränkte Funktion vorliegt, müssten für eine therapeutische Verwendung in Patienten NKT-Zellen der Betroffenen aus deren Blut isoliert werden und *ex vivo* vermehrt und aktiviert werden [119; 128]. Eine Verwendung von allogenen- in ihrer Funktion nicht eingeschränkten- NKT-Zellen aus gesunden Spendern würde immunologische Probleme mit sich bringen wie sie bei jeder Transplantation von Fremdgewebe zu beobachten sind. Es wäre also eine immunsuppressive Behandlung der Patienten nötig. Der zu erwartende Nutzen des NKT-Zell-Transfers würde dieses nicht rechtfertigen, so dass die Situation der Übertragung allogener Zellen vermieden werden sollte. Für die Isolierung von menschlichen NKT-Zellen aus Blut gibt es bereits vielversprechende Ansätze. Kim et al. verwendeten zur Aufreinigung von NKT-Zellen aus peripherem Blut den Marker V β 11, der eine bestimmte β -Kette des TCR erkennt, die von den meisten NKT-Zellen exprimiert wird [59]. Zur Aufreinigung von NKT-Zellen aus Leberbiopsien verwendeten Morsy et al. den Marker CD56, der auf ca. 23,1% der

intrahepatischen T-Zellen zu finden ist [138]. Allerdings kann mit dieser Methode nur eine Subpopulation der NKT-Zellen detektiert werden [59]. In ersten Vorversuchen in unserem Labor konnten wir zeigen, dass eine magnetische Sortierung humaner NKT-Zellen mit Hilfe der Marker CD3 und CD56 möglich ist. Es konnten dabei aus einer Menge von 50ml Blut gesunder Spender bis zu $1,5 \times 10^6$ NKT-Zellen gewonnen werden.

Ein weiterer Schritt wäre nun die Anreicherung von NKT-Zellen in Zellkultur und ihre Aktivierung- evtl. mittels α GalCer. Für die Kultivierung und Anreicherung muriner CD8⁺ NKT-Zellen konnten Baker et al. eine Methode entwickeln [139]. Hier wurden CD8⁺ NKT-Zellen in Anwesenheit von humanem IL-2 kultiviert und mit murinem IFN γ sowie gebundenem anti-CD3 Antikörper aktiviert. Dies führte zu einer Anreicherung von CD8⁺ Zellen, die auch die NK-Zell-Marker NK1.1 und DX5 exprimieren. Eine weitere Möglichkeit ist die Kultivierung mit α GalCer-beladenen APZ. Die Aktivierung von NKT-Zellen *in vitro* mittels α GalCer ist eine etablierte Methode und wurde schon mehrfach beschrieben [140; 141]. Auf der Grundlage dieser Vorarbeiten sollte es also möglich sein, ein Protokoll zu entwickeln mit dessen Hilfe NKT-Zellen aus dem Blut von Patienten gewonnen, *in vitro* expandiert und aktiviert werden können. Diese Prozesse müssten dann unter GMP-Bedingungen stattfinden. Es muss allerdings sorgfältig überprüft werden, ob die NKT-Zellen durch die Kultivierung und Aktivierung nicht in ihrer Wirkungsweise verändert werden, da dies möglicherweise negative Effekte in Patienten auslösen und im schlimmsten Fall Krankheiten nicht heilen sondern fördern könnte. Zu diesem Zweck wäre es sinnvoll, ein Markerpanel festzulegen, das nur von nachweislich immunregulatorischen NKT-Zellen exprimiert wird, so dass diese eindeutig identifiziert werden können. Veränderungen, die negative Effekte bewirken würden, sollten mit Hilfe eines solchen Panels detektiert werden können.

Die weitere Erforschung von NKT-Zellen und deren Wirkungsweise ist von großer Bedeutung, um zukünftig eine gefahrlose und gezielte therapeutische Verwendung von NKT-Zellen zu ermöglichen. Gerade für schwer therapierbare Erkrankungen wie MC stellt dies eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Therapie dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen die Krankheitsbilder Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Beide sind chronische Entzündungen des Gastrointestinaltrakts, von denen in Europa etwa 2,2 Millionen Menschen, in den USA etwa 1,4 Millionen Menschen betroffen sind. Bei CED kommt es zu einer überschießenden Immunreaktion auf bakterielle Antigene im Darm, die vom Immunsystem eines Gesunden toleriert werden. Bei MC äußert sich dies in einer Th1-vermittelten Immunantwort mit einem Ungleichgewicht zwischen Effektor- und regulatorischen Zellen. Bei CU dagegen handelt es sich um eine Th2-vermittelte Immunantwort, die durch die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie das Auftreten von Autoantikörpern geprägt wird. Durch medikamentöse Behandlung können nur die Symptome von CED gelindert werden, oft aber verbunden mit erheblichen Nebenwirkungen. Abgesehen von einer Proktokolektomie bei CU gibt es keine Heilung für CED. Eine vielversprechende Alternative in der CED-Therapie stellt eine Behandlung mit körpereigenen Zellen dar, die immunregulatorisch wirken.

Eine Zellpopulation, die die überschießende Immunreaktion bei CED kontrollieren und somit zu einer möglichen Heilung beitragen könnte, sind NKT-Zellen. Hier handelt es sich um Zellen, die sowohl Eigenschaften von T-Zellen (Expression eines $\alpha\beta$ T-Zellrezeptors) als auch Eigenschaften von NK-Zellen (Expression von NK-Zellmarkern wie z.B. NK1.1) besitzen und erstmals bei C57BL/6-Mäusen beschrieben wurden. NKT-Zellen können nicht eindeutig dem angeborenem oder dem erworbenem Immunsystem zugeordnet werden und sind in ihrer Entwicklung und Aktivierung meist abhängig vom MHC-Klassel-ähnlichen Molekül CD1d. In der Literatur wurden bereits mehrfach regulatorische Funktionen für NKT-Zellen beschrieben. NKT-Zellen bewirken *in vivo* eine Unterdrückung von Th1-Immunantworten. Der klassische Marker für NKT-Zellen NK1.1 wird allerdings von einigen in Labors verwendeten Mausstämmen wie z.B. Balb/c-Mäusen nicht exprimiert, was die Definition von NKT-Zellen in diesen Tierstämmen erschwert. Gerade bei Kolitis-Modellen werden häufig Balb/c-Mäuse bzw. verwandte Stämme eingesetzt, so dass die Verwendung anderer Marker für NKT-Zellen nötig ist. DX5⁺ NKT-Zellen werden über CD3 und den NK-Zell-Marker DX5 definiert, der eine Alternative zum Marker NK1.1 darstellt. In den letzten Jahren konnte schlüssig nachgewiesen werden, dass DX5⁺ T-Zellen neben CD3 und DX5 auch andere NKT-Zell-Marker exprimieren und immunregulatorische Funktionen besitzen wie sie bei NK1.1⁺ Zellen zu finden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tiermodell der CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitis neu etabliert. In diesem Modell wird durch den Transfer von naiven T-Helfer-Zellen (CD62L⁺CD4⁺) in kongene immundefiziente Mäuse eine Kolitis induziert, die Ähnlichkeiten zu MC aufweist. Dies ist möglich, da diese Tiere keine regulatorischen T-Zellen besitzen. Um die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen zu untersuchen wurde eine Methode zur Isolierung von DX5⁺ NKT-Zellen aus der Milz von Balb/c-Mäusen entwickelt. Sowohl die kolitisinduzierenden naiven T-Helfer-Zellen (CD62L⁺CD4⁺) als auch die DX5⁺ NKT-Zellen wurden durchflusszytometrisch anhand der Expression von Oberflächenmarkern charakterisiert. Die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen wurde im Th1-vermittelten CD62L⁺CD4⁺ Transferkolitismodell *in vitro* und *in vivo* untersucht. In einem zweiten Tiermodell wurde die Wirkung von DX5⁺ NKT-Zellen auf Lymphozyten aus Tieren mit DSS-Kolitis, die durch Gabe der Chemikalie Dextranatriumsulfat in immunkompetenten Tieren induziert wird, *in vitro* überprüft. Zusätzlich wurde die Bedeutung co-stimulatorischer Moleküle für die Funktion der DX5⁺ NKT-Zellen untersucht.

Sowohl naive T-Helfer-Zellen als auch DX5⁺ NKT-Zellen wurden mit der Methode des „magnetic activated cell sorting“ (= MACS) aus der Milz gesunder, weiblicher Balb/c-Mäuse gewonnen. Es wurde hierfür eine Isolierung in zwei Schritten durchgeführt. Nach einer Negativselektion von CD4⁺ Zellen bzw. T-Zellen wurden CD62L⁺CD4⁺ Zellen oder DX5⁺ NKT-Zellen durch eine Positivselektion aufgereinigt. Die Charakterisierung im FACS zeigte, dass naive T-Helfer-Zellen die co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD154 (CD40L) und PD-L1 exprimieren, die für die Stimulierung von NKT-Zellen eine wichtige Bedeutung haben. Zusätzlich konnte das für die Aktivierung von NKT-Zellen wesentliche Molekül CD1d auf CD62L⁺CD4⁺ Zellen nachgewiesen werden. DX5⁺ NKT-Zellen zeigten in der durchflusszytometrischen Untersuchung neben der Expression der definierenden Marker CD3 und DX5 auch die Expression eines $\alpha\beta$ TCR und von CD1d. DX5⁺ NKT-Zellen stellen eine gemischte Population aus CD4⁻CD8⁻ doppelt negativen und CD4⁺ positiven NKT-Zellen dar. Auf ihrer Oberfläche konnte die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 gezeigt werden, die ihnen die Migration in entzündetes Gewebe ermöglichen. Gleichzeitig konnte keine Expression von Markern klassischer regulatorischer T-Zellen wie CD25 oder intrazelluläres CTLA-4 nachgewiesen werden. Um *in vitro* die Interaktionen zwischen DX5⁺ NKT-Zellen und naiven T-Helfer-Zellen zu untersuchen, wurden Ko-Kultur-Versuche durchgeführt. In Ko-Kultur mit naiven T-Helfer-Zellen, die im Tiermodell in immundefizienten Tieren eine Kolitis induzieren, wurde durch die Anwesenheit von

DX5⁺ NKT-Zellen die Produktion der Zytokine IL4, IL-10 und IFN γ durch naive T-Helfer-Zellen signifikant im Vergleich zur Einzelkultur gesteigert. Nach Färbung der T-Helfer-Zellen mit dem Farbstoff CFSE zeigte sich nach 4tägiger Kultur mit DX5⁺ NKT-Zellen eine signifikant verringerte Zahl an CFSE-positiven Zellen im Vergleich zur Einzelkultur. Die Zahl an Memory T-Helfer-Zellen, die im Tier keine Kolitis induzieren, wurde dagegen nicht vermindert. Dies zeigte sich auch in Ko-Kultur mit mononukleären Zellen, die aus immunkompetenten Tieren mit DSS-Kolitis bzw. aus gesunden Tieren gewonnen wurden. Die Funktion der DX5⁺ NKT-Zellen war abhängig von direktem Zellkontakt und konnte nur teilweise durch einen Caspase-Inhibitor blockiert werden. Die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen war abhängig von der Aktivierung über CD1d und von den co-stimulatorischen Molekülen PD-L1, CD40 und CD154, da durch entsprechende blockierende Antikörper der Effekt der DX5⁺ NKT-Zellen unterdrückt werden konnte. Ergebnisse in der Literatur lassen darauf schließen, dass *in vitro* ein enger Zusammenhang zwischen CD1d und PD-L1 besteht. Hierbei liefert CD1d auf T-Helfer-Zellen ein aktivierendes Signal für NKT-Zellen, das aber durch ein inhibierendes Signal durch die Moleküle H2D auf T-Helfer-Zellen und Ly49 auf NKT-Zellen überlagert wird. Zur Aktivierung von NKT-Zellen kommt es erst bei Vorhandensein eines weiteren aktivierenden Signals, das durch Moleküle der B7-Familie wie PD-L1 geliefert wird.

CD62L⁺CD4⁺ Zellen induzierten ca. 6 Wochen nach Injektion in kongene C.B17 SCID-Mäuse eine Kolitis, die sich in Gewichtsverlust und anhaltenden Durchfällen äußerte. Im histologischen Score, der die Schwere einer Kolitis anhand histologischer Schnitte des Kolons beurteilt, konnte nach 6 bis 8 Wochen eine deutlich ausgeprägte Kolitis nachgewiesen werden. Der Transfer von DX5⁺ NKT-Zellen konnte bei präventiver Gabe zum Zeitpunkt der Kolitisinduzierung die Entstehung einer Kolitis verhindern, was sich sowohl im Gewichtsverlauf der Tiere als auch im histologischen Score zeigte. CD8⁺ Kontrollzellen zeigten keinen solchen Effekt. Die Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen *in vivo* konnte durch einen blockierenden Antikörpers gegen CD1d unterdrückt werden und zeigte daher eine deutliche Abhängigkeit von CD1d. Bei therapeutischer Gabe der DX5⁺ NKT-Zellen, d.h. bei bestehender Kolitis wurde die Krankheit deutlich verbessert. Dies zeigte sich wiederum im besseren Gewichtsverlauf und signifikant niedrigeren histologischen Score im Vergleich zur Kontrollgruppe. CD8⁺ Kontrollzellen zeigten keine therapeutische Wirkung.

DX5⁺ NKT-Zellen verringerten *in vitro* die Zahl aktivierter Lymphozyten und konnten im Tierversuch, eine experimentelle Kolitis verhindern und auch therapieren. Der

Mechanismus, der der immunregulatorischen Wirkung der DX5⁺ NKT-Zellen bei experimenteller Kolitis zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse, dass es wie bereits in der Literatur für andere Modelle von Autoimmunerkrankheiten beschrieben, auch bei Th1-vermittelter Kolitis *in vivo* zu einer Unterdrückung der überschießenden Th1-Immunantwort kommt. DX5⁺ NKT-Zellen liefern daher vielversprechende Ansätze für eine Therapie Th1-vermittelter Autoimmunerkrankungen wie MC mit immunregulatorischen Zellen.

SUMMARY

The term inflammatory bowel disease (IBD) describes the diseases Crohn's disease (MC) and ulcerative colitis (CU). About 2.2 Million patients in Europe and 1.4 Million patients in the U.S. suffer from these chronic inflammations of the gastrointestinal tract. The cause for IBD is still unknown, therefore an effective treatment of IBD is difficult. The development of IBD shows an exaggerated immune response to bacterial antigens in the gut that are tolerated by a normal immune system. In MC this results in a Th1-mediated immune response with an imbalance between effector- and regulatory T-cells. UC is a Th2-mediated immune response characterized by the cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 as well as by the presence of auto-antibodies. Medication can only help ease the symptoms and is often connected with severe side effects. Besides surgical intervention in CU there is no cure for IBD. Regulatory cell populations which can downregulate the exaggerated immune response in IBD patients could represent a promising alternative in the treatment of IBD.

A cell population that could have regulatory influences on IBD and could help cure IBD are NKT cells. These cells share properties with T-cells (expression of a $\alpha\beta$ T-cell-receptor) and NK cells (expression of NK cell markers e.g. NK1.1) and were first described in C57BL/6-mice. NKT cells cannot be defined definitely as part of the innate or the acquired immune system and depend on the MHC-class-I-like molecule CD1d in their development and activation. Regulatory functions of NKT cells have frequently been postulated in literature. The most likely mechanism of this regulation is that NKT cells suppress Th1 immune responses. However many mouse strains used in research like Balb/c mice do not express the classical marker for NKT cells NK1.1. Many IBD animal models use Balb/c-mice or related strains so that the use of surrogate NKT-cell markers in these strains is necessary. DX5⁺ NKT cells are defined by CD3 and the NK-cell marker DX5 which is an alternative to the classical marker NK1.1. In the last years it has been shown that DX5⁺ T-cells express markers of NKT cells and show immunoregulatory functions like NK1.1⁺ cells do. So, DX5 in combination with CD3 is suitable as a marker for NKT cells and an alternative for NK1.1.

In this work the animal model of CD62L⁺CD4⁺ transfercolitis was established in the lab. In this model with similarities to MC colitis is induced by the transfer of naïve T-helper cells (CD62L⁺CD4⁺) in congenic immunodeficient mice which lack regulatory T-cells. A method for the purification of DX5⁺ NKT cells from the spleen of Balb/c mice was

developed. Colitis-inducing naïve T-helper-cells (CD62L⁺CD4⁺) as well as DX5⁺ NKT cells were characterized by the expression of surface markers with flow cytometry. The function of DX5⁺ NKT cells was tested *in vitro* and *in vivo* in the Th1-mediated model of the CD62L⁺CD4⁺ transfercolitis. In a second model the effect of DX5⁺ NKT cells on lymphocytes from animals with DSS-colitis *in vitro* was examined. Additionally the importance of co-stimulatory molecules for the function of DX5⁺ NKT cells was investigated.

CD62L⁺CD4⁺ cells and DX5⁺ NKT cells were purified from the spleens of healthy female Balb/c mice by magnetic bead isolation (=MACS). Therefore a method for the purification in two steps was chosen. Following a negative selection of CD4⁺ cells or T-cells CD62L⁺CD4⁺ cells or DX5⁺ NKT cells respectively were purified by positive selection. FACS-characterization showed that CD62L⁺CD4⁺ cells express the co-stimulatory molecules CD40, CD154 (CD40L) and PD-L1 which are important for the stimulation of NKT cells. Simultaneously CD1d, a molecule that is essential for the activation of NKT cells could be found on CD62L⁺CD4⁺ cells. Flow cytometric analysis demonstrated the expression of an $\alpha\beta$ TCR and CD1d besides the expression of the markers CD3 and DX5 on DX5⁺ NKT cells. DX5⁺ NKT cells represent a mixed population of CD4CD8 double negative and CD4 positive NKT cells. On their surface the adhesion molecules ICAM-1 and LFA-1 which mediate the migration in inflamed tissue could be found. Classical markers of regulatory T-cells like CD25 or CTLA-4 were not expressed by DX5⁺ NKT cells. The interactions between DX5⁺ NKT cells and naïve T-helper-cells were examined by coculture experiments. In coculture with CD62L⁺CD4⁺ cells which induce colitis in the animal model DX5⁺ NKT cells significantly upregulated the production of the cytokines IL-4, IL-10 and IFN γ by CD62L⁺CD4⁺ cells. After CFSE-staining of CD62L⁺CD4⁺ cells the number of CFSE-positive cells was significantly reduced in comparison to a single culture of CD62L⁺CD4⁺ cells after 4 days of coculture with DX5⁺ NKT cells. On the other hand the number of CD62L^{low}CD4⁺ cells which don't induce colitis in animals was not reduced. This result could be confirmed in coculture with mononuclear cells from immunocompetent mice with DSS-colitis or from healthy mice respectively where only cells from DSS-mice but not cells from healthy mice were killed. The effect of DX5⁺ NKT cells was dependant on cell-cell-contact and could only partly be blocked by a caspase-inhibitor. For their function DX5⁺ NKT-cells needed activation via CD1d and co-stimulatory molecules. Monoclonal antibodies against CD1d, PD-L1, CD40 or CD154 blocked the effect. Results in the literature show that there may be a close connection between CD1d and PD-L1 at least

in vitro. Here an activating signal for NKT cells by CD1d on T helper cells is suppressed by an inhibitory signal delivered by H2D on T helper cells and Ly49 on NKT cells. For the activation of NKT cells a second activating signal which is mediated by members of the B7-family like PD-L1 is needed to overcome inhibition.

After injection in congenic C.B17-SCID-mice CD62L⁺CD4⁺ cells induced colitis with weight loss and diarrhea within about six weeks. The histologic score that evaluates the severity of colitis based on histologic sections of the colon, showed a distinct colitis after six to eight weeks. In the animal model the transfer of DX5⁺ NKT cells at the time of colitis-induction prevented colitis what was reflected in the animals' weight as well as in the histologic score. CD8⁺ control cells showed no effect. The effect of DX5⁺ NKT cells *in vivo* could be blocked by a monoclonal antibody against CD1d. The therapeutic administration of DX5⁺ NKT cells in animals with established colitis ameliorated the disease. This was reflected in the weight of the animals as well as in a significantly lower histologic score in comparison to the control group. CD8⁺ control cells showed no therapeutic effect.

DX5⁺ NKT cells reduced the number of activated lymphocytes *in vitro*. *In vivo* DX5⁺ NKT cells showed the potential to prevent and cure experimental colitis in an animal model. The underlying mechanism is not known up to now. Certainly our results confirm that a suppression of the exaggerated Th1 immune response *in vivo* like it is described in the literature for other autoimmune diseases is also likely in Th1-mediated colitis. Therefore DX5⁺ NKT cells are a promising approach for a therapy of Th1-mediated autoimmune diseases like MC with immunoregulatory cells.

7. LITERATUR

1. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003; 124(1): 40-46
2. Andersson RE. Meta-analysis of the clinical and laboratory diagnosis of appendicitis. *Br. J. Surg.* 2004; 91(1): 28-37
3. Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4⁺, CD45RB^{high} T cells to SCID recipients. *J. Immunol.* 1997; 158: 3464-3473
4. Arase H, Arase N, Kobayashi Y, Nishimura Y, Yonehara S, Onoe K. Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J. Exp. Med.* 1994; 180(2): 423-432
5. Arase H, Arase N, Ogasawara K, Good RA, Onoe K. An NK1.1+ CD4+8- single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V beta family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1992; 89(14): 6506-6510
6. Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4⁺ regulatory T cells and IL-10. *J. Immunol.* 2003; 171: 971-978
7. Ballas ZK, Rasmussen W. NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4- CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5+, CD44-, TCR-Vβ8+ subset. *J. Immunol.* 1990; 145: 1039-1045
8. Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J. Exp. Med.* 1996; 184(4): 1285-1293
9. Bendelac A, Killeen N, Littman DR, Schwartz RH. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 1994; 263(5154): 1774-1778

10. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 535-562
11. Bendelac A. Mouse NK1+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 367-374
12. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301(5900): 527-530
13. Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR, Sweet HO, Shultz LD, Bosma MJ. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics* 1989; 29(1): 54-57
14. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9: 323-350
15. Bosma MJ. The scid mutation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1989; 152: 3-9
16. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(7): 521-533
17. Brimnes J, Reimann J, Nissen MH, Claesson MH. Enteric bacterial antigens activate CD4⁺ T cells from SCID mice with inflammatory bowel disease. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 23-31
18. Budd RC, Miescher GC, Howe RC, Lees RK, Bron C, MacDonald HR. Developmentally regulated expression of T cell receptor β chain variable domains in immature thymocytes. *J. Exp. Med.* 1987; 166: 577-582
19. Burdin N, Brossay L, Kronenberg M. Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29(6): 2014-2025
20. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 1999; 163(9): 4647-4650

21. Cardell S, Tangri S, Chan S, Kronenberg M, Benoist C, Mathis D. CD1-restricted CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1995; 182(4): 993-1004
22. Cui J, Watanabe N, Kawano T, Yamashita M, Kamata T, Shimizu C, Kimura M, Shimizu E, Koike J, Koseki H, Tanaka Y, Taniguchi M, Nakayama T. Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated Valpha14 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 1999; 190(6): 783-792
23. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant Valpha24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J. Exp. Med.* 1994; 180(3): 1171-1176
24. Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107(6): 1643-1652
25. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 2002; 8(8): 793-800
26. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102(3): 448-455
27. Eberl G, Lees R, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J. Immunol.* 1999. 162: 6410-6419
28. Eberl G, MacDonald HR. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30(4): 985-992
29. Elewaut D, Kronenberg M. Molecular biology of NKT cell specificity and development. *Immunology.* 2000; 12: 561-568

30. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109(4): 1344-1367
31. Emoto M, Emoto Y, Buchwalow IB, Kaufmann SH. Induction of interferon-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29(2): 650-659
32. Ernst DN, Weigle WO, Noonan DJ, McQuitty DN, Hobbs MV. The age-associated increase in IFN- γ -synthesis by mouse CD8⁺ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 expression. *J. Immunol.* 1993; 151: 575-587
33. Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. Requirements for CD1d recognition by human invariant V α 24⁺ CD4-CD8⁻ T cells. *J. Exp. Med.* 1997; 186(1): 109-120
34. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Joyce R, Avigan D, Sackstein R, Balk SP. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J. Immunol.* 2001; 167(10): 5531-5534
35. Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Sarvetnick N. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependant diabetes mellitus. *J. Exp. Med.* 1999; 190(7): 963-972
36. Farkas SA, Hornung M, Sattler C, Steinbauer M, Anthuber M, Obermeier F, Herfarth H, Schlitt HJ, Geissler EK. Preferential migration of CD62L⁺ cells into the appendix in mice with experimental chronic colitis. *Eur. Surg. Res.* 2005; 37: 115-122
37. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, Hurwitz R, Kursar M, Bonneville M, Kaufmann SHE, Schaible UE. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *PNAS* 2004; 101(29): 10685-10690

38. Fowlkes BJ, Kruisbeck AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM. A novel population of T-cell receptor $\alpha\beta$ -bearing thymocytes which predominantly expresses a single V β gene family. *Nature*. 1987; 329: 251-254
39. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000; 192(7): 1027-1034
40. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(10): 1490-1497
41. Mercer JC, Ragin MJ, August A. Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. *IJBCB*. 2005; 37: 1337-1343
42. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983; 304: 30-34
43. Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* 2001; 2(10): 971-978
44. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, von Blumberg BM, Scheper RJ, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJ, Roelvink M, Beijnen J, Zwierzina H, Pinedo HM. A phase I study of the killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8(12): 3702-3709
45. Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJ. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand. J. Gastroenterol.* 1987; 22: 1009-1024

46. Godfrey DI, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today*. 2000; 21: 573-583
47. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 2004; 114(10): 1379-1388
48. Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Carnaud C, Bach JF. Early quantitative and functional deficiency of NK1+like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26(12): 2989-2998
49. Gonzalez A, Andre-Schmutz I, Carnaud C, Mathis D, Benoist C. Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes. *Nat. Immunol.* 2001; 2(12): 1117-1125
50. Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependant diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* 1998; 187(7): 1047-1056
51. Hammond KJL, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, Van Driel IR, Scollay R, Baxter AG, Godfrey DI. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 3768-3781
52. Hammond KJL, Pellicci DG, Poulton LD, Naidenko OV, Scalzo AA, Baxter AG, Godfrey DI. CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J. Immunol.* 2001; 167: 1164-1173
53. Hugot JP. Inflammatory bowel disease: a complex group of genetic disorders. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2004; 18(3): 451-462
54. Jung TM, Gallatin WM, Weissman IL, Dailey MO. Down-regulation of homing-receptors after T cell activation. *J. Immunol.* 1988; 141: 4110-4117
55. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(1): 6-10

56. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Konodo E, Koseki H, Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glysoylceramides. *Science* 1997; 278(5343): 1626-1629
57. Kearney ER, Walunas TL, Karr RW, Morton PA, Loh DY, Bluestone JA, Jenkins MK. Antigen-dependant clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependant on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J. Immunol.* 1995; 155(3): 1032-1036
58. Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 1998; 114(5): 1066-1090
59. Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among Valpha 24(+) Vbeta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood.* 2002; 100(1): 11-16
60. Kitamura H, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Nakui M, Yahata T, Meng H, Koda T, Nishimura S, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T. alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells. *Cell. Immunol.* 2000; 199(1): 37-42
61. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 107: 353-358
62. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 557-568
63. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 2002; 109(1): 131-140

64. Lan F, Zeng D, Higuchi M, Huie P, Higgins JP, Strober S. Predominance of NK1.1⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ or DX5⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells in mice conditioned with fractionated lymphoid irradiation protects against graft-versus-host disease: "Natural suppressor" cells. *J. Immunol.* 2001; 167: 2087-2096
65. Lantz O, Sharara LI, Tilloy F, Andersson A, DiSanto JP. Linear relationships and differentiation of natural killer (NK) T cells: intrathymic selection and interleukin (IL)-4 production in the absence of NKR-P1 and Ly49 molecules. *J. Exp. Med.* 1997; 185(8): 1395-1401
66. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 2002; 195(5): 637-641
67. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002; 110(6): 793-800
68. Lee WT, Pelletier WJ. Visualizing memory phenotype development after *in vitro* stimulation of CD4⁺ T cells. *Cell. Immunol.* 1998; 188: 1-11
69. Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese mice against diabetes. *J. Exp. Med.* 1998; 188(10): 1831-1839
70. Liu Z, Geboes K, Colpart S, Overbergh L, Mathieu C, Heremans H, De Boer M, Boon L, D'Haens G, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions. *J. Immunol.* 2000; 164: 6005-6014
71. Loftus EV. Clinic epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126(6): 1504-1517

72. MacDonald HR, Lees RK, Held W. Developmentally regulated extinction of Ly-49 receptor expression permits maturation and selection of NK1.1⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1998; 187(12): 2109-2114
73. MacDonald HR. Development and selection of NKT cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14(2): 250-254
74. MacDonald HR. NK1.1⁺ T cell receptor- α/β ⁺ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 633-638
75. Makino Y, Kanno R, Koseki H, Taniguchi M. Development of V α 4⁺ NK T cells in the early stages of embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93(13): 6516-6520
76. Marengère LE, Waterhouse P, Duncan GS, Mittrucker HW, Feng GS, Mak TW. Regulation of T cell receptor signalling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science.* 1996; 272(5265): 1170-1173
77. Margalit M, Ilan Y, Ohana M, Safadi R, Alper R, Sherman Y, Doviner V, Rabbani E, Engelhardt D, Nagler A. Adoptive transfer of small numbers of DX5⁺ cells alleviates graft-versus-host disease in a murine model of semiallogenic bone marrow transplantation: a potential role for NKT lymphocytes. *Bone Marrow Transplantation.* 2004; 1-7
78. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 2000; 192(5): 741-754
79. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama A, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, Umesaki Y. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut.* 1998; 43: 71-78
80. Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1991; 100(1): 3-12

81. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* 2004; 172: 2731-2738
82. Molano A, Park SH, Chiu YH, Nosseir S, Bendelac A, Tsuji M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependant and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *J. Immunol.* 2000; 164(10): 5005-5009
83. Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002; 50 Suppl. 3: III60-64
84. Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, Ullrich SE. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat. Immunol.* 2000; 1(6): 521-525
85. Morita M, Natori T, Akimoto K, Osawa T, Fukushima H, Koezuka Y. Syntheses of α -, β -monoglycosylceramides and four diastereomers of an α -galactosylceramide. *Bioorg. and Med. Chem. Letters* 1995; 5(7): 699-704
86. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 237-244
87. Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L⁺ CD4⁺ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology.* 2002; 70: 170-176
88. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, Schleipman RA, Glickman J, Bailey DT, Corazza N, Colgan SP, Onderdonk AB, Blumberg RS. CD1d-dependant macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat. Med.* 2002; 8(6): 588-593

89. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89(14): 6550-6554
90. Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Grunwald N, Herfarth H, Schölmerich J, Falk W. Contrasting activity of cytosine-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 134: 217-224
91. Ohteki T, MacDonald HR. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J. Exp. Med.* 1994; 180(2): 699-704
92. Ohteki T, Okuyama R, Seki S, Abo T, Sugiura K, Kusumi A, Ohmori T, Watanabe H, Kumagai K. Age-dependant increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J. Immunol.* 1992; 149(5): 1562-1570
93. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, Motohashi Y, Nakagawa Y, Irie J, Maruyama T, Saruta T. High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25(10): 1818-1823
94. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector functions. *J. Exp. Med.* 2003; 198(7): 1069-1076
95. Osman Y, Kawamura T, Naito T, Takeda K, Van Kaer L, Okumura K, Abo T. Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30(7): 1919-1928
96. Park SH, Weiss A, Benlagha K, Kyin T, Teyton L, Bendelac A. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J. Exp. Med.* 2001; 193(8): 893-904
97. Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependant

- NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependant precursor stage. *J. Exp. Med.* 2002; 195(7): 835-844
98. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St. George-Hyslop PH, Siminovich KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's disease. *Nat. Genet.* 2004; 36: 471-475
99. Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 589-600
100. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Barcomb CL, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 1993; 5: 1461-1471
101. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B, Florin TH. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2002; 51(6): 808-813
102. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen plays an essential role in the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 295-302
103. Reimann J, Rudolphi A, Claesson MH. Novel experimental approaches in the study of the immunopathology in inflammatory bowel disease. *J. Mol. Med.* 1995; 73(3): 133-140
104. Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 1993; 151(5): 2497-2510
105. Russel MG, Dorant E, Brummer RM, Van de Krujjs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrügger RW, South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's

- disease: results of a large case-control study. *Gastroenterology*. 1997; 113: 377-382
106. Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanaucji O, Motoki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS. Activation of Natural Killer T cells by α -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology*. 2000; 119: 119-128
107. Scheynius A, Camp RL, Puré E. Reduced contact sensitivity reactions in mice treated with monoclonal antibodies to leukocyte function-associated molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1. *J. Immunol*. 1993; 150: 655-663
108. Seino K, Fukao K, Muramoto K, Yanagisawa K, Takada K, Kakuta S, Iwakura Y, Van Kaer L, Takeda K, Takada Y, Nakayama T, Taniguchi M, Bashuda H, Yagita H, Okumura K. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *PNAS* 2001; 98(5): 2577-2581
109. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch DL, Gombert JM, Leite-de-Moracs M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A. Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat. Med*. 2001; 7: 1057-1062
110. Singh B, Powrie F, Mortensen NJ. Immune therapy in inflammatory bowel disease and models of colitis. *Br. J. Surg*. 2001; 88(12): 1558-1569
111. Skold M, Cardell S. Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells. *Eur. J. Immunol*. 2000; 30(9): 2488-2496
112. Slifka MK, Pagarigan RR, Whitton JL. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J. Immunol*. 2000; 164(4): 2009-2015

113. Smithson JE, Radford-Smith G, Jewell GP. Appendectomy and tonsillectomy in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 1995; 21: 283-286
114. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependant. *J. Immunol.* 2000; 165(5): 2665-2670
115. Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J. Exp. Med.* 1999; 190(9): 1215-1226
116. Stenström M, Sköld M, Ericsson A, Beaudoin L, Sidobre S, Kronenberg M, Lehuen A, Cardell S. Surface receptors identify mouse NK1.1+ T cell subsets distinguished by function and T cell receptor type. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 56-65
117. Strober W, Nakamura K, Kitani A. The SAMP1/Yit mouse: another step closer to modeling human inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2001; 107(6): 667-669
118. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seeger D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 2004; 36: 476-480
119. Sumida T, Sakamoto A, Murata H, Makino Y, Takahashi H, Yoshida S, Nishioka K, Iwamoto I, Taniguchi M. Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J. Exp. Med.* 1995; 182(4): 1163-1168
120. Taniguchi M, Nakayama T. Recognition and function of Valpha14 NKT cells. *Semin. Immunol.* 2000; 12(6): 543-550
121. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue

- destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995; 3(5): 541-547
122. Kikly K, Dennert G. Evidence for extrathymic development of NKT cells. NK1+CD3+ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J. Immunol.* 1992; 149(2): 403-412
123. Van der Vliet HJJ, Molling JW, von Blomberg BME, Nishi N, Kölgen W, van den Eertwegh AJM, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin. Immunol.* 2004; 112: 8-23
124. Van Montfrans C, Rodriguez Pena MS, Pronk I, Ten Kate FJW, Te Velde AA, Van Deventer SJH. Prevention of colitis by Interleukin 10-transduced T lymphocytes in the SCID mice transfer model. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1865-1876
125. Faunce DE, Palmer JL, Paskowicz KK, Witte PL, Kovacs EJ. CD1d-restricted NKT cells contribute to the age-associated decline of T cell immunity. *J. Immunol.* 2005; 175: 3102-3109
126. Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 211-222
127. Wilson SB, Kent SC, Horton HF, Hill AA, Bollyky PL, Hafler DA, Strominger JL, Byrne MC. Multiple differences in gene expression in regulatory V α J α Q T cells from identical twins discordant for type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 7411-7416
128. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391: 177-181
129. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet*. 1993; 341(8858): 1437-1439

130. Yang Y, Ueno A, Bao M, Wang Z, Seon Im J, Porcelli S, Yoon JW. Control of NKT cell differentiation by tissue-specific microenvironments. *J. Immunol.* 2003; 171: 5913-5920
131. Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S, Lan F, Garcia-Ojeda M, Sibley R, Strober S. Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J. Exp. Med.* 1999; 189(7): 1073-1081
132. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11(6): 648-656
133. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature.* 2005; 434(7032): 525-529
134. Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science.* 2004; 306(5702): 1786-1789
135. Fritz RB, Zhao ML. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the C57BL/6J mouse by NK1.1+, DX5+, alpha beta+ T cells. *J. Immunol.* 2001; 166(6): 4209-4215
136. Chen H, Huang H, Paul WE. NK1.1+ CD4+ T cells lose NK1.1 expression upon in vitro activation. *J. Immunol.* 1997; 158(11): 5112-5119
137. Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J. Immunol.* 1999; 163(5): 2373-2377

138. Morsy MA, Norman PJ, Mitry R, Rela M, Heaton ND, Vaughan RW. Isolation, purification and flow cytometric analysis of human intrahepatic lymphocytes using an improved technique. *Lab. Invest.* 2005; 85: 285-296
139. Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8+ natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood.* 2001; 97(10): 2923-2931
140. D'Andrea A, Goux D, De Lalla C, Koezuka Y, Montagna D, Moretta A, Dellabona P, Casorati G, Abrignani S. Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 1544-1550
141. Maeda M, Lohwasser S, Yamamura T, Takei F. Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J. Immunol.* 2001; 167: 4180-4186
142. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J. Immunol.* 2001; 166(10): 6012-6018
143. Schon MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsal J, Donohue JP, Her H, Beier DR, Olson S, Lefrancois L, Brenner MB, Grusby MJ, Parker CM. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J. Immunol.* 1999; 162(11): 6641-6649
144. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity.* 1995; 3(1): 99-108
145. Denning TL, Kim G, Kronenberg M. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. *J. Immunol.* 2005; 174(12): 7487-7491
146. Asseman C, Fowler S, Powrie F. Control of experimental inflammatory bowel disease by regulatory T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162(4 Pt 2): S185-189

147. Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology*. 2002; 70: 121-130
148. Hoppe-Seyler P, Lausen M, Schölmerich J. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. *Broschüre Falk Foundation e.V.* 1998
149. Tsuda H, Sakai M, Michimata T, Tanebe K, Hayakawa S, Saito S. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2001; 45(5): 295-302
150. Arase H, Saito T, Phillips JH, Lanier LL. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha2integrin, very late antigen-2). *J. Immunol.* 2001; 167(3): 1141-1144
151. Ikarashi Y, Mikami R, Bendelac A, Terme M, Chaput N, Terada M, Tursz T, Angevin E, Lemonnier FA, Wakasugi H, Zitvogel L. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon γ production. *J. Exp. Med.* 2001; 194(8): 1179-1186
152. Claesson MH, Endel B, Ulrik J, Pedersen LO, Skov S, Buus S. Antibodies directed against monomorphic and evolutionary conserved self epitopes may be generated in "knock-out" mice. Development of monoclonal antibodies directed against monomorphic MHC class I determinants. *Scand. J. Immunol.* 1994; 40: 257-264
153. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, Noelle RJ, Coyle A, Mellor AL, Khoury SJ, Sayegh MH. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J. Exp. Med.* 2005; 202(2): 231-237
154. Mittag A, Lenz D, Gerstner AOH, Sack U, Steinbrecher M, Kokschi M, Raffael A, Bocsí J, Tárnok A. Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets. *Cytometry A*. 2005; 65A: 103-115
155. Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen

- L, Watanabe M. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J. Immunol.* 2003; 171: 4156-4163
156. LaBelle JL, Truitt RL. Characterization of a murine NKT cell tumor previously described as an acute myelogenous leukaemia. *Leuk. Lymphoma.* 2002; 43(8): 1637-1644
157. Trop S, Samsonov D, Gotsman I, Alper R, Diment J, Ilan Y. Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology.* 1999; 29: 746-755
158. Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 2005; 202(9): 1279-1288

8. DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Edward K. Geissler für seine Unterstützung, sein Vertrauen und sein Engagement bezüglich dieser Arbeit. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schmitt für die Übernahme der fakultätsinternen Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. med. Stefan Farkas und Herrn Dr. med. Matthias Hornung, die die Idee für eine zelluläre Therapie bei Kolitis durch NKT-Zellen entwickelten, für ihre fachliche und moralische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Gudrun Köhl für viele anregende und produktive Diskussionen und für das Korrekturlesen des Manuskripts. Ich bedanke mich bei Frau Dr. med. Beate Exner für ihren äußerst kompetenten Nachhilfeunterricht in Sachen Durchflusszytometrie.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Karoline Edtinger und Frau Manuela Kovacs für die Erstellung der Histologischen Schnitte und HE-Färbungen, sowie tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Mein ganz großer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen im Labor, die mit ihrer Freundschaft und guten Laune die Moral auch nach Rückschlägen aufrechterhielten und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich beim Tierärztlichen Dienst der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Dr. med. vet. Thilo Spruss ganz herzlich für die hervorragende Betreuung der Versuchstiere bedanken. Mein besonderer Dank gilt dem Tierpflegermeister Herrn Engelbert Meier für seine Hilfe und Unterstützung gerade in der Anfangszeit meiner Tierexperimente.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, die bereitwillig ihren Labor-Ersatzschlüssel zur Verfügung stellten, so dass ich auch am Wochenende oder zu späterer Stunde FACS-Analysen durchführen konnte.

Ich danke Frau Gabriele Volkmann und Herrn Josef Volkmann für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Ich danke meiner Familie für all ihre Unterstützung. Dafür, dass sie mir die nötigen Gene mitgegeben haben, jederzeit Vertrauen in mich hatten und dass sie mich sowohl in moralischer als auch finanzieller Hinsicht immer unterstützt haben.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg im Januar 2006

(Christine Sattler)