

**Modulation intestinaler
Entzündungsreaktionen durch die
Antigenbeladung dendritischer Zellen über
den Oberflächenrezeptor DEC-205**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Munisch-Kumar Wadwa

aus Kandahar, Afghanistan

Juni 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Astrid M. Westendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. Karl Lang

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Tag der Disputation: 13.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Das Immunsystem.....	7
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	7
1.1.2	Das adaptive Immunsystem.....	11
1.1.3	Das intestinale Immunsystem	19
1.1.4	Toleranzinduktion über den DEC-205 Oberflächenrezeptor	24
1.2	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	27
1.2.1	Klinisches Krankheitsbild	27
1.2.2	Ätiologie	29
1.2.3	Therapien.....	32
1.2.4	Mausmodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	33
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	37
2	Material & Methoden	39
2.1	Materialien	39
2.1.1	Chemikalien	39
2.1.2	Medien, Puffer und Lösungen.....	39
2.1.3	Primerpaare	40
2.1.4	Antikörper.....	41
2.2	Mausstämme	41
2.2.1	BALB/c.....	41
2.2.2	VILLIN-HA.....	42
2.2.3	SPC-HA	42
2.2.4	TCR-HA	42
2.2.5	Foxp3-GFP	42
2.2.6	RAG2 ^{-/-}	42

2.3	Genotypisierung transgener Mausstämmes.....	42
2.4	Biochemische Methoden	43
2.4.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen..	43
2.4.2	Herstellung von Antikörper-Peptid-Konjugaten	44
2.4.3	SDS-PAGE und Western Blot.....	45
2.5	Molekularbiologische Methoden	45
2.5.1	RNA-Isolierung.....	45
2.5.2	cDNA-Synthese	46
2.5.3	Quantitative Real-Time PCR.....	46
2.5.4	Transkriptomanalysen (Microarrays).....	47
2.6	Tierexperimentelle Methoden	48
2.6.1	Organentnahme	48
2.6.2	Entzündungsmodelle	48
2.6.3	Behandlung von Mäusen zur Untersuchung von Toleranzmechanismen	49
2.7	Zellbiologische Methoden.....	50
2.7.1	Kultivierung von Hybridomzelllinien für die Antikörperproduktion.....	50
2.7.2	Gewinnung von Einzelzellsuspensionen	50
2.7.3	Isolierung verschiedener Immunzellpopulation	52
2.7.4	Durchflusszytometrie	52
2.7.5	Sortieren verschiedener Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie	53
2.7.6	Analyse der Proliferation von Lymphozyten	54
2.7.7	Differenzierung von HA-spezifischen T _H 1-Zellen	54
2.7.8	<i>In vitro</i> Migrationsexperimente	55
2.7.9	Aktivierung von CD11c ⁺ dendritischen Zellen	55
2.7.10	Detektion sezernierter Zytokine	56
2.8	Histologische Untersuchungen.....	56

2.8.1	Histopathologische Analyse von Maudärmen	56
2.8.2	Fluoreszenzmarkierung humaner Darmbiopsien	57
2.9	Statistik.....	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Herstellung von Antikörper-Antigen-Konjugaten.....	59
3.2	Funktionalität der Antikörper-Antigen-Konjugate	60
3.3	Therapeutische Immunmodulation in der intestinalen Mukosa.....	62
3.3.1	Etablierung eines antigen-spezifischen Entzündungsmodells der Darmmukosa	62
3.3.2	DEC-HA Behandlung verhindert die Entzündungsinduktion im VILLIN-HA Kolitis Modell	65
3.3.3	Etablierung eines antigen-spezifischen T _H 1-Zell vermittelten Entzündungsmodells der Darmmukosa.....	69
3.3.4	DEC-HA Behandlung hat einen protektiven Effekt im T _H 1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell	72
3.3.5	Die Behandlung mit DEC-HA führt zu einer verminderten Migration von antigen-spezifischen T _H 1-Zellen in die Mukosa.....	76
3.4	CXCR3-abhängige Migration von CD4 ⁺ T-Zellen in den Darm.....	80
3.4.1	Differentielle Expression von CXCR3 im peripheren Blut und Darmbiopsien von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten.....	80
3.4.2	Applikation eines CXCR3 Antagonisten für die Therapie intestinaler Entzündung	83
3.4.3	IL-10 beeinflusst die CXCR3-abhängige Migration von T _H 1-Zellen.....	87
3.5	Therapeutische Immunmodulation in der Lunge	93
3.5.1	Etablierung eines T _H 1-Zell vermittelten Lungenentzündungsmodells ...	93
3.5.2	DEC-HA Behandlung führt im T _H 1-Zell vermittelten Lungenentzündungsmodell zu einem geringen Schutz vor Entzündung	94
4	Diskussion	99
5	Zusammenfassung	116

6	Summary	118
7	Literaturverzeichnis	120
8	Anhang	137
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	137
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	140
8.3	Tabellenverzeichnis.....	143
8.4	Anlagen	144
	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	145
	Danksagung.....	147
	Lebenslauf	148
	Erklärungen.....	150

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ermöglicht es seinem Wirt, von außen eindringende pathogene Organismen wie z.B. Bakterien, Viren oder Parasiten aktiv zu bekämpfen. Parallel zu dieser Schutzfunktion muss das Immunsystem zwischen pathogenen und körpereigenen bzw. für den Körper ungefährlichen Strukturen unterscheiden und gegenüber diesen eine immunologische Toleranz ausbilden.

Das Immunsystem wird in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt, die sich in der Zusammensetzung der beteiligten Zellen, Moleküle und der Funktion bei der Immunabwehr deutlich voneinander unterscheiden, aber für eine erfolgreiche Bekämpfung von schädlichen Einflüssen konstant miteinander agieren. Sowohl das angeborene als auch adaptive Immunsystem vermitteln ihre Funktion durch zelluläre und nicht-zelluläre (humorale Immunantwort) Komponenten.

In den folgenden Kapiteln werden beide Arme des Immunsystems mit Beschreibung beteiligter Immunzellen näher erläutert.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt den ersten zellulären Abwehrmechanismus gegenüber von außen eindringende Pathogene dar. Die angeborene Immunantwort läuft sehr schnell, dafür aber Antigen-unspezifisch ab. Nach dem Eindringen eines Erregers (z.B. Bakterien, Viren oder Parasiten) werden Bestandteile dieser Organismen von den Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt, zu denen u.a. neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) gehören. Die Erkennung läuft dabei über Rezeptoren auf der Oberfläche der Immunzellen ab, die als *pattern recognition receptors* (PRRs) bezeichnet werden, wozu u.a. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. *toll-like receptor*, TLR) gehören. Diese Rezeptoren erkennen hochkonservierte pathogene Strukturen (PAMPs, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), bakterielle DNA oder virale RNA. Als Reaktion auf die PRR-Stimulation produzieren die Immunzellen verstärkt Signalstoffe wie Chemokine und Zytokine. Chemokine induzieren die Migration weiterer Immunzellen zum

Infektionsherd, Zytokine führen zu deren Aktivierung bzw. Differenzierung für den optimalen Verlauf der Pathogenbekämpfung.

Darüber hinaus verfügen Makrophagen und DCs über die Fähigkeit, ganze Erreger oder lösliche Bestandteile dieser aufzunehmen, intrazellulär zu prozessieren, auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und so Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Makrophagen und DCs als professionelle antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cell*, APC) bezeichnet (zusammengefasst aus Murphy *et al.*, 2012).

1.1.1.1 Dendritische Zellen

Erstmals wurden DCs 1973 von Ralph Steinman wegen ihrer ungewöhnlichen Morphologie im Vergleich zu anderen Immunzellen beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). DCs sind im Körper in nahezu allen Geweben zu finden. Erhöht kommen sie allerdings in lymphatischen Strukturen sowie in Organen vor, die besonders viel Kontakt mit der Außenwelt haben, wie die Lunge und der Darm (Merad und Manz, 2009).

Als professionelle APCs besitzen DCs die Eigenschaft, unterschiedlichste Antigene in der Peripherie aufzunehmen, zu prozessieren und in lymphatischen Geweben antigen-spezifischen T-Zellen zu präsentieren, um so eine spezifische Immunantwort zu initiieren (Banchereau *et al.*, 2000).

Die Aufnahme der Antigene erfolgt dabei in der Regel im unreifen Zustand der DCs, in dem sie in Abwesenheit von Entzündungen oder Infektionen vorliegen. Der Großteil der Antigenaufnahme verläuft dabei durch Makropinozytose (Sallusto *et al.*, 1995) oder Phagozytose (Albert *et al.*, 1998).

Nach der Antigenaufnahme kommt es innerhalb der DC zur Assoziation der Antigene mit frühen und späten endosomalen Kompartimenten und anschließend mit Lysosomen, in deren sauren Milieu es zur Proteolyse und Bindung der so entstandenen Peptidfragmente an MHC-II (engl. *major histocompatibility complex*) Moleküle kommt. Diese werden an der Oberfläche der DCs antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen präsentiert, wodurch es nach Interaktion mit deren T-Zell-Rezeptor (TZR) zur Aktivierung der T-Zellen kommt. Darüber hinaus besitzen DCs als professionelle APCs die Fähigkeit der sogenannten Kreuzpräsentation. Diese bezeichnet den Vorgang der Aufnahme extrazellulärer Antigene und deren

Assoziation mit MHC-I Molekülen, die durch Präsentation an der Oberfläche zur Aktivierung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen führt (They und Amigorena, 2001).

Für die effiziente Initiation einer Immunantwort durch T-Zellen reicht die Aktivierung dieser Zellen über ein durch DCs präsentiertes Antigen (Signal 1) alleine nicht aus. Vielmehr wird zeitgleich ein ko-stimulatorisches Signal (Signal 2) benötigt, welches durch interagierende Moleküle auf der Oberfläche der DCs und T-Zellen vermittelt wird. Bei diesen Molekülen handelt es sich um CD28 auf naiven T-Zellen, das mit CD80 oder CD86 auf der Oberfläche der DCs interagiert (Janeway und Bottomly, 1994). Zusätzlich dazu können DCs bestimmte Zytokine sekretieren, die nach Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen zu deren Differenzierung in Effektorzellen führen (Signal 3) (Kalinski *et al.*, 1999). Erst die Vermittlung der Signale 1 und 2 führt zur Aktivierung und Expansion der T-Zellen; die Differenzierung durch das dritte Signal ermöglicht eine effiziente Immunantwort. Sowohl die ko-stimulatorischen Moleküle als auch Zytokine werden durch DCs erst nach deren Reifung exprimiert (Schuurhuis *et al.*, 2006).

Die Präsentation von Antigenen durch unreife DCs führt daher zur Vermittlung von immunologischer Toleranz anstatt von Immunität. Dieser Prozess ist essentiell für die Vermeidung von Autoimmunreaktionen oder Immunantworten gegenüber harmlosen Antigenen. Die von DCs vermittelte Induktion von Toleranz umfasst im Wesentlichen drei Mechanismen: Anergie, Deletion und Induktion von suppressiven regulatorischen T-Zellen (Treg) (Kamradt und Mitchison, 2001).

Als Anergie wird dabei die funktionelle Reaktionslosigkeit von T-Zellen bezeichnet. Diese tritt auf, wenn der TZR in Abwesenheit eines zweiten Signals über CD28 stimuliert wird (Jenkins und Schwartz, 1987). Anergie T-Zellen sind auch nach folgender TZR- und Ko-Rezeptor-Stimulation (Signal 1 und 2) nicht mehr in der Lage zu proliferieren und verharren im inaktiven Zustand (Schwartz *et al.*, 1989). Das Fehlen ko-stimulatorischer Moleküle während der T-Zell-Aktivierung kann außerdem zu deren Deletion über Apoptose-vermittelte Signalwege führen (Critchfield *et al.*, 1994; Singer und Abbas, 1994). Ein Hauptmechanismus, über den Toleranz von DCs vermittelt wird, ist über die Induktion von Treg. Dieser Prozess sowie die Funktion von Treg wird in Kapitel 1.1.2.1 detaillierter beschrieben.

Wie bereits beschrieben ist neben der Toleranzvermittlung eine zentrale Aufgabe von DCs die Initiierung von Immunität. Dafür ist es notwendig, dass die DCs aus einem unreifen in einen reifen, aktivierten Zustand übergehen. Die Aktivierung der DCs erfolgt dabei im Wesentlichen durch die Anwesenheit von pathogenen Organismen wie Bakterien oder Viren. Bestandteile dieser Organismen binden an PRRs wie TLRs, wodurch die Reifung der DCs eingeleitet wird. Während dieses Prozesses treten morphologische und funktionelle Veränderungen der DCs auf (Abb. 1-1). So wird die Antigenaufnahme reduziert und die Expression ko-stimulatorischer Moleküle (z.B. CD40, CD80 und CD86) erhöht (Schuurhuis *et al.*, 2006). Des Weiteren steigt die Antigenpräsentation durch eine erhöhte Expression von MHC-II Molekülen (Kleijmeer *et al.*, 2001) und es kommt zur Initiierung der T-Zell-Differenzierung durch die verstärkte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. Interleukin (IL)-6 und IL-12) (Heufler *et al.*, 1996). Auch wird die Migration der DCs in periphere Lymphknoten erhöht, wo die Aktivierung der T-Zellen erfolgt. Dies geschieht insbesondere durch die verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf der Oberfläche der DCs (Caux *et al.*, 2002).

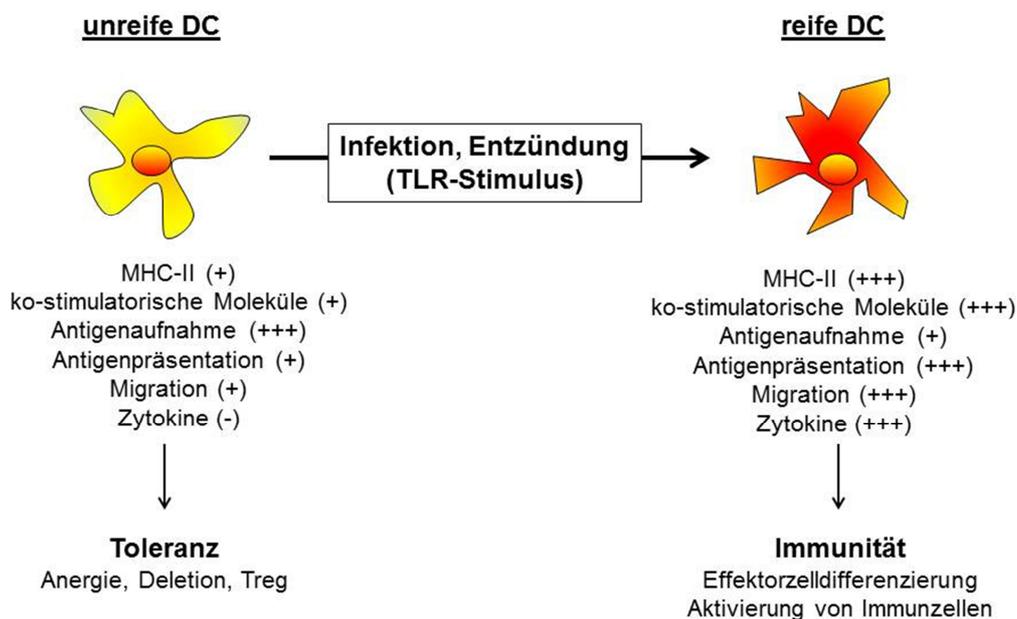


Abbildung 1-1. Phänotyp unreifer und reifer DCs. Im unreifen Zustand ist die Antigenaufnahme von DCs hoch und die Expression von MHC-II und ko-stimulatorischen Molekülen bzw. Zytokinen sehr gering. Nach Stimulation von TLRs während einer Entzündung oder Infektion kommt es zur Reifung der DCs. Diese ist durch deutlich erhöhte Expression von MHC-II und ko-stimulatorischen Moleküle und Zytokine sowie der verstärkten Migration der DCs in Lymphknoten gekennzeichnet. Je nach Reifegrad kommt es entsprechend zur Vermittlung von Toleranz oder Immunität durch die DCs (modifiziert nach Lutz und Schuler, 2002) .

DCs stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Besonders im murinen Immunsystem sind verschiedene Subpopulationen beschrieben, die durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD11c charakterisiert sind. Die einzelnen Populationen unterscheiden sich durch die Expression weiterer Oberflächenmarker und sind je nach Subtyp und Organ unterschiedlichen Funktionen im Immunsystem beteiligt. In der folgenden Tabelle sind die am besten charakterisierten CD11c⁺ DCs aus dem murinen Immunsystem dargestellt (zusammengefasst aus (Pulendran *et al.*, 2008)).

Tabelle 1-1. Subtypen muriner DCs.

DC Subpopulation	CD8 α^+ CD11b $^-$ DCs	CD8 α^- CD11b $^+$ DCs	Plasmazytoide DCs	CD103 $^+$ DCs
Phänotyp	CD11c $^+$ CD8 α^+ CD11b $^-$ MHC-II $^+$ DEC-205 $^+$ CD4 $^-$	CD11c $^+$ CD8 α^- CD11b $^+$ MHC-II $^+$ DEC-205 $^-$ CD4 $^+$	CD11c ^{mittel} CD8 $\alpha^{+/-}$ CD11b $^-$ MHC-II $^-$ B220 $^+$ Gr-1 $^+$	CD11c $^+$ CD8 $\alpha^{+/-}$ MHC-II $^+$ CD11b $^+$ DEC-205 $^+$
Organ	Milz, PP, MLN, LP	Milz, PP, MLN, LP	Milz, PP, MLN	LP, Lunge
Zytokine	IL-12, wenig IL-10	Wenig IL-12, IL-10	IFN- α	TGF- β (?), IL-10 (?)

Abkürzungen: PP: Payer'sche Plaques; MLN: mesenterische Lymphknoten; LP: Lamina Propria

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem benötigt das adaptive Immunsystem nach Infektion mit pathogenen Erregern einige Tage für die Vermittlung effizienter Immunantworten. Diese werden von den Lymphozyten des adaptiven Immunsystems - den B- und T-Zellen - vermittelt. Durch die Expression von T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren (BZR), die jeweils nur ein bestimmtes Antigen erkennen, laufen adaptive Immunantworten hochspezifisch ab.

Sowohl B- als auch T-Zellen entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Knochenmark. Während die Reifung der B-Zellen im Knochenmark stattfindet, migrieren Vorläufer-T-Zellen für die Reifung in den Thymus. Noch vor der Reifung der Zellen kommt es durch somatische Rekombination von Rezeptorgensegmenten zur Ausbildung von BZR und TZR, die es ermöglichen ein nahezu unendliches Repertoire verschiedener Antigene zu erkennen und daraufhin Immunantworten einzuleiten.

B-Zellen üben zwei Hauptaufgaben im Immunsystem aus. Zum einen können sie als APCs fungieren, indem sie in der Lage sind, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen Antigene zu

präsentieren und sie so zu aktivieren. Zum anderen können B-Zellen durch die Erkennung löslicher Antigene über ihren BZR und mit Hilfe von aktivierten CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) selbst aktiviert werden. Diese Aktivierung führt zur Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen, die so die humorale Immunantwort vermitteln.

T-Zellen werden in zwei Hauptklassen eingeteilt, die durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 unterschieden werden. Die Aktivierung beider Zelltypen verläuft über die Interaktion des TZR mit APCs (siehe Kapitel 1.1.1.1). CD8⁺ T-Zellen erkennen präsentierte Antigene über MHC-I Komplexe, die von allen mononukleären Zellen des Körpers exprimiert werden. Die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen führt zu deren Differenzierung in zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (engl. *cytotoxic T lymphocyte*, CTL). CTLs sind entscheidend an der Eliminierung von mit Pathogenen infizierten Zellen beteiligt (zusammengefasst aus Murphy *et al.*, 2012).

CD4⁺ T-Zellen werden weiter unterteilt in verschiedene T_H-Zelltypen sowie in regulatorische T-Zellen (Abb. 1-2). Die Funktion sowie der Phänotyp der CD4⁺ T-Zellen wird in den folgenden Kapiteln detaillierter beschrieben.

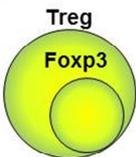
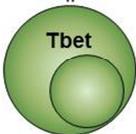
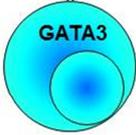
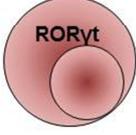
Zelltyp	Zytokine	Funktion	Zielzellen
	TGF-β IL-10	periphere Toleranz, Regulation von Immunantworten	Dendritische Zellen, Effektorzellen
	IFN-γ IL-2	intrazelluläre Bakterien und Viren	Makrophagen, dendritische Zellen
	IL-4 IL-5 IL-13	extrazelluläre Parasiten, Allergien	eosinophile und basophile Granulozyten, B-Zellen
	IL-17 IL-21 IL-22	extrazelluläre Pathogene	neutrophile Granulozyten

Abbildung 1-2. Subtypen von CD4⁺ T-Zellen. Es existieren mindestens vier verschiedene Subtypen von CD4⁺ T-Zellen, die sich durch das Expressionsprofil der Transkriptionsfaktoren und Zytokine sowie die Funktion im Immunsystem deutlich voneinander unterscheiden (modifiziert nach Noack *et al.*, 2014).

1.1.2.1 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wurden erstmals im Jahr 1995 von Sakaguchi und Kollegen als CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften gegenüber anderen Immunzellen beschrieben (Sakaguchi *et al.*, 1995). Aufgrund dieser Fähigkeit sind Treg essentiell für die Vermittlung peripherer Toleranz und damit in der Lage Autoimmunerkrankungen zu verhindern sowie die Immunreaktion gegenüber pathogenen Organismen zu kontrollieren (Mills, 2004).

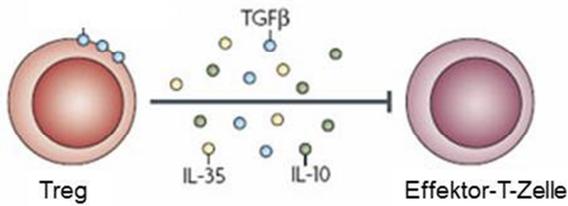
Je nach Ursprungsort im Körper unterscheidet man zwei Hauptklassen von CD4⁺ Treg: natürlich vorkommende Treg (nTreg), die im Thymus entstehen und induzierte Treg (iTreg), die in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen hervorgehen (Curotto de Lafaille und Lafaille, 2009). Beiden Populationen ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (engl. *forkhead box P3*) gemein, der im murinen Immunsystem der verlässlichste Marker für Treg und darüber hinaus entscheidend für die Entwicklung sowie für die suppressiven Eigenschaften von Treg ist (Fontenot *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2005). Deutlich wird die Funktion von Foxp3 in Menschen, die eine Mutation im Foxp3-Gen tragen, welche zum sogenannten IPEX-Syndrom (engl. *immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) führt. In IPEX-Patienten kommt es zu einer starken Dysregulation des Immunsystems, was sich in Autoimmunerkrankungen multipler Organe manifestiert (Chatila *et al.*, 2000). Zusätzlich zu CD4⁺Foxp3⁺ Treg wurden weitere Treg-Populationen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben. Dabei handelt es sich um IL-10-produzierende Tr1-Zellen (engl. *T regulatory type-1*) und TGF- β -produzierende Typ3-T-Helfer-Zellen (T_H3-Zellen), die beide der Population der iTreg angehören, aber kein Foxp3 exprimieren. Darüber hinaus existieren auch CD8⁺Foxp3⁺ Treg mit suppressiver Kapazität (Fleissner *et al.*, 2010).

nTreg entstehen im Thymus durch TZR-Aktivierung bei gleichzeitiger Stimulierung des Ko-Rezeptors CD28 und sind neben der Expression von Foxp3 durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD25, CTLA-4 und GITR charakterisiert (Salomon *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2002). Welche Spezifität der TZR von nTreg besitzt, ist Gegenstand intensiver Forschung. Es wird vermutet, dass in erster Linie Selbstantigene erkannt werden. Dafür spricht u.a., dass das TZR-Repertoire konventioneller CD4⁺ T-Zellen nur wenige Übereinstimmungen mit dem von nTreg aufweist (Shevach, 2002).

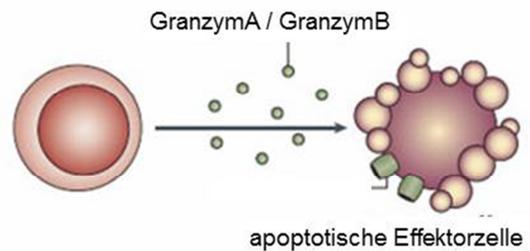
Im Gegensatz dazu werden iTreg in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen induziert und exprimieren dementsprechend einen TZR, der spezifisch für Fremdantigene ist. Entscheidend für den Prozess der Treg-Induktion sind professionelle APCs wie DCs. So konnte gezeigt werden, dass durch TZR-Stimulation in Anwesenheit des von DCs produzierten Zytokins IL-10 naive CD4⁺ T-Zellen zu iTreg konvertieren können (Jonuleit *et al.*, 2000). Eine weitere Möglichkeit der Treg-Induktion ist die TZR-Stimulation von CD4⁺ T-Zellen durch CD103⁺ DCs im Darm. In Anwesenheit von TGF- β können so sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Foxp3⁺ Treg induziert werden. Die Induktion kann in Anwesenheit von Retinsäure weiter gesteigert werden (Coombes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind unreife DCs, die den Rezeptor DEC-205 auf ihrer Oberfläche exprimieren, in der Lage, effizient Treg zu induzieren. Dieser Prozess wird in Kapitel 1.1.4 näher beschrieben.

Mittlerweile wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, die die suppressive Funktion von Treg vermitteln. Diese lassen sich in vier Gruppen unterteilen: 1. Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, 2. Zytolyse von Effektorzellen, 3. Einwirkung in den Stoffwechsel von Effektorzellen und 4. Modifikation der Funktion von DCs (Vignali *et al.*, 2008) (Abb. 1-3).

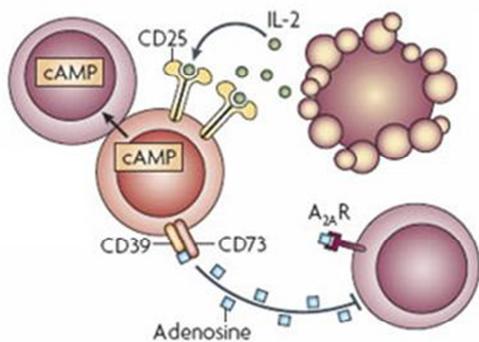
1. anti-inflammatorische Zytokine



2. Zytolyse



3. Stoffwechselstörung



4. Modifikation von DCs

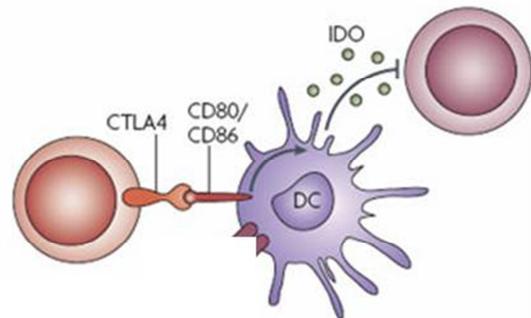


Abbildung 1-3. Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen. 1. Durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10, TGF-β und IL-35) können Effektor-T-Zellen gehemmt werden. 2. Die Expression zytotoxischer Moleküle (z.B. GranzymA und GranzymB) kann zur Apoptose von Effektorzellen führen. 3. Durch die erhöhte Verwendung von Wachstumsfaktoren (z.B. IL-2) durch Treg kann der Stoffwechsel von Effektor-T-Zellen gehemmt werden. 4. Treg können direkt die Funktion von DCs modifizieren, indem sie über CTLA-4 an ko-stimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 binden, oder DCs dazu anregen IDO (Indolamine 2,3-dioxygenase) zu produzieren, das auf die T-Zellproliferation wirkt (modifiziert nach Vignali *et al.*, 2008).

Ein Beispiel für die Suppression durch anti-inflammatorische Zytokine konnte kürzlich in einem Darmentzündungsmodell dargelegt werden. Hier war IL-10, das spezifisch von Treg produziert wurde, in der Lage, die Entzündungsinduktion zu unterbinden (Huber *et al.*, 2011).

Direkten Einfluss auf Effektorzellen können Treg zum einen durch die Produktion von Proteasen wie GranzymA oder GranzymB nehmen. Die erhöhte Sekretion von Granzymen kann so zur Apoptose von Zielzellen führen (Grossman *et al.*, 2004). Zum anderen können Treg den Stoffwechsel von Effektor-T-Zellen beeinflussen, indem sie durch eine hohe CD25 (IL-2 Rezeptor) Expression um das Wachstumssignal IL-2 konkurrieren (Vignali *et al.*, 2008).

Zusätzlich kann die Funktion von DCs durch Treg auf verschiedene Arten moduliert werden. So konnte nachgewiesen werden, dass Treg die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 auf der Oberfläche der DCs herunterregulieren können, wodurch DCs nicht mehr in der Lage sind, die Differenzierung von Effektorzellen zu induzieren (Cederbom *et al.*, 2000). Darüber hinaus führt die Expression von CTLA-4 auf Treg zur Interaktion mit ko-stimulatorischen Molekülen auf den DCs ebenfalls zur Unterbindung der Effektorzellendifferenzierung (Oderup *et al.*, 2006).

1.1.2.2 Typ1-T-Helfer-Zellen

Typ1-T-Helfer-Zellen (T_{H1} -Zellen) sind charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors Tbet sowie die Sekretion der Zytokine IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ) (Mosmann und Coffman, 1989). IFN- γ kann auch von einer Vielzahl weiterer Immunzellen sekretiert werden und führt zu pro-inflammatorischen Immunantworten. Zum Beispiel trägt es zur Differenzierung von Effektorzellen bei oder führt zur Aktivierung von u.a. Makrophagen und ist somit entscheidend am Ablauf effizienter Immunreaktionen beteiligt.

Entscheidend für die Differenzierung von T_H -Zellen ist die adäquate Stimulation des TZRs sowie die Anwesenheit entsprechender Zytokine, deren Bindung an spezifische Rezeptoren auf naiven $CD4^+$ T-Zellen deren Differenzierung einleitet. Für die Differenzierung von T_{H1} -Zellen ist das Zytokin IL-12 von essentieller Bedeutung (Jager und Kuchroo, 2010).

Insbesondere sind T_{H1} -Zellen wichtig für die Immunabwehr gegenüber intrazelluläre virale und bakterielle Infektionen (Agnello *et al.*, 2003). Dabei ist speziell die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3, der stark auf T_{H1} -Zellen exprimiert wird, wichtig für die Migration der Zellen in infizierte Gewebe (Loetscher *et al.*, 1998).

Auf der anderen Seite können fehlgeleitete Immunreaktionen von T_{H1} -Zellen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. So konnte z.B. sowohl für Multiple Sklerose (Traugott und Lebon, 1988) als auch für Typ-I Diabetes (Huang *et al.*, 1995) eine Beteiligung von T_{H1} -Zellen an der Erkrankung nachgewiesen werden.

Interessanterweise spielen T_{H1} -Zellen auch bei der Entstehung und Vermittlung entzündlicher Prozesse im Morbus Crohn eine wichtige Rolle. Dafür spricht u.a. dass die Tbet-, die IL-12-Rezeptor- und die IFN- γ -Expression in intestinalen $CD4^+$ T-Zellen

von Morbus Crohn Patienten stark erhöht ist (Fuss *et al.*, 1996a; Neurath *et al.*, 2002a; Parrello *et al.*, 2000).

1.1.2.3 Typ2-T-Helfer-Zellen

Typ2-T-Helfer-Zellen (T_{H2} -Zellen) sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 gekennzeichnet. Typische durch T_{H2} -Zellen sekretierte Zytokine sind IL-4, IL-5 und IL-13. IL-4 ist auch gleichzeitig das entscheidende Zytokin für die Differenzierung von T_{H2} -Zellen aus naiven $CD4^+$ T-Zellen (Zheng und Flavell, 1997). Interessanterweise führen die von T_{H2} -Zellen exprimierten Zytokine zu einer Hemmung der T_{H1} -Zelldifferenzierung und *vice versa*.

Im Gegensatz zu T_{H1} -Zellen spielen T_{H2} -Zellen bei der Immunantwort gegenüber extrazellulären Pathogenen wie Parasiten eine wichtige Rolle. Die wichtigste Interaktion dafür findet zwischen der differenzierten T_{H2} -Zelle mit antigenspezifischen B-Zellen statt, die zur Aktivierung und Antikörperproduktion letzterer führt (Murphy und Reiner, 2002).

Lange Zeit galt die Fehlfunktion von T_{H2} -Zellen als ein möglicher Auslöser für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Kolitis ulcerosa. Bestätigt werden konnte dies allerdings erst in der letzten Dekade. Dies gelang über die Identifizierung der erhöhten IL-13- (nicht aber der erhöhten IL-4-) Expression im Darm von Kolitis ulcerosa Patienten (Fuss *et al.*, 2004). Weitere Studien konnten belegen, dass von T_{H2} -Zellen sekretiertes IL-13 einen negativen Einfluss auf die Epithelbarriere im Darm hat, wodurch es zum Eindringen luminaler Antigene und zur Initiierung von Entzündungsprozessen kommen kann (Heller *et al.*, 2005).

1.1.2.4 Typ17-T-Helfer-Zellen

Das Konzept der T_{H1}/T_{H2} -Zell vermittelten Immunantworten galt seit seiner ersten Beschreibung durch Mosmann und Coffman im Jahr 1989 als Paradigma für die Bekämpfung von pathogenen Organismen durch $CD4^+$ T-Zellen (Mosmann und Coffman, 1989). Dieses Konzept wurde vor einigen Jahren durch die Entdeckung der Typ17-T-Helfer-Zellen (T_{H17} -Zellen) entscheidend erweitert, die heute Gegenstand intensiver Forschung sind. Namensgebend für diesen Zelltyp war die Entdeckung, dass T_{H17} -Zellen große Mengen des Zytokins IL-17 exprimieren (Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). Die nähere Erforschung der T_{H17} -Zellen zeigte, dass darüber hinaus weitere Zytokine wie IL-21 und IL-22 sowie insbesondere die

Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t charakteristisch für diese Zellpopulation sind (Ivanov *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Für die Differenzierung von T_H17-Zellen ist die Anwesenheit von TGF- β in Kombination mit IL-6 entscheidend.

Die Rolle und Funktion von T_H17-Zellen im Immunsystem ist noch nicht vollständig geklärt. Unter physiologischen Bedingungen sind sie Bestandteil der Immunabwehr gegenüber extrazellulären Infektionen mit Bakterien und Pilzen über die Rekrutierung von u.a. neutrophilen Granulozyten durch IL-17-Sekretion (Vautier *et al.*, 2010).

Allerdings wird die T_H17-Zell vermittelte Immunantwort häufig in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen gebracht. So konnten fehlgeleitete T_H17-Zellen als Induktoren von Multipler Sklerose und Arthritis in entsprechenden Mausmodellen identifiziert werden (Nakae *et al.*, 2003; Uyttenhove und Van Snick, 2006).

Speziell im Darm ist die Funktion von T_H17-Zellen widersprüchlich. Viele Studien sprechen dafür, dass diese Zellpopulation entscheidend für die Entstehung von Entzündungserkrankungen im Darm ist. Zum einen konnte sowohl im Darm von Morbus Crohn als auch in Kolitis ulcerosa Patienten eine erhöhte Zahl von T_H17-Zellen nachgewiesen werden (Seiderer *et al.*, 2008). Zusätzlich dazu sind T_H17-Zellen in diversen Mausmodellen für intestinale Entzündung Hauptvermittler der Erkrankung (Wang *et al.*, 2009). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass T_H17-Zellen eine protektive Rolle während Darmentzündungsreaktionen haben können (O'Connor *et al.*, 2009). Dies zeigt, dass es weiterer Untersuchungen bedarf, um die Funktionen dieser relativ neuen Zellpopulation genauer zu charakterisieren.

Abschließend sei erwähnt, dass in jüngerer Vergangenheit weitere T-Helfer-Zelltypen (z.B. Typ9-T-Helfer-Zellen) beschrieben wurden, die sich von den drei beschriebenen T_H-Zelltypen durch die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und Zytokine unterscheiden. Inwieweit es sich hier um individuelle Zellpopulationen handelt oder ob sie je nach Milieu und Zustand des Immunsystems ineinander konvertiert werden können, wird derzeit erforscht (Zhao *et al.*, 2013).

1.1.3 Das intestinale Immunsystem

Im menschlichen Gastrointestinaltrakt befinden sich über 10^{14} kommensale Bakterien, die über 500 verschiedenen Spezies angehören und wichtige Aufgaben im Stoffwechsel wie Nahrungsverwertung und Vitaminsynthese übernehmen (Eckburg *et al.*, 2005). Zusätzlich dazu ist der menschliche Darm mit seiner ca. 400 m^2 großen Oberfläche wie kein anderes Organ permanent äußeren Einflüssen aus der Umwelt ausgesetzt. Diese können nützlicher (wie z.B. Metaboliten aus der Nahrung) oder harmloser Natur sein. Daher ist es wichtig, dass das Immunsystem Antigenen kommensaler Bakterien sowie harmlosen Antigenen gegenüber keine Immunreaktionen initiiert. Andererseits muss das intestinale Immunsystem in der Lage sein von außen eindringende pathogene Erreger effizient zu eliminieren und so den Wirt vor schädlichen Infektionen zu schützen. Immunologisch betrachtet handelt es sich beim Darm daher um das Organ im Körper, das am stärksten das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Immunantworten aufrechterhalten muss. Für die Ausübung balancierter Immunantworten hat sich im Darm ein hochkomplexes Immunsystem entwickelt, das sogenannte *gut-associated lymphoid tissue* (GALT). Das GALT kann größtenteils unabhängig vom peripheren Immunsystem agieren und ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, die Balance zwischen protektiver Immunantwort und der Vermittlung von Toleranz aufrecht zu erhalten; ein Zustand, der als intestinale Homöostase bezeichnet wird. Für diese Aufgabe haben sich im Laufe der Evolution verschiedenste Mechanismen entwickelt, die von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie von intestinalen Epithelzellen (engl. *intestinal epithelial cells*, IECs) vermittelt werden (Mayer, 2005).

Die erste und gleichzeitig für die intestinale Homöostase essentielle Barriere zum intestinalen Lumen stellt die Epithelzellschicht im Darm dar. Zusätzlich zu dieser physikalischen Abgrenzung ist die Funktion von IECs für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase von großer Bedeutung. So ist die Epithelbarriere von einer Mukusschicht überzogen, die aus von Gobletzellen – einer spezialisierten Population von IECs – sekretierten Muzinen besteht. Der Mukus dient zum einen der physischen Abgrenzung von Bakterien zum Darmepithel, beinhaltet aber u.a. auch von IECs produzierte antimikrobielle Peptide. Auf diese Weise wird die Kolonisierung des Darms mit kommensalen aber auch potentiell pathogenen Bakterien reguliert (Artis, 2008). Die besondere Bedeutung des Mukus wird deutlich, wenn man betrachtet,

dass reduzierte Mukusproduktion sowohl im Menschen als auch in Mausmodellen in Verbindung mit der Entstehung intestinaler Entzündungsprozesse steht (Hooper und Macpherson, 2010; Wlodarska *et al.*, 2011).

Darüber hinaus üben IECs durch die Expression verschiedener PRRs (z.B. TLR4) auch immunologische Funktionen aus. Nach TLR-Stimulation durch bakterielle Komponenten wird u.a. die Proliferation von IECs und die Expression anti-apoptotischer Moleküle erhöht und so eine verstärkte Stabilisierung der Epithelzellbarriere erreicht (Abreu, 2010). Dass TLR-Signalwege in IECs eine entscheidende Rolle für die intestinale Homöostase haben, wird darin deutlich, dass Mäuse, die Defekte in Genen aufweisen, die für TLRs kodieren, eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit für die Entwicklung von intestinalen Entzündungen aufweisen (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

In der Mukosa und Submukosa des Darms liegt das GALT. Das GALT besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen: dem induktiven und dem efferenten Teil. Morphologisch setzt sich der induktive Teil aus den mesenterischen Lymphknoten (engl. *mesenteric lymph nodes*, MLN) und den Payer'schen Plaques (PP) zusammen (siehe Abb. 1-4). Intestinale DCs nehmen luminale Antigene in der Lamina Propria (LP) auf, transportieren sie über die afferente Lymphe in die MLN und führen dort zur Aktivierung von naiven T-Zellen. Luminale Antigene können auch über für die Antigenaufnahme spezialisierte Epithelzellen, die M-Zellen, in die PP gelangen, wo sie von DCs aufgenommen und naiven T-Zellen präsentiert werden. Naive T-Zellen gelangen über sogenannte *high endothelial venules* (HEV) aus dem Blut in die MLN und PP und verlassen diese nach Aktivierung über die efferente Lymphe und wandern in die Lamina Propria des Darms ein. Die Migration der T-Zellen ist dabei durch die Expression sogenannter *gut-homing* Moleküle wie den Chemokinrezeptor CCR9 und das Integrin $\alpha 4\beta 7$ reguliert. In den MLN und PP aktivierte T-Zellen exprimieren vermehrt diese *gut-homing* Moleküle, deren Liganden von intestinalen Endothelzellen exprimiert werden. So erfolgt die Migration in die Lamina Propria und ermöglicht dort die Vermittlung der Immunantwort der aktivierten T-Zellen, die immunogen oder tolerant sein kann (Koboziev *et al.*, 2010).

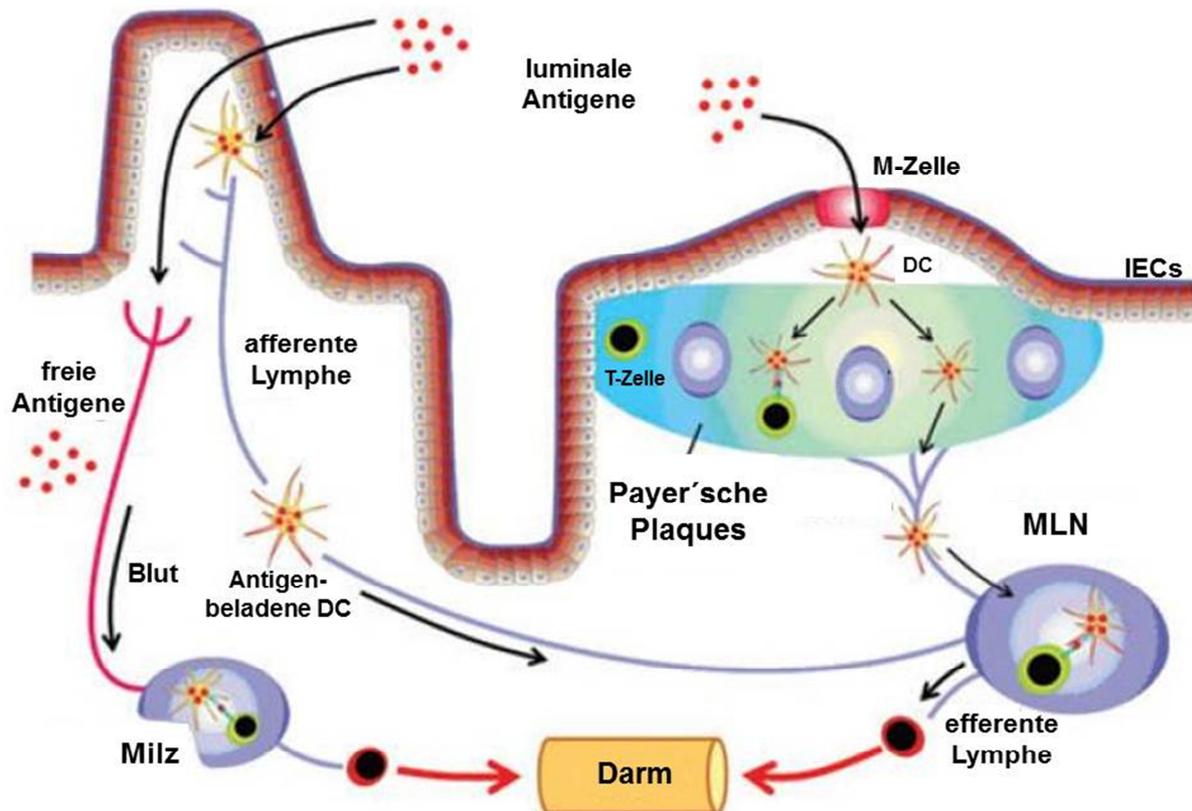


Abbildung 1-4. Aufbau des GALT. Luminal Antigenen gelangen über M-Zellen in die PP, wo sie von DCs aufgenommen und naiven T-Zellen präsentiert werden. Alternativ können Antigenen von DCs direkt in der Lamina Propria aufgenommen werden. Antigen-beladene DCs migrieren über die afferente Lymphe zu den MLN, wo sie naive T-Zellen aktivieren. Aktivierte T-Zellen verlassen die MLN und PP über die efferente Lymphe, migrieren in den Darm und üben dort ihre Effektorfunktion aus. Freie, intestinale Antigenen können über den Blutkreislauf in sekundäre lymphatische Organe wie die Milz transportiert werden, wo sie ebenfalls von DCs aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden. Abkürzungen: DC = dendritische Zelle; IECs = intestinale Epithelzellen; MLN = mesenterische Lymphknoten; PP = Payer'sche Plaques (modifiziert nach Mowat, 2003).

1.1.3.1 Toleranzmechanismen in der intestinalen Mukosa

Für den Wirt ist es essentiell, dass das Immunsystem neben effizienter Immunantworten gegenüber Pathogenen immunologische Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen vermittelt, um fehlgeleitete chronische Entzündungsprozesse zu vermeiden. Dafür hat das Immunsystem im Laufe der Evolution eine Vielzahl verschiedener Mechanismen für die Induktion immunologischer Toleranz entwickelt. Da der Darm wie kein anderes Organ im Körper permanent zwischen Immunität und Toleranz balancieren muss, existieren insbesondere im intestinalen Immunsystem verschiedene Mechanismen für diesen Prozess.

Ein Beispiel für die Toleranzinduktion im Darm ist die Funktion von IECs, die als APCs fungieren können. IECs sind in der Lage luminal Antigenen aufzunehmen und über MHC-II Moleküle $CD4^+$ T-Zellen zu präsentieren (Mayer *et al.*, 1991).

Interessanterweise sind die so eingeleiteten Immunantworten durch CD4⁺ T-Zellen tolerogener Natur. So können IECs sowohl die Aktivierung und Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen unterbinden (Cruickshank *et al.*, 2004) als auch die Expansion von Foxp3⁺ Treg auch in Abwesenheit professioneller APCs fördern (Westendorf *et al.*, 2009b). Darüber hinaus können IECs Moleküle mit tolerogener Funktion exprimieren. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass das von IECs sekretierte Lymphopoietin in DCs die Expression von IL-10 erhöht, die von IL-12 aber reduziert, und so zu tolerogenen Immunantworten beiträgt (Rimoldi *et al.*, 2005).

Neben IECs sind professionelle APCs entscheidend an der Toleranzinduktion im Darm beteiligt. So können u.a. Makrophagen Immunantworten im Darm unterdrücken. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass CD11b⁺F4/80⁺ Makrophagen in der Lage sind Treg im Darm zu induzieren und pro-inflammatorische T_H17-Zellantworten zu unterdrücken (Denning *et al.*, 2007).

Daneben haben besonders intestinale DCs die Fähigkeit Toleranz zu induzieren. Dafür sind insbesondere im Darm spezielle Mechanismen im Gegensatz zu anderen Organen notwendig, da die Anwesenheit der immensen Zahl an Mikroorganismen potentiell zu einer Aktivierung von DCs und damit zur Vermittlung von Immunität gegenüber bakteriellen Antigenen führt. Im Vergleich zu DCs aus anderen Organen exprimieren intestinale DCs weniger MHC-II und ko-stimulatorische Moleküle, weniger pro- (z.B. IL-12) aber mehr anti-inflammatorische (z.B. TGF-β, IL-10) Zytokine (Bell *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2003). Dies spricht für einen tendenziell tolerogenen Phänotyp intestinaler DCs.

Zusätzlich existieren exklusiv im Darm DC-Subpopulationen, die immunologische Toleranz vermitteln können. Intestinale DCs sind, neben weiteren Immunzellen, z.B. in der Lage Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) zu produzieren. Der von IDO vermittelte Toleranzmechanismus wird über die Degradierung der für die T-Zell-Proliferation essentiellen Aminosäure Tryptophan vermittelt (Mellor und Munn, 2004). In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass das Blockieren von IDO zur erhöhten Immunreaktion gegenüber kommensalen Bakterien und damit zu verstärkten Entzündungsprozessen der Mukosa führt (Gurtner *et al.*, 2003).

Eine wichtige Population intestinaler DCs ist durch das Oberflächenmolekül CD103 charakterisiert. CD103⁺ DCs weisen zusätzlich zur Expression von TGF-β eine starke

RALDH (Retinaldehyd Dehydrogenase) Expression auf; ein Enzym, das die Synthese von Retinsäure aus Retinaldehyd katalysiert. Dieses wird über die Nahrung in Form von Vitamin A aufgenommen. Über einen TGF- β /Retinsäure-abhängigen Mechanismus sind CD103⁺ DCs in der Lage sehr effizient Foxp3⁺ Treg im Darm zu induzieren und tragen so grundlegend zur Toleranzvermittlung bei (Coombes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese DC-Population nach TLR-Stimulation auch die Differenzierung von T_H1-Zellen im Darm fördert (Fujimoto *et al.*, 2011). Dies zeigt einerseits das Potential von CD103⁺ DCs für die Induktion von Toleranz und Immunität, allerdings bedarf es weiterer Studien um zu klären, wie fehlgeleitete Immunantworten durch diesen DC-Typ im Darm verhindert werden.

Eine fehlgeleitete Aktivierung bzw. Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-, T_H2- oder T_H17-Zellen durch DCs kann zum Verlust der Toleranz im Darm führen. Alle drei T-Zellpopulationen wurden sowohl im Menschen als auch in Mausmodellen eindeutig mit der Induktion intestinaler Entzündungsprozesse in Verbindung gebracht (Monteleone *et al.*, 2011). Entsprechend wird die Wichtigkeit von DCs für die Induktion von Foxp3⁺ Treg deutlich. Diese sind von zentraler Bedeutung für die Unterdrückung pro-inflammatorischer Immunantworten im Darm. Dieser Zusammenhang wurde in einem Kolitis Mausmodell deutlich, in dem der adoptive Transfer von Foxp3⁺ Treg den Ausbruch der Entzündung nicht nur verhindern, sondern die Mäuse auch von der Entzündung therapieren konnte (Liu *et al.*, 2003; Mottet *et al.*, 2003).

Zusammengefasst existieren im Darm zahlreiche Mechanismen der Toleranzinduktion, die insbesondere von intestinalen DCs vermittelt werden. Darüber hinaus war in den vergangenen Jahren die Subpopulation der DCs, die den Oberflächenrezeptor DEC-205 exprimieren, im Fokus vieler Studien. Es konnte gezeigt werden, dass durch die gezielte Antigenbeladung von DEC-205⁺ DCs Toleranz in verschiedenen Organen induziert werden kann. Ob dieser Ansatz auch im Darm für die Toleranzvermittlung genutzt werden kann, ist unklar. Im folgenden Kapitel sind die Mechanismen der DEC-205 vermittelten Toleranzinduktion näher beschrieben.

1.1.4 Toleranzinduktion über den DEC-205 Oberflächenrezeptor

DEC-205 (CD205) gehört zur Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Familie der C-Typ Lektin Rezeptoren, die u.a. den Makrophagen-Mannose-Rezeptor und den Phospholipase-A2-Rezeptor umfasst (Mahnke *et al.*, 2000). Strukturell besteht DEC-205 aus einer Cystein-reichen N-terminalen Domäne, einer Fibronectin Typ-II Domäne und zehn C-Typ Lektin Domänen, gefolgt von einer Transmembran- und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Abb. 1-5). DEC-205 hat ein Molekulargewicht von 205 kDa (Swiggard *et al.*, 1995). Die höchste Expression des Rezeptors wurde zunächst auf DCs und Epithelzellen des Thymus nachgewiesen, in sehr geringen Mengen wird DEC-205 allerdings auch auf B- und T-Zellen exprimiert (Inaba *et al.*, 1995). In späteren Studien konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Subpopulation konventioneller $CD11c^+CD8\alpha^+$ DCs, nicht aber die der $CD11c^+CD8\alpha^-$ DCs DEC-205 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Kronin *et al.*, 2000; Vremec und Shortman, 1997).

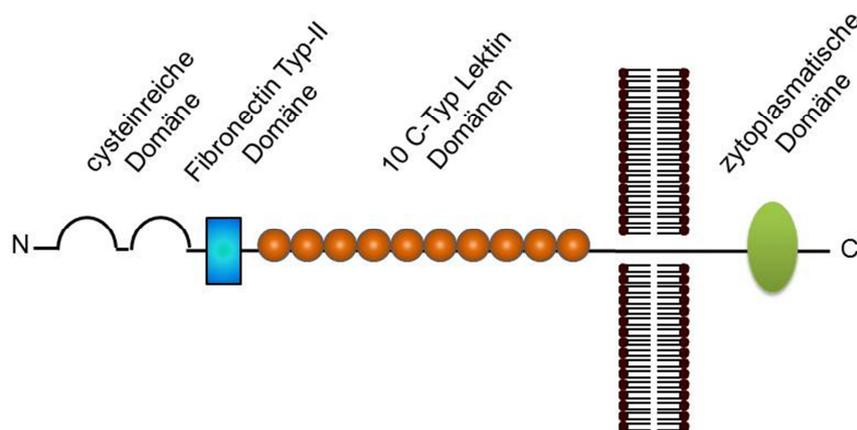


Abbildung 1-5. Aufbau des DEC-205 Rezeptors. Der extrazelluläre Teil des DEC-205 Rezeptors enthält eine cysteinreiche Domäne, eine Fibronectin Typ-II Domäne sowie zehn C-Typ Lektin Domänen. Intrazellulär besteht der Rezeptor aus einer zytoplasmatischen Domäne mit einem Endozytosemotiv (modifiziert nach Figdor *et al.*, 2002).

Als bisher einziger natürlicher Ligand für DEC-205 konnten kürzlich CpG Oligonukleotide der Klasse B identifiziert werden (Lahoud *et al.*, 2012). Die Bindung der CpG Oligonukleotide an DEC-205 auf DCs führt zu deren Internalisierung und zur Aktivierung des intrazellulären Rezeptors TLR9.

Obwohl bisher keine weiteren natürlichen Liganden für DEC-205 bekannt sind, wurde der Rezeptor in den vergangenen zwei Jahrzehnten immer wieder als Werkzeug für

die effiziente Beladung von DCs mit Antigenen genutzt. 1995 konnten Inaba und Kollegen zeigen, dass sowohl DCs als auch Epithelzellen des Thymus nach Bindung eines spezifischen Antikörpers, der gegen DEC-205 gerichtet ist, diesen aufnehmen und zu späten Endosomen transportieren, wo er mit MHC-II Molekülen assoziiert wird. Dieser Vorgang führt zu einer effizienten Präsentation von Fragmenten des Antikörpers auf der Oberfläche der Epithelzellen und DCs und so zu einer ca. 100-fach höheren Aktivierung von antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu Kontrollantikörpern (Inaba *et al.*, 1995). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Modellantigenen an einen spezifischen α -DEC-205 Antikörper ebenfalls zur Beladung von DCs mit diesen Antigenen und zu der effizienten Antigenpräsentation über MHC-II Moleküle führt (Mahnke *et al.*, 2000). Diese Art des *Antigen-Targetings* über DEC-205 führt außerdem zur Assoziation mit MHC-I Molekülen in DCs und infolgedessen zur Aktivierung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Bonifaz *et al.*, 2002; den Haan *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Bindung eines Antikörper-Antigen-Konjugates an DEC-205 neben der erhöhten Aufnahme und Präsentation der Antigene auch zu einer verstärkten Expression von IL-10 durch die DCs führt (Ring *et al.*, 2013). Wie die erhöhte IL-10 Expression vermittelt wird, ist noch nicht geklärt.

Wie in Kapitel 1.1.1.1 beschrieben liegen DCs in Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen im unreifen Zustand vor, der durch die geringe Expression ko-stimulatorischer Moleküle (z.B. CD80 und CD86) und pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-12) gekennzeichnet ist. Im unreifen Zustand der DCs wird durch das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* immunologische Toleranz induziert. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Mechanismen dieser Toleranzinduktion ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

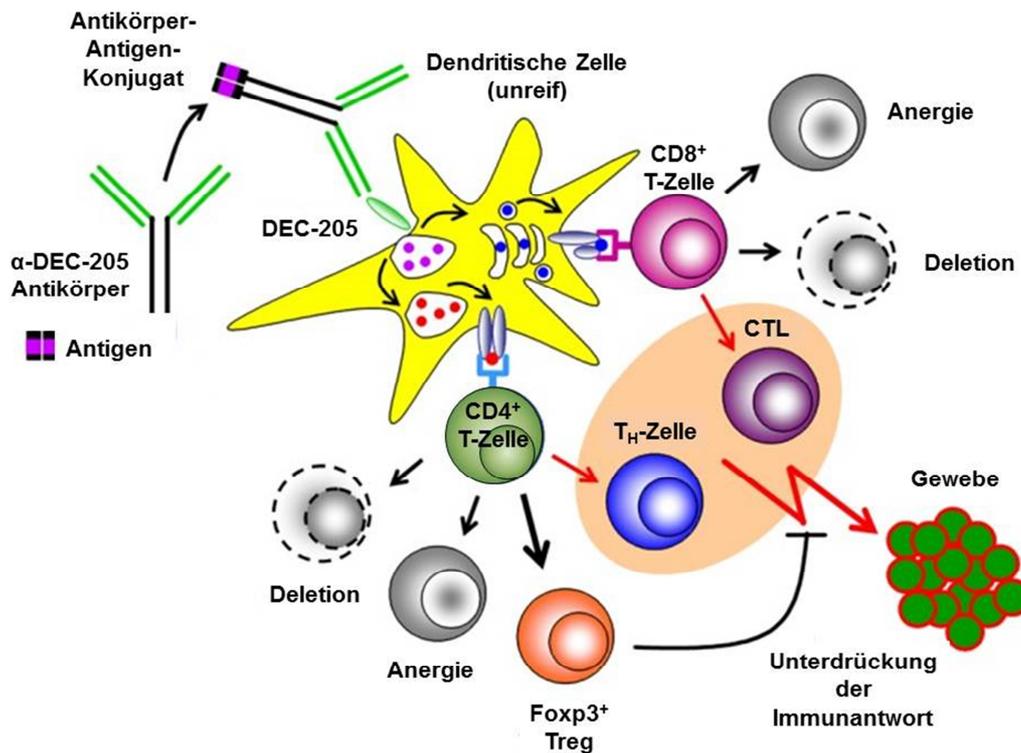


Abbildung 1-6. Toleranzmechanismen durch DEC-205 vermitteltes Antigen-Targeting. Ein Antikörper-Antigen-Konjugat, das für das *Antigen-Targeting* notwendig ist, wird durch die Kopplung eines Modellantigens an einen α -DEC-205 Antikörper generiert. Die Bindung des Konjugates an DEC-205 auf unreifen DCs führt zur Aufnahme und Prozessierung des Antigens in endosomalen Kompartimenten. Hier kommt es zur Assoziation mit MHC-I bzw. MHC-II Molekülen und der Antigenpräsentation an $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen. In beiden Zelltypen kann die Präsentation zur Deletion oder zur Anergie führen. Zusätzlich können naive $CD4^+$ T-Zellen zu $Foxp3^+$ Treg konvertiert werden, die in peripheren Geweben die Immunantwort von T-Helferzellen (T_H -Zelle) oder zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen (CTL) unterdrücken können (modifiziert nach Petzold *et al.*, 2012).

Hawiger und Kollegen waren die ersten, die zeigen konnten, dass es nach der Antigenbeladung über DEC-205 zunächst zur Aktivierung antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen kommt, diese aber nicht zu Effektorzellen differenziert, sondern innerhalb kurzer Zeit deletiert werden (Hawiger *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie konnte die Gruppe außerdem zeigen, dass nicht deletierte $CD4^+$ T-Zellen einen anergen Zustand erreichen, da sie in Anwesenheit von Peptid nicht restimuliert werden können (Hawiger *et al.*, 2004). Analog dazu konnte auch für antigen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, dass DEC-205 vermitteltes *Antigen-Targeting* zwar zu deren Aktivierung, nicht aber zu einer Effektorzellendifferenzierung führt, sondern die Zellen deletiert oder unempfindlich gegenüber Restimulation werden (Bonifaz *et al.*, 2002).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch diesen Ansatz auch antigen-spezifische $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen aus TZR-transgenen Mäusen nach der Injektion

eines entsprechenden α -DEC-Antigen-Konjugates zu $CD4^+Foxp3^+$ Treg konvertiert werden können (Kretschmer *et al.*, 2005).

Seitdem wurde in weiteren Studien nachgewiesen, dass die Induktion der vorgestellten Toleranzmechanismen nach *Antigen-Targeting* über DEC-205 auch Relevanz für die Prävention von Entzündungserkrankungen in Mausmodellen hat. Auf diese Weise konnte u.a. in einem Mausmodell für Multiple Sklerose die Entzündung des Zentralnervensystems verhindert werden, indem antigen-spezifische $CD4^+$ T-Zellen, die die Entzündung vermitteln, deletiert wurden oder einen anergen Zustand erreichten (Stern *et al.*, 2010). Die Unterdrückung einer Entzündungsreaktion durch die Induktion von $Foxp3^+$ Treg gelang durch das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* in einem Mausmodell für Typ-I Diabetes (Bruder und Westendorf *et al.*, 2005). In einem weiteren Diabetesmodell, in dem β -Zell-spezifische $CD8^+$ T-Zellen das Pankreas zerstören, konnte nachgewiesen werden, dass die Entzündung durch die Deletion der $CD8^+$ T-Zellen unterdrückt wurde (Mukhopadhaya *et al.*, 2008).

Zusammengefasst stellt das *Antigen-Targeting* über DEC-205 auf unreifen DCs ein interessantes Werkzeug für die Induktion antigen-spezifischer Toleranz dar.

1.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden im Wesentlichen zwei Erkrankungen zusammengefasst: Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa. Beide Erkrankungen manifestieren sich in der Regel im jungen Erwachsenenalter und weisen in Mitteleuropa eine Prävalenz von 120 bis 280 Erkrankten pro 100.000 Einwohner auf mit steigender Inzidenz während der letzten Dekaden (Molodecky *et al.*, 2012). Interessanterweise liegt die Zahl der Erkrankten in Industrieländern in Europa und Nordamerika deutlich höher als in Schwellen- und Entwicklungsländern Asiens oder Afrikas (Loftus, 2004), was eine mögliche Ursache der Erkrankungen durch ethnische Herkunft und Umwelteinflüsse nahelegt. In den folgenden Kapiteln sind beide Krankheitsbilder näher dargestellt.

1.2.1 Klinisches Krankheitsbild

Das Krankheitsbild im Morbus Crohn ist durch eine schubförmig verlaufende, chronische Entzündung charakterisiert, die den gesamten Gastrointestinaltrakt vom

Mund bis zum Anus betreffen kann. Dabei kommt es nicht zu kontinuierlichen, sondern vielmehr zu segmentalen Entzündungserscheinungen, weswegen in der Klinik von sog. *skip lesions* gesprochen wird. Die stärkste Ausprägung der Entzündung weisen in der Regel das terminale Ileum sowie das proximale Kolon auf. Zudem können sowohl die Mukosa als auch die Submukosa des Darms von der Entzündung betroffen sein. Die typischen Symptome der Patienten umfassen kolikartige Bauchschmerzen, die häufig in den rechten Unterbauch projizieren und mehrere Wochen andauernde, nicht blutige Diarrhoen. Zusätzlich treten in ca. 50 % der Patienten unspezifische Symptome wie Fieber, Übelkeit und Appetitlosigkeit auf, die deutlich machen, dass Morbus Crohn einen systemischen Charakter aufweist (Nikolaus und Schreiber, 2007).

Bei Kolitis ulcerosa handelt es sich ebenfalls um eine schubförmig verlaufende chronische Entzündung. Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist hier allerdings nur die Mukosa im Kolon betroffen. Die Entzündung beginnt meist im Rektum und verläuft kontinuierlich in das Kolon. Die Symptomatik ist mit starken Bauchschmerzen und Diarrhoen, die bei Kolitis ulcerosa häufig blutig sind, ähnlich zu der von Morbus Crohn. Durch den schubartigen Charakter beider Erkrankungen können Patienten in den Remissionsphasen über Jahre hinweg beschwerdefrei sein.

Bemerkenswert ist, dass Kolitis ulcerosa Patienten ein erhöhtes Risiko haben, ein Kolonkarzinom zu entwickeln. Das Risiko an einem Tumor zu erkranken, liegt in dieser Personengruppe um den Faktor 15 höher als in gesunden Menschen (Ekbom *et al.*, 1990).

Charakteristische Merkmale beider Erkrankungen sind der folgenden Abbildung dargestellt.

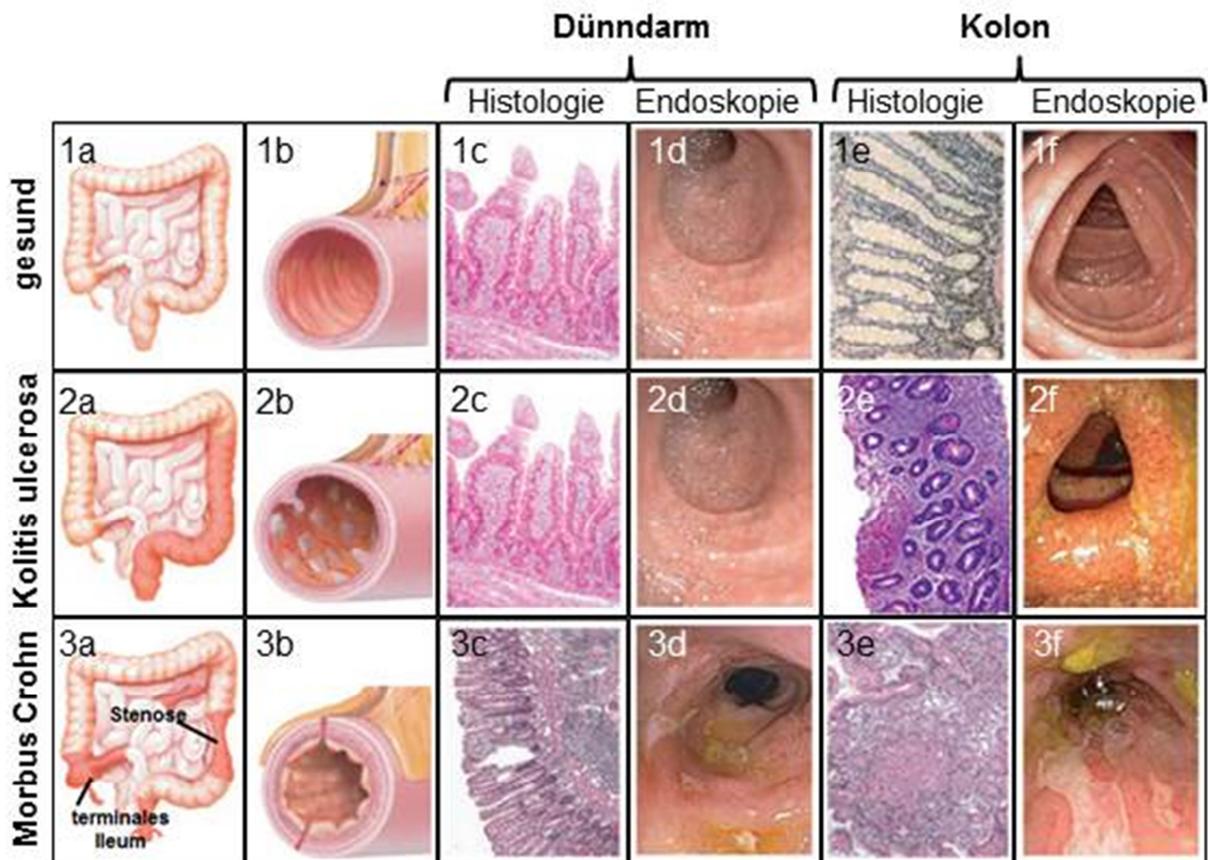


Abbildung 1-7. Morphologische makroskopische und mikroskopische Merkmale von CED. Die Entzündung bei Kolitis ulcerosa beschränkt sich auf das Kolon und entwickelt sich ausgehend vom Rektum kontinuierlich in proximale Richtung (2a). Endoskopisch erscheint die Mukosa gerötet und granulär und kann Ulzerationen aufweisen (2b und 2f). Histologisch sind im Kolon Neutrophilen- und Eosinophileninfiltrationen sowie Kryptabszesse erkennbar (2e). Der Dünndarm ist ohne pathologischen Befund (2b und 2c). Beim Morbus Crohn kann jeder Teil des Gastrointestinaltraktes betroffen sein. Es liegt eine segmentale Entzündung vor, die am häufigsten das proximale Kolon und das terminale Ileum betrifft. In seltenen Fällen kann es zu Stenosen kommen (3a). Anders als bei Kolitis ulcerosa betrifft die Entzündung beim Morbus Crohn nicht nur die oberflächliche Mukosa, sondern liegt transmural vor und betrifft dementsprechend auch die Submukosa (3b). Während schwacher Entzündung sind leichte Ulzerationen im Kolon und Dünndarm zu sehen, die sich je Schweregrad zu tiefen, serpentinartigen Ulzerationen verstärken können (3c und 3e). Histologisch weist Morbus Crohn große Ähnlichkeiten zur Kolitis ulcerosa auf. Auch hier sind Infiltrate mit Immunzellen sowie Kryptabszesse und Ulzerationen zu erkennen (3c und 3e) (modifiziert nach Marsal und Agace, 2012).

1.2.2 Ätiologie

Eine genaue Ursache für die Entstehung von CED im Menschen ist bis heute nicht bekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Als sicher gilt, dass das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die sich aus genetischen und immunologischen Faktoren, Umwelteinflüssen sowie durch Veränderungen des intestinalen Mikrobioms zusammensetzen, zur Erkrankung führen (Scalaferrri und Fiocchi, 2007) (Abb. 1-8).

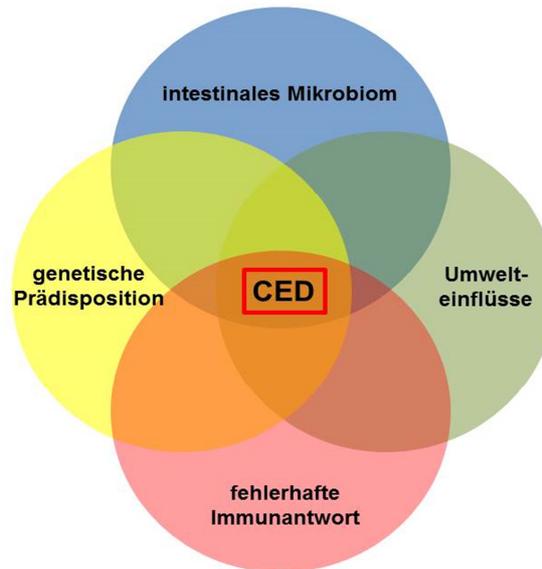


Abbildung 1-8. Ursachen für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Das Zusammenwirken verschiedener Faktoren wie genetische Prädispositionen, eine fehlgeleitete Immunantwort gegenüber möglichen Veränderungen im intestinalen Mikrobiom sowie verschiedene Umwelteinflüssen kann zur Entwicklung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) führen (modifiziert nach Sartor, 2006).

Der erste genetische Zusammenhang zum Morbus Crohn gelang durch die Aufdeckung einer Mutation im NOD2 Gen, die zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber der Erkrankung führt (Ogura *et al.*, 2001). Mittlerweile konnten über 70 genetische Polymorphismen identifiziert werden, die mit einem erhöhtem Morbus Crohn Risiko einhergehen (Franke *et al.*, 2010). Auch für Kolitis ulcerosa konnte ein erhöhtes Risiko durch Modifikationen in verschiedenen Genen nachgewiesen werden, die teilweise mit denen für Morbus Crohn überlappen (Fisher *et al.*, 2008). Allerdings ist die genaue Funktion der meisten Gene im Zusammenhang mit der Erkrankung bisher nicht bekannt.

Zu den Umwelteinflüssen, die zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Morbus Crohn führen, zählt u.a. das Rauchen. Dies zeigt sich darin, dass die Inzidenz für die Erkrankung bei Rauchern höher ist als bei ihren nicht rauchenden Geschwistern (Bridger *et al.*, 2002). In der gleichen Studie konnte allerdings nachgewiesen werden, dass dieser Zusammenhang nicht zu einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an Kolitis ulcerosa führt. Auch die Ernährung sowie der Konsum von Genussmitteln und Drogen stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung von CED. Für diese Faktoren sind jedoch bisher keine kausalen Zusammenhänge mit der Krankheitsentstehung bekannt (Baumgart und Carding, 2007).

Die wohl wichtigste Rolle in der Entstehung von CED kommt der fehlerhaften Immunantwort gegenüber kommensalen Mikroorganismen und luminalen Antigenen zu, die auftritt, wenn die natürliche Homöostase im Darm (siehe Kapitel 1.1.3) gestört ist (Podolsky, 2002). Ein Initialereignis für diesen Prozess ist oft ein Defekt in der Epithelzellbarriere des Darms, der zu einer unkontrollierten Überaktivierung des darunterliegenden Immunsystems durch Antigene aus dem Lumen führt (Soderholm *et al.*, 2002).

Auch eine Fehlfunktion und ein veränderter Phänotyp von DCs konnte in CED nachgewiesen werden. Fehlerhafte Antigenerkennung und -präsentation z.B. führt zu einer Induktion von T_H1 - und T_H17 -Zell vermittelten Immunantworten gegenüber kommensalen Bakterien, die unter physiologischen Bedingungen nur gegenüber pathogenen Organismen eingeleitet wird (Franchimont *et al.*, 2004). Ein Grund dafür könnte ein aktivierter Phänotyp von DCs in der entzündeten Mukosa von CED Patienten sein, der sich in erhöhter Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 ausdrückt (Baumgart *et al.*, 2004). Durch den Ko-Stimulus wird so im Darm Immunität gegenüber harmlosen Antigenen ausgelöst. Effektor-T-Zellantworten können auch durch nicht-professionelle APCs wie intestinale Epithelzellen vermittelt werden. Diese Zellen zeigen während einer Entzündung erhöhte Expression von MHC-II Molekülen sowie der pro-inflammatorischen Mediatoren IFN- γ und TNF- α und führen so zu einer Aktivierung des Immunsystems und insbesondere von Effektor-T-Zellen (Cruickshank *et al.*, 2004). Zusätzlich zu dieser fehlgeleiteten Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen durch aktivierte DCs und Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Zahl der tolerogenen, nicht aktivierten DCs im Darm von CED Patienten im Vergleich zu gesunden Personen erniedrigt ist (Baumgart *et al.*, 2005). Dies resultiert in einer geringeren Zahl $Foxp3^+$ Treg sowie aneurer $CD4^+$ T-Zellen.

Insgesamt führt die erhöhte Anzahl und Fehlfunktion von DCs und Epithelzellen zu einer Dysbalance zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen und $Foxp3^+$ Treg im Darm, die zu einer verstärkten Immunreaktion und somit in der Entstehung von chronisch-entzündlichen Prozessen resultiert (Martin *et al.*, 2004). Zusätzlich zu der Rolle von T_H1 - und T_H2 -Zellen in der Vermittlung von intestinalen Entzündungsvorgängen, wird seit einiger Zeit die Rolle von T_H17 -Zellen kontrovers diskutiert. Bereits unter physiologischen Bedingungen befinden sich im Darm T_H17 -Zellen in großer Zahl.

Diese Zellpopulation ist maßgeblich an der Erhaltung der normalen Homöostase im Darm beteiligt. Während einer Entzündung im Darm expandieren T_H17-Zellen (Niess *et al.*, 2008). Ob diese Zellen jedoch einen protektiven oder pathogenen Effekt auf die Entwicklung entzündlicher Prozesse haben, ist noch nicht geklärt. In Mausmodellen konnte z.B. gezeigt werden, dass das von T_H17-Zellen produzierte Zytokin IL-17A protektiv wirkt, IL-17F dagegen den gegenteiligen Effekt aufweist (Xu *et al.*, 2014), so dass die Rolle dieser Zellpopulation in der Entstehung und Aufrechterhaltung von CED näher untersucht werden muss.

1.2.3 Therapien

Wegen der Vielzahl an Faktoren, die potentiell zu CED führen können, und des nicht vollständigen Verständnisses über die genaue Krankheitsentstehung, ist derzeit keine kurative Therapie verfügbar. Die verfügbaren therapeutischen Ansätze dienen der Remissionsinduktion während eines akuten Schubes bzw. der Remissionserhaltung in entzündungsfreien Perioden.

Die Therapieformen sind für beide Erkrankungen ähnlich. Bei leicht bis mittelstark verlaufenden Schüben der Kolitis ulcerosa kommen für die Remissionsinduktion Aminosalizylate wie Mesalazin oder 5-ASA zum Einsatz. Diese Therapeutika sind im Morbus Crohn unwirksam, weswegen leichte Schübe häufig mit dem Glucocorticoidderivat Budesonid behandelt werden. Akute schwere Entzündungsschübe werden in beiden Erkrankungen mit Steroiden wie Cortison und seinen Derivaten therapiert, teilweise in Kombination mit Aminosalizylaten. Die Remissionserhaltung erfolgt mit immunsuppressiven Therapeutika wie Azathioprin oder Methotrexat (Zenlea und Peppercorn, 2014).

Neben diesen konventionellen Therapieformen existieren auch sogenannte „biologische“ Therapieansätze. In erster Linie handelt es sich dabei um Antikörper, die gegen das Zytokin TNF- α gerichtet sind, das schon früh als Mediator intestinaler Entzündungsprozesse identifiziert wurde (Braegger *et al.*, 1992). Erstmal wurde der erfolgreiche Einsatz des anti-TNF- α Antikörpers Infliximab für die Behandlung von Morbus Crohn Patienten beschrieben (Vandullemen *et al.*, 1995). Die Zahl der Patienten, die auf diese Therapie ansprechen, liegt allerdings unter 60 % (Hanauer *et al.*, 2002). Zusätzlich kann die Behandlung zur Reaktivierung latenter Infektionen wie Tuberkulose führen (Curtis *et al.*, 2007; Patkar *et al.*, 2008).

In Anbetracht der relativ unspezifischen und nur symptomatischen Therapieformen, die derzeit für die Behandlung von CED zugelassen sind, wird deutlich, dass es der Erforschung und Entwicklung verbesserter, spezifischerer Therapien bedarf.

1.2.4 Mausmodelle für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Der Mangel an effizienten Therapien gegen CED erfordert die genauere Erforschung der Mechanismen, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankungen führen. Tiermodelle für CED sind wichtige und unentbehrliche Werkzeuge, die ein breites Spektrum an Optionen für die Erforschung der an intestinalen Entzündungsprozessen beteiligten Prozesse bieten. In den folgenden Kapiteln sind Mausmodelle beschrieben, die häufig für die Untersuchung von Entzündungen der intestinalen Mukosa eingesetzt werden.

1.2.4.1 Chemisch induzierte Darmentzündungsmodelle

Chemisch induzierte Darmentzündungsmodelle sind die am häufigsten verwendeten Mausmodelle, da die Entzündung verhältnismäßig einfach induzierbar ist und der zeitliche Verlauf sowie die Schwere der Entzündung gut kontrollierbar sind.

Das am häufigsten angewandte Darmentzündungsmodell wird über die Gabe von Natriumdextransulfat (engl. *dextran sulfate sodium*, DSS) im Trinkwasser der Versuchstiere vermittelt. Abhängig von der Konzentration, der Dauer und der Häufigkeit der DSS-Gabe kann in den Tieren, zumeist in Mäusen, eine akute oder chronische Entzündung des Kolons induziert werden (Okayasu *et al.*, 1990). Ein Anteil von 2-5 % DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von 5-7 Tagen resultiert klinisch in Gewichtsverlust, Diarrhoen und rektalen Blutungen. Histopathologisch weist das Kolon der Tiere typischerweise eine massive Zerstörung der Epithelschicht und Verlust der Krypten einhergehend mit der Infiltration der Lamina Propria mit Granulozyten und weiteren Immunzellen auf (Cooper *et al.*, 1993). Durch die Zerstörung der Epithelzellen kommt es zu einer unkontrollierten Immunantwort gegen kommensale Darmbakterien. Die Entzündung kann sowohl in Wildtyp als auch in immunkomprimierten SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*) Mäusen ausgelöst werden, was darauf hindeutet, dass das adaptive Immunsystem für die Induktion der Entzündung eine untergeordnete Rolle spielt (Dieleman *et al.*, 1994). In der chronischen Phase der Entzündung sind vermehrt IFN- γ - bzw. IL-4-

essentielle Rolle von IL-10 für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm deutlich.

Ein weiteres Beispiel für die Entwicklung einer intestinalen Entzündung durch die Deletion in einem für ein Zytokin kodierendes Gen ist der IL-2 *knock-out* Mausstamm. IL-2^{-/-} Mäuse entwickeln 8-10 Wochen nach der Geburt im Kolon eine chronische Entzündung der intestinalen Mukosa (Baumgart *et al.*, 1998; Sadlack *et al.*, 1993). Neben klinischen Symptomen wie Gewichtsverlust und Diarrhoen weisen diese Tiere in der histologischen Analyse starke Ulzerationen, Kryptabszesse und Epithelzellhyperplasien im Kolon auf. Pathologisch hat dieses Modell große Ähnlichkeit mit Kolitis ulcerosa. Im Gegensatz zum IL-10^{-/-} Modell wird die Entzündung in IL-2^{-/-} Mäusen nicht ausschließlich durch T_H1-Zellen, sondern zusätzlich durch IL-4 produzierende T_H2-Zellen vermittelt, so dass der Einfluss beider Effektorzelltypen untersucht werden kann.

1.2.4.3 Darmentzündungsmodelle durch adoptiven T-Zelltransfer

Eine weitere Möglichkeit intestinale Entzündungsprozesse in Mäusen zu studieren ist durch den adoptiven Transfer von T-Zellen. Im Gegensatz zu den genetisch induzierten Entzündungsmodellen bietet diese Art der Entzündungsinduktion zum einen den Vorteil den Verlauf der Erkrankung zeitlich gut zu kontrollieren und zum anderen die Rolle von T-Zellen, die eine entscheidende Rolle in CED spielen, genau zu untersuchen.

In dem am häufigsten genutzten Modell dieser Art führt der adoptive Transfer von naiven CD4⁺CD45RB^{hoch} T-Zellen aus Wildtypmäusen in Mäuse, die keine reifen T- und B-Zellen (RAG^{-/-} bzw. SCID Mäuse) besitzen, 5-8 Wochen nach Transfer zu einer chronischen Entzündung der Mukosa im Kolon (Powrie *et al.*, 1994). Diese ist klinisch charakterisiert durch Gewichtsabnahme der Mäuse und blutige Diarrhoen. In der Histopathologie zeigen sich im Darm der Mäuse Epithelzellhyperplasien, Kryptabszesse und Lymphozyteninfiltrationen (Leach *et al.*, 1996). Nach der anfänglichen Annahme, dass nur das Kolon betroffen sei, konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass auch der Dünndarm der Mäuse eine ähnlich starke Entzündung nach T-Zelltransfer aufweist (Ostanin *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass in CD4⁺ T-Zellen in diesem Modell eine erhöhte IFN- γ -, jedoch keine verstärkte IL-4-Expression detektierbar ist, legt den Schluss nahe, dass dieses Entzündungsmodell hauptsächlich T_H1-Zell vermittelt ist (Powrie *et al.*, 1994). In der gleichen Arbeit

konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines blockierenden Antikörpers gegen IFN- γ zum Schutz der Tiere führt, was diese These weiter unterstützt.

Analog zum CD4⁺CD45RB^{hoch} Transfermodell konnte von Mudter und Kollegen in einer späteren Arbeit gezeigt werden, dass auch der adoptive Transfer von CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen aus Wildtypmäusen in RAG^{-/-} Mäuse zu einer chronischen Entzündung des Kolons führt (Mudter *et al.*, 2002). Da CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen eine hohe CD45RB Expression aufweisen, ist der Phänotyp der Entzündung nach Zelltransfer vergleichbar mit dem im CD4⁺CD45RB^{hoch} Transfermodell. Der Vorteil des CD4⁺CD62L⁺ liegt dabei lediglich in der Isolierung der T-Zellen, die per magnetischer statt durchflusszytometrischer Zellsortierung gewonnen werden können.

Diese beiden Modelle setzen den T-Zelltransfer in immundefiziente Mäuse für die Entzündungsinduktion voraus. Für die Analyse einer T-Zell vermittelten Immunantwort in immunkompetenten Mäusen wurde ein Modell von Westendorf und Kollegen beschrieben. In diesem Modell führt der adoptive Transfer von Hemagglutinin (HA)-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse zu einer starken Entzündung des Dünndarms. VILLIN-HA transgene Mäuse exprimieren das Modellantigen Hemagglutinin unter dem Enterozyten-spezifischen VILLIN-Promotor. Nach dem CD8⁺ T-Zelltransfer kommt es in den Tieren zu einer verstärkten Migration der T-Zellen in den Darm, wo das Hemagglutinin auf den Epithelzellen erkannt wird und zu einer massiven Zerstörung der Epithelbarriere im Dün- und Blinddarm führt (Westendorf *et al.*, 2006) (Abb. 1-9).

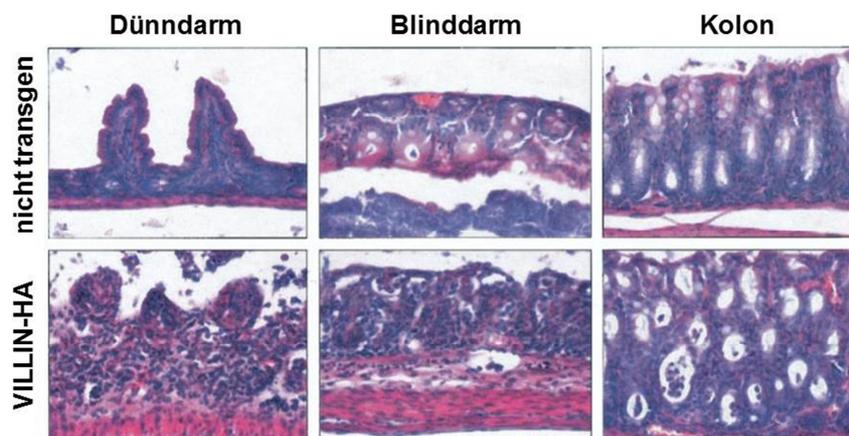


Abbildung 1-9. CD8⁺ T-Zell vermitteltes Darmentzündungsmodell in VILLIN-HA transgenen Mäusen. Ein Modell zur Untersuchung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten im Darm wird durch den adoptiven Transfer HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse induziert. Nach Zelltransfer kommt es im Dün- und Blinddarm der Tiere zur Zerstörung der Epithelbarriere und damit zu einer massiven Entzündung des Darms, während nicht transgene Kontrolltiere keine Pathologie aufweisen. Das Kolon der Tiere ist nicht betroffen (modifiziert nach Westendorf *et al.*, 2006).

Neben den in den letzten Kapiteln beschriebenen Modellen existieren zahlreiche weitere Mausmodelle für die Untersuchung intestinaler Entzündungen. Je nach Fragestellung kann auf verschiedene Chemikalien oder genetisch veränderte Mausstämme zurückgegriffen werden, um die beteiligten Mechanismen zu analysieren. Dabei repräsentiert keines dieser Modelle exakt den Phänotyp von CED wie sie im Menschen vorherrschen. Sie bieten jedoch die Möglichkeit, die Vorgänge, die während akuter und chronischer Darmentzündungen ablaufen, genauer zu untersuchen, um so Ansatzpunkte für neue Therapien zu entwickeln. Zusätzlich bedarf es weiterer Darmentzündungsmodelle, um bisher ungeklärte Fragestellungen (z.B. die Immunantwort antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen) zu untersuchen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Inzidenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa steigt insbesondere in Industriestaaten seit Jahren kontinuierlich an. Durch die nur unzureichend verstandene Ätiologie beider Erkrankungen existieren zurzeit keine kausalen Therapien. Durch die eingesetzten Therapieansätze können zwar sowohl eine Remissionsinduktion als auch eine -erhaltung erzielt werden, eine dauerhafte Entzündungsfreiheit gelingt allerdings nicht, so dass die Entwicklung neuer Therapieoptionen notwendig ist.

Studien belegen, dass es in CED Patienten zu einem immunologischen Toleranzverlust gegenüber kommensalen Darmbakterien und Nahrungsantigenen kommt, wodurch sich eine therapeutische Interventionsmöglichkeit eröffnet. Zentrale Vermittler immunologischer Toleranz sind DCs, darunter insbesondere die Subpopulation der DCs, die den Oberflächenrezeptor DEC-205 exprimieren. In murinen Autoimmunmodellen konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Antigenbeladung von DEC-205⁺ DCs zur Vermittlung verschiedener Toleranzmechanismen und so zur Unterdrückung von Entzündungsprozessen führen kann. Die Rolle von DEC-205⁺ DCs im Darm ist aber unklar.

Ziel dieser Arbeit ist es daher zu prüfen, inwieweit ein DEC-205 vermitteltes *Antigen-Targeting* zur Induktion von intestinaler Toleranz in zwei unterschiedlichen autoimmunen Darmentzündungsmodellen genutzt werden kann. Im ersten Teil der Arbeit wird die funktionelle Modulation naiver CD4⁺ T-Zellen nach DEC-205

vermittelter Antigenbeladung untersucht. In einem zweiten Schritt wird analysiert, ob dieser Ansatz auch die Funktion von T_H1-Effektorzellen modulieren bzw. inhibieren kann. Nach erfolgreicher Etablierung aller Methoden und resultierend aus den Ergebnissen der ersten beiden Teile wird dann der therapeutische Einsatz des *Antigen-Targetings* über DEC-205 für die Toleranzinduktion in der Lunge untersucht.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden – wenn nicht anders angegeben – von Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Für biochemische Arbeiten

Sammelgel (5 %)

3,55 ml H₂O, 750 µl Acrylamid 29:1 (AppliChem, Darmstadt), 625 µl 1 M Tris-HCl (pH = 6,8), 50 µl SDS (10 %), 5 µl TEMED, 4 µl gesättigtes Ammoniumperoxidisulphat

Trenngel (10 %)

4,05 ml H₂O, 3,35 ml Acrylamid 29:1, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8), 100 µl SDS (10 %), 10 µl TEMED, 20 µl gesättigtes Ammoniumperoxidisulphat

4x Ladepuffer

4,59 ml H₂O, 2 ml SDS (20 %), 1,25 ml 1 M Tris

5x Laufpuffer

25 ml SDS (20 %), 15,14 g Tris, 72 g Glycin, ad 1 l H₂O

PBS/T-Puffer

1:200 Tween in PBS-Puffer (engl. *phosphate buffered saline*)

Semi-Dry-Puffer

5,82 g Tris, 200 ml Methanol, 2,93 g Glycin, ad 1 l H₂O

Blocking-Puffer

5 % Milchpulver in PBS/T-Puffer

Für zellbiologische Arbeiten

PBS-Puffer (engl. *phosphate buffered saline*, pH = 7,0)

8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄

FACS-Puffer

PBS-Puffer, 2 % hitzeinaktiviertes FCS (*fetal calf serum*, PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 2 mM EDTA

Erythrozyten-Lysis-Puffer (ACK-Puffer, pH = 7,2-7,4)
8,29 g/l NH₄Cl, 1 g/l KHCO₃, 0,1 mM EDTA

IMDM Zellkulturmedium

IMDM mit GlutaMAX™ und 25 mM HEPES (Invitrogen, Karlsruhe), 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin (beide Sigma Aldrich, Bonn), 25 µM 2-Mercaptoethanol

RPMI Zellkulturmedium

wurde für die Isolierung von Immunzellen aus der Lamina Propria (LP) von des Kolons und der Lunge benutzt. Die entsprechenden Zusätze finden sich in den Kapiteln 2.7.2.3 und 2.7.2.4

ExCell HSF-610 serumfreies Hybridomzellmedium (Sigma Aldrich, Bonn)

HA₁₁₀₋₁₂₀ Peptid (SFERFEIFPKE)

MHCII-restringiertes Epitop des Hemagglutinin (HA) vom Influenza PR/8/34 Virus (Intavis AG, Köln)

2.1.3 Primerpaare

Alle Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. In der folgenden Tabelle sind jeweils die Sequenzen der Vorwärts- und der Rückwärtsprimer angegeben, sowie deren eingesetzte Konzentrationen in der quantitativen Real-Time Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Alle verwendeten Primer sind spezifisch für das Mausgenom.

Tabelle 2-1. Sequenzen verwendeter Primerpaare.

Gen	Primersequenz (vorwärts, rückwärts)	Annealing Temperatur (T _a)	Konzentration (nM)
CXCL9	5'-AAGTTAGCCTGTGTGGGAGC-3' 5'-TTACCGAAGGGAGGTGGACA-3'	55°C	300 / 300
CXCL10	5'-CTCTCCATACTCCCCTTTACCC-3' 5'-GCTTCGGCAGTTACTTTTGTCTCA-3'	55°C	900 / 900
CXCL13	5'-ATTCAAGTTACGCCCCCTGG-3' 5'-TTGGCACGAGGATTCACACA-3'	58°C	300 / 300
CXCR3	5'-GGAGCCCCACCGCCCTACTAAA-3' 5'-AACGCCTGGCCCTCTGTGCTATT-3'	55°C	900 / 50
IFN-γ	5'-AGGAACTGGCAAAGGATGGTGA-3' 5'-TGTTGCTGATGGCCTGATTGTCTT-3'	58°C	300 / 50
IL-10	5'-CTGGACAACATACTGCTAACCGACTC-3' 5'-ATTTCTGGGCCATGCTTCTCTGC-3'	58°C	900 / 50
IL1-β	5'-ACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC-3' 5'-CCCAAGGCCACAGGTATTTT-3'	55°C	50 / 50
RPS-9	5'-CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC-3' 5'-TGACGTTGGCGGATGAGCACA-3'	55°C / 58°C	900 / 50
TNF-α	5'-CAATGCACAGCCTTCCTCACAG-3' 5'-CCCGGCCTTCCAATAAATACAT-3'	58°C	300 / 50

2.1.4 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind alle Antikörper, die für *in vivo* Applikationen, Zellkultur und Durchflusszytometrie verwendet wurden, aufgelistet. Der 6.5-Antikörper (erkennt den HA-spezifischen T-Zell Rezeptor (TZR) auf CD4⁺ T-Zellen aus TCR-HA transgenen Mäusen, siehe Kapitel 2.2.4) wurde aus Zellkulturüberständen der Hybridomzelllinie 6.5 (Kirberg *et al.*, 1994) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.1) und für durchflusszytometrische Analysen mit dem „AlexaFluor647 Protein Labeling Kit“ nach Herstellerangaben gekoppelt (Life Technologies, Darmstadt).

Tabelle 2-2. Verwendete Antikörper.

Epitop	Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3e	Maus	145-2C11	ungekoppelt	BD Bioscience (Heidelberg)
CD4	Maus	RM4-5	Pacific Blue	BD Bioscience (Heidelberg)
CD4	Mensch	MT310	ungekoppelt	DAKO (Glostrup, Dänemark)
CD11c	Maus	HL3	Allophycocyanin	BD Bioscience (Heidelberg)
CD28	Maus	37-51	ungekoppelt	BD Bioscience (Heidelberg)
CXCR3	Maus	CXCR3-173	Phycoerythrin	eBioscience (San Diego, USA)
CXCR3	Mensch	ABIN739014	ungekoppelt	antikörper-online (Aachen)
DEC-205	Maus	NLDC-145	ungekoppelt	<i>beschrieben bei Witmerpack et al., 1995</i>
<i>Isotypkontrolle für α-DEC-205</i>	Maus	GL117	ungekoppelt	<i>Beschrieben bei Mahnke et al., 2003</i>
Foxp3	Maus	FJK-16s	Phycoerythrin	eBioscience (San Diego, USA)
HA ₁₁₀₋₁₂₀ Epitop	Maus	CMI1.2	ungekoppelt	<i>beschrieben bei Westendorf et al., 2005a</i>
HA-spezifischer TZR	Maus	6.5	AlexaFluor647	<i>beschrieben bei Kirberg et al., 1994</i>
IFN-γ	Maus	XMG1.2	Phycoerythrin	eBioscience (San Diego, USA)
IL-4	Maus	11B11	ungekoppelt	BD Bioscience (Heidelberg)
IL-10	Maus	JES5-2A5	ungekoppelt	BioXCell (West Lebanon, USA)
<i>Isotypkontrolle für α-IL-10</i>	Maus	HRPN	ungekoppelt	BioXCell (West Lebanon, USA)

2.2 Mäusstämme

Alle verwendeten Mäusstämme waren auf BALB/c Hintergrund und jeweils homozygot für ihr Transgen bzw. den *Knock-Out*. Die Mäuse wurden in der tierexperimentellen Einheit des Uniklinikums Essen unter SPF-Bedingungen (engl. *specific pathogen free*) gehalten und gezüchtet. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse in der Regel 8-14 Wochen alt.

2.2.1 BALB/c

BALB/c Mäuse wurden aus den Laboratorien der Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen.

2.2.2 VILLIN-HA

Die transgene Mauslinie VILLIN-HA exprimiert das Hemagglutinin des Influenza Virus A/PR/8/34 unter der Kontrolle des Enterozyten-spezifischen VILLIN-Promotors (Westendorf *et al.*, 2005b).

2.2.3 SPC-HA

SPC-HA Mäuse exprimieren das HA unter dem Lungen-spezifischen Promotor des *surfactant protein C* (SPC), der in alveolaren Epithelzellen des Typ II aktiv ist (Bruder *et al.*, 2004).

2.2.4 TCR-HA

Ca. 20 % der CD4⁺ T-Zellen in TCR-HA transgenen Mäusen exprimieren einen T-Zell Rezeptor, der spezifisch das MHC Klasse-II H2E^d:HA₁₁₀₋₁₂₀-restringierte Epitop des Influenza Hemagglutinin erkennt (Kirberg *et al.*, 1994).

2.2.5 Foxp3-GFP

Foxp3-GFP transgene Reporter-mäuse exprimieren eGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*) unter der Kontrolle des Treg-spezifischen Foxp3 Promotors (Haribhai *et al.*, 2007). Dieser Stamm wurde ursprünglich aus dem Jackson Laboratory erworben und am Universitätsklinikum Essen fortgezüchtet.

Für einige Experimente wurden TCR-HA transgene mit Foxp3-GFP transgenen Mäusen verpaart. Die Verpaarungen wurden jeweils mit heterozygoten Tieren angesetzt und nach Geburt der Tochtergenerationen wurden diese auf Homozygotie überprüft.

2.2.6 RAG2^{-/-}

RAG2^{-/-} Mäuse besitzen durch eine Mutation im rekombinationsaktivierenden Gen 2 (*recombination activating gene 2*, RAG2) keine reifen B- und T-Zellen (Shinkai *et al.*, 1992).

2.3 Genotypisierung transgener Mausstämme

Die Identifikation transgener Mausstämme wurde mittels Genotypisierungs-PCR mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die Primerpaare, die spezifisch für das jeweils untersuchte Transgen bzw. den *Knock-Out* sind, aufgeführt.

Tabelle 2-3 Primerpaare zur Genotypisierung transgener Mausstämme.

Transgen	Primersequenz (vorwärts, rückwärts)	Annealing Temperatur (T _a)
Foxp3-GFP	5'-GCGTAAGCAGGGCAATAGAGG-3' 5'-GCATGAGGTCAAGGGTGATG-3'	58°C
RAG2 ^{-/-}	5'-ATGTCCCTGCAGATGGTAACA-3' 5'-GCCTTTGTATGAGCAAGTAGC-3'	57°C
SPC-HA	5'-ATAGTTTTCCGTTGTGGCTGTCTT-3' 5'-CTGGAGGGCCAGGAACAAACAGGC-3'	52°C
TCR-HA	5'-TAGGAGAAAGCAATGGAGAC-3' 5'-GTACCTGGTATAACACTCAG-3'	58°C
VILLIN-HA	5'-GCCTTAAGCCGGCTGTGATAGCA-3' 5'-CTGGAAGCAGTGGTTCGCATTCT-3'	55,6°C

Die PCR-Reaktion wurde mit folgendem Standardreaktionsansatz durchgeführt:

x ng	genomische DNA
1x	Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
1,5 mM	MgCl ₂ (Promega, Mannheim)
1 mM	dNTP Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)
5 µM	Vorwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
5 µM	Rückwärtsprimer (MWG Biotech, Ebersberg)
0,5 U	GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, Mannheim)
ad 20 µl	MilliQ H ₂ O

Die PCR-Amplifikationen wurden mit folgendem Programm in einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt:

Tabelle 2-4 PCR-Programm zur Genotypisierung transgener Mausstämme.

	10 Zyklen				27 Zyklen		
Temperatur	95°C	95°C	T _a	72°C	95°C	T _a	72°C
Zeit (mm:ss)	10:00	0:30	1:30	1:30	0:15	0:45	1:30

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen

Zellkulturüberstände aus Hybridomzellkulturen (siehe Kapitel 2.7.1) wurden im Verhältnis 1:1 mit Protein G Bindepuffer (Pierce Biotechnology, USA) vermischt und durch einen 0,2 µm Filter (*rapid 250*, TPP, Schrasadingen, Schweiz) gegeben um ungelöste Stoffe zu entfernen. Anschließend wurde der gesamte Überstand auf eine immobilisierte Protein G Säule (Pierce Biotechnologies) gegeben, um den entsprechenden Antikörper an die Säulenmatrix zu binden. Daraufhin wurde die Säule mit 10 ml Protein G Bindepuffer gewaschen und der Antikörper mit 10 ml

Elutionspuffer (100 mM Glycin, pH = 3) eluiert. Dazu wurden insgesamt 5 Fraktionen zu je 1 ml in Reaktionsgefäßen gesammelt, in die zuvor 100 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris, pH = 7,5) vorgelegt worden war, um den Antikörper nach Eluierung zu stabilisieren. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde bei einer Extinktion von 280 nm am Photospektrometer (NanoDrop, Thermo Scientific, Bonn) bestimmt und die drei Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen wurden vereinigt. Um Pufferreste aus den Eluaten zu entfernen wurde die Antikörperlösung nun für 24 Stunden in einer „Slide-A-Lyzer“ Dialyse Kassette (Thermo Scientific, Bonn) gegen PBS dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Antikörper bei 4°C gelagert.

2.4.2 Herstellung von Antikörper-Peptid-Konjugaten

Für das *in vivo Antigen-Targeting* des DEC-205 Rezeptors wurde der monoklonale α-DEC-205 Antikörper an das MHC-II-restringierte Hemagglutinin-Epitop HA₁₁₀₋₁₂₀ (SFERFEIFPKE) des Influenza PR/8/34 Virus gekoppelt. Für die chemische Kopplung von Antikörper und Peptid wurde der *cross-linker* „Sulfosuccinimidyl 4-N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate“ (Sulfo-SMCC) verwendet. Die Reaktion erfordert die sogenannte Aktivierung des zu koppelnden Peptids. Dazu wurde das oben genannte immunogene HA-Epitop folgendermaßen modifiziert: **CSVSSFERFEIFPKESS** (Intavis AG, Köln; fettgedruckt ist Modifikation zum Ursprungspeptid). Zu Beginn der Kopplung wurde 1 mg des α-DEC-205 bzw. des Isotyp-Kontrollantikörpers über Konzentratorsäulen (VivaSpin 6, MWCO 10.000, Sartorius, Göttingen) auf ein Volumen von 300 µl aufkonzentriert. Nun wurde ein Aliquot des *cross-linkers* „NoWeigh Sulfo-SMCC“ (Thermo Scientific, Bonn) bei 50°C im Wasserbad in PBS gelöst. 14 µl des gelösten *cross-linkers* wurden daraufhin zu dem aufkonzentrierten Antikörper gegeben, gut gemischt und für 2 Stunden auf Eis inkubiert, um beide Komponenten kovalent miteinander zu verbinden. Anschließend erfolgte eine Umpufferung mit Entsalzungssäulen (*Zeba Desalt Spin Columns*, Thermo Scientific, Bonn) nach Herstellerangaben, um ungebundene Reste des *cross-linkers* zu entfernen. In der Zwischenzeit wurde 1 mg des aktivierten HA-Peptids in 300 µl PBS gelöst und auf Eis zum Antikörper-*cross-linker*-Konjugat pipettiert und weitere 2 Stunden auf Eis inkubiert. Um abschließend ungebundenes HA-Peptid aus der Lösung zu entfernen wurde das Antikörper-Peptid-Konjugat (DEC-HA bzw. ISO-HA) wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben über eine Protein G Säule aufgereinigt.

2.4.3 SDS-PAGE und Western Blot

Die Überprüfung der erfolgreichen Kopplung der Antikörper-Peptid-Konjugate wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden je 250 ng des gekoppelten DEC-HA bzw. ISO-HA mit SDS-Ladepuffer versetzt, auf ein 10 %-iges SDS-Sammegel aufgetragen und bei 40 mA für eine Stunde durch Elektrophorese in einem „*Mini Protean TetraCell*“-System (Biorad, München) aufgetrennt. Der „*PageRuler Prestained Protein Ladder*“ (Thermo Scientific, Bonn) diente dabei als Größenmarker. Im nächsten Schritt wurden die Proteine in einer „*TransBlot Semi-Dry Transfer Cell*“-Kammer (Biorad, München) unter Zuhilfenahme von „*Semi-Dry*“-Puffer bei 25 mA für 30 min auf eine Protran Nitrozellulosemembran (Whatman, GE Healthcare, Freiburg) geblottet. Es folgte ein weiterer Waschzyklus der Membran in PBS/T-Puffer mit anschließendem Blockieren der unspezifischen Bindestellen für eine Stunde in *Blocking*-Puffer. Nach weiteren drei zehnmütigen Waschschritten in PBS/T-Puffer wurde die Membran für eine Stunde mit einem Primärantikörper spezifisch gegen das HA₁₁₀₋₁₂₀ Epitop (Klon CMI1.2, gewonnen aus Hybridomüberständen, (Westendorf *et al.*, 2005a)) inkubiert, woraufhin eine einstündige Inkubation mit einem α -Maus-*horseradish-peroxidase-linked* Antikörper (Cell Signaling, Danvers, USA) folgte. Nach einem letztmaligen Waschzyklus in PBS/T-Puffer erfolgte die Entwicklung des Western Blots nach Zugabe der Entwicklungsreagenzien „*Western Lightning Plus: Enhanced Luminol Reagent Plus*“ und „*Oxidizing Reagent Plus*“ (PerkinElmer, USA) auf die Membran in einem „*FUSION XPRESS*“ (Vilber Lourmat, Eberhardzell) Entwicklungssystem.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus Gewebebiopsien wurde das Qiagen *Fibrous Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) benutzt; für die Isolation aus Einzelzellsuspensionen das RNA Mini XS Kit (Macherey-Nagel, Düren). In beiden Fällen wurde nach Herstellerangaben inkl. 15-minütigem DNA-Verdau gearbeitet. Nach erfolgter Isolierung wurde die Konzentration der RNA mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop, Thermo Scientific, Bonn) bestimmt und 1-3 μ g der RNA für die anschließende cDNA-Synthese eingesetzt.

2.5.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde isolierte RNA mit jeweils 0,5 µl Oligo(dt) und *Random Primern* (beide Invitrogen, Karlsruhe) für 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert, bevor anschließend ein Mastermix bestehend aus 1 µl dNTPs (10 mM) (Fermentas, St. Leon Rot), 4 µl 5x M-MLV RT-Puffer und 1 µl M-MLV reverse Transkriptase (H-) (beide Promega, Mannheim) zugegeben und der Reaktionsansatz für 1 h bei 42°C inkubiert wurde. In einem abschließenden Schritt wurde das Enzym durch eine 5-minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert und die synthetisierten cDNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Zur besseren Einstellung der einzusetzenden cDNA Templatmenge in der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) wurde zunächst eine semi-quantitative PCR mit spezifischen Primern für das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Im Folgenden sind der dafür verwendete Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm aufgeführt.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

1 µl	cDNA Template
1x	Reaktionspuffer (Promega, Mannheim)
1,5 mM	MgCl ₂ (Promega, Mannheim)
1 mM	dNTP Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)
5 µM	RPS-9 Vorwärtsprimer
5 µM	RPS-9 Rückwärtsprimer
0,5 U	GoTaq Hot Start Polymerase (Promega, Mannheim)
ad 20 µl	MilliQ H ₂ O

Tabelle 2-5 PCR-Programm für die semi-quantitative PCR.

	30 Zyklen				
Temperatur	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C
Zeit (mm:ss)	10:00	0:45	0:45	1:00	10:00

Zur relativen Quantifizierung der Expressionsstärken verschiedener Gene wurde anschließend auf die Methode der quantitativen Real-Time PCR zurückgegriffen. Auf Basis der semi-quantitativen PCR wurde die einzusetzende cDNA Templatmenge für alle Proben angeglichen. Die Proben wurden in Duplikaten eingesetzt. Für die Quantifizierung der jeweils untersuchten Gene wurden sowohl für das Haushaltsgen RPS-9 als auch für die entsprechenden Zielgene Standardgeraden in die Analyse miteinbezogen. Die qPCR wurde in einem 7500 Fast Real-Time System durchgeführt und mithilfe der „7500 Fast Real-Time System“ Software analysiert (beide Applied

Biosystems, Darmstadt). Der qPCR-Reaktionsansatz sowie das -Programm sind im Folgenden aufgeführt:

qPCR-Reaktionsansatz:

~ 20 ng cDNA-Template
 1x Fast SYBR Green MasterMix (Life Technologies, Darmstadt)
 50-900 nM Vorwärtsprimer
 50-900 nM Rückwärtsprimer
 ad 20 µl MilliQ H₂O

Tabelle 2-6 PCR-Programm für die quantitative Real-Time PCR.

	40 Zyklen				Schmelzkurve			
Temperatur (°C)	95	95	55 / 58	72	95	60	95	60
Zeit (mm:ss)	10:00	0:15	0:30	0:30	0:15	1:00	0:15	0:15

Zur Errechnung der relativen Expressionsstärken wurde der Quotient aus dem Wert des entsprechenden Zielgens und dem Wert für das Haushaltsgen RPS-9 ermittelt.

2.5.4 Transkriptomanalysen (Microarrays)

Durchflusszytometrisch sortierte, HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus der Lamina Propria des Kolons von VILLIN-HA Mäusen wurden Transkriptomanalysen auf Genexpressionsarrays unterzogen (Agilent Technologies, Waldbronn). Isolierte RNA aus dem Zellmaterial wurde elektrophoretisch am Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn) auf Konzentration und Reinheit analysiert. Anschließend wurde die RNA zunächst in cDNA und daraufhin in Cy3-markierte cRNA unter Zuhilfenahme des „Quick Amp Labeling Kit, one-color“ (Agilent Technologies, Waldbronn) umgeschrieben. Die Konzentration der cRNA sowie die erfolgreiche Kopplung von Cy3 wurde am Spectrophotometer (Nanodrop, PEQLAB, Erlangen) bestimmt. 1,6 µg cRNA jeder zu untersuchenden Probe wurde auf den Genchips „G4122F whole mouse genome microarray 4 x 44 K 60mer“ (Agilent Technologies, Waldbronn) für 16 Stunden bei 68°C hybridisiert. Anschließend wurden die Genchips am „DNA Microarray Scanner“ (Agilent Technologies, Waldbronn) analysiert. Die Signalstärken wurden mit der „Feature Extraction Software 10.5.1.1“ ausgewertet und die statistische Überprüfung mit der „Genespring Software“ (Agilent Technologies, Waldbronn) durchgeführt. Die Rohsignalintensitäten wurden auf den Median aller Proben normalisiert und anschließend in den *log dualis* (Log₂)

umgewandelt. Die Transkriptomanalysen erfolgten in Kooperation mit Dr. Robert Geffers (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig). Die Daten der Transkriptomanalyse sind dieser Arbeit als CD-ROM beigelegt.

2.6 Tierexperimentelle Methoden

2.6.1 Organentnahme

Nach dem Töten der Mäuse per Genickdislokation wurden die Tiere auf dem Rücken liegend fixiert, mit Ethanol eingesprüht, entlang der Bauchdecke aufgeschnitten und die jeweils zu untersuchenden Organe herauspräpariert und zunächst in kaltem PBS auf Eis gelagert. Für die Präparation von Lungen wurden diese vor der Entnahme zunächst mit 5-10 ml kaltem PBS perfundiert, indem die Aorta durchtrennt und anschließend das PBS mittels einer Kanüle in das Herz injiziert wurde.

2.6.2 Entzündungsmodelle

2.6.2.1 Induktion einer Darmentzündung durch naive, HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen

Aus den Milzen von TCR-HA/Foxp3-GFP transgenen Mäusen wurden HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert (siehe Kapitel 2.7.5). Zur Induktion einer Kolitis wurden die sortierten Zellen in sterilem PBS aufgenommen und je $2,75 \times 10^6$ (in 200 μ l PBS) mithilfe einer Feindosierungsspritze (0,3x12 mm, B. Braun AG, Melsungen) intra-venös (i.v.) in die Schwanzvene transgener VILLIN-HA Mäuse injiziert (adoptiver Zelltransfer). Als Kontrolle wurden die Zellen in nicht transgene Geschwistertiere transferiert. An Tag 6 nach Zelltransfer wiesen die Tiere in der Regel einen Gewichtsverlust von 10-15 % auf und wurden zu diesem Zeitpunkt für weitere Analysen getötet.

2.6.2.2 Induktion einer Darmentzündung durch HA-spezifische T_H1-Zellen

Für die Induktion einer Entzündung des Kolons und des Dünndarms wurden HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen TCR-HA transgener Mäuse durchflusszytometrisch isoliert. Diese Zellen wurden daraufhin *in vitro* zu T_H1-Zellen differenziert (siehe Kapitel 2.7.7). An Tag 6 der Zellkultur wurden die Zellen geerntet, in sterilem PBS aufgenommen und je 3×10^6 T_H1 Zellen i.v. in transgene VILLIN-HA

Mäuse transferiert. Als Kontrolle wurden die Zellen in nicht transgene Geschwistertiere transferiert. An Tag 5 nach Zelltransfer wiesen die Mäuse in der Regel einen Gewichtsverlust von 10-15 % auf und wurden zu diesem Zeitpunkt für weitere Analysen getötet.

2.6.2.3 Induktion einer Lungenentzündung durch HA-spezifische T_H1-Zellen

Analog zur Induktion der T_H1-Zell vermittelten Darmentzündung (siehe Kapitel 2.6.2.2.) wurden HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen zu T_H1-Zellen differenziert und je 1×10^6 dieser Zellen i.v. in SPC-HA transgene Mäuse transferiert. Als Kontrolle wurden die Zellen in nicht transgene Geschwistertiere transferiert. 8 Tage nach Zelltransfer wiesen die Tiere in der Regel einen Gewichtsverlust von 10-15 % auf und wurden zu diesem Zeitpunkt für weitere Analysen getötet.

2.6.3 Behandlung von Mäusen zur Untersuchung von Toleranzmechanismen

2.6.3.1 *In vivo* Antigen-Targeting über den DEC-205 Rezeptor

Für das *Antigen-Targeting* über den DEC-205 Rezeptor wurden sowohl VILLIN-HA als auch SPC-HA transgene Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vor dem T-Zelltransfer mit je 1 µg der DEC-HA bzw. ISO-HA Konjugate behandelt. Einer weiteren Kontrollgruppe wurde steriles PBS injiziert. Dazu wurden die Konjugate der Menge entsprechend in sterilem PBS verdünnt (200 µl pro Maus) und mithilfe einer Feindosierungskanüle intra-peritoneal (i.p.) in die Mäuse injiziert. In einigen Experimenten erfolgte die Behandlung mit den erwähnten Komponenten unter den gleichen Bedingungen mit naiven BALB/c Mäusen.

2.6.3.2 Injektion eines CXCR3 Antagonisten

Sowohl VILLIN-HA als auch SPC-HA transgenen Mäusen wurden mit dem CXCR3 Antagonisten Axon1800 (Axon Medchem, Groningen, Niederlande) behandelt. Dazu wurden den Mäusen in den Entzündungsmodellen mit Beginn des T-Zelltransfers täglich, bis einen Tag vor der Analyse, je 150 µg des in sterilem PBS gelösten Antagonisten i.p. injiziert. Einer Kontrollgruppe wurde steriles PBS injiziert wurde.

2.6.3.3 Behandlung von Mäusen mit einem neutralisierenden α -IL-10 Antikörper

VILLIN-HA transgene Mäuse wurden wie in Kapitel 2.6.3.1 beschrieben mit DEC-HA bzw. ISO-HA behandelt. Beginnend mit der Injektion beider Konjugate, wurden den Mäusen täglich 50 μ g eines α -IL-10 Antikörpers i.p. injiziert (siehe Tabelle 2-2). Diese α -IL-10 Behandlung wurde täglich über den gesamten Versuchszeitraum fortgeführt und endete einen Tag vor Tötung und Analyse der Tiere. Als Kontrolle wurde einer Versuchsgruppe ein Isotypkontrollantikörper injiziert (siehe Tabelle 2-2).

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung von Hybridomzelllinien für die Antikörperproduktion

Der spezifische α -DEC-205 Antikörper aus dem Hybridomzellklon NLDC-145 wurde erstmals von Swiggard und Kollegen beschrieben (Swiggard *et al.*, 1995). Der entsprechende Isotypkontrollantikörper wurde aus dem Klon GL117 gewonnen (beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Karsten Mahnke, Universität Heidelberg). Zur Gewinnung von Antikörpern wurden beide Zelllinien in ExCell HSF-610 serum- und zusatzfreiem Hybridomzellmedium (Sigma-Aldrich, Bonn) in einem Gesamtvolumen von 500 ml im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert, bis die Vitalitätsrate der Zellen unter 20 % lag (ca. 10-12 Tage nach Beginn der Zellkultur). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in zwei Schritten abzentrifugiert (10 min bei 300 x g, 15 min bei 1000 x g). Der so erhaltene Überstand wurde bis zur Antikörperaufreinigung (siehe Kapitel 2.4.1) bei 4°C gelagert.

2.7.2 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

2.7.2.1 Milz

Milzen wurden aus Mäusen herauspräpariert und mit Hilfe einer Kanülenspritze mit 10 ml ACK-Puffer gespült, um die Erythrozyten zu lysieren. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit FACS-Puffer gewaschen, durch ein 70 μ m Zellsieb (BD Bioscience, Heidelberg) filtriert und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet für die weitere Verwendung in FACS-Puffer aufgenommen.

2.7.2.2 Lymphknoten

Sowohl mesenterische als auch bronchiale Lymphknoten (BLN) wurden nach der Präparation zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen in FACS-Puffer durch ein 70 µm Zellsieb gerieben, die Zellsuspension für 10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend in einer definierten Menge FACS-Puffer aufgenommen.

2.7.2.3 Lamina Propria

Für die Gewinnung von Immunzellen aus der Lamina Propria wurden die Kolons von Mäusen präpariert und mit kaltem PBS durchgespült, um den Darminhalt zu entfernen. Anschließend wurden die Därme der Länge nach aufgeschnitten, in ca. 1 cm große Stück geschnitten und zweimal für 10 min in 30 ml PBS / 3 mM EDTA unter Rühren bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde jeweils dekantiert. In zwei weiteren Rührschritten wurden die Darmstücke anschließend in RPMI / 1 % FCS / 1 mM EGTA / 1mM MgCl₂ für je 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Herauslösen der Immunzellen aus der Lamina Propria wurden die Darmstücke mit einer Schere sehr klein geschnitten und für 1 ½ Stunden in 15 ml RPMI / 20 % FCS / 100 U/ml Collagenase Typ IV aus *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich, Bonn) unter Rühren bei 37°C verdaut. Zum mechanischen Herauslösen der Immunzellen wurde die Zellsuspension zusätzlich nach der Hälfte des Verdauvorgangs mit einer 10 ml Spritze 5-10 mal auf- und abgezogen. Nach Ende des Collagenase Verdau wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb filtriert, mit PBS gewaschen, 10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend in FACS-Puffer aufgenommen.

2.7.2.4 Lunge

Nach dem Perfundieren und Herauspräparieren der Lungen wurden diese auf Eis mit einer Schere sehr klein geschnitten und für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad in 3 ml RPMI / 5 % FCS / 100 U/ml Collagenase Typ IV aus *Clostridium histolyticum* verdaut. Während dieser Zeit wurde die Zellsuspension alle 5-10 Minuten mit einer Einmalpipette auf- und abpipettiert. Nach erfolgtem Collagenase Verdau wurde die Suspension durch ein 70 µm Zellsieb gerieben, mit ACK-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einer definierten Menge FACS-Puffer aufgenommen.

2.7.2.5 Mononukleäre Blutzellen

Frisch entnommenes Patientenblut wurde im Verhältnis 1:1 mit sterilem PBS verdünnt. Mononukleäre Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC)

wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Lymphoprep (Stemcell, Köln) isoliert und bis zur Analyse in Einfriermedium (90 % FCS / 10 % DMSO) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.7.3 Isolierung verschiedener Immunzellpopulation

2.7.3.1 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen

Für die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus der Milz wurde das autoMACS Separationssystem sowie das „CD4⁺ T cell isolation Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) nach Herstellerangaben benutzt.

2.7.3.2 Isolierung von CD11c⁺ dendritischen Zellen

Für die Isolierung von CD11c⁺ DCs wurden Mäusen Milzen entnommen, mit einer Schere sehr klein geschnitten und für 45 min bei 37°C in 2,5 ml FACS-Puffer / 1 mg/ml Collagenase D (Roche Diagnostics, Mannheim) / 10 µg/ml DNase Typ II (Sigma Aldrich, Bonn) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb gerieben, mit ACK-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Die darauffolgende Isolierung von CD11c⁺ DCs erfolgte mit dem autoMACS Separationssystem nach Herstellerangaben unter Verwendung von „CD11c⁺ (N418) MicroBeads“ (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach).

2.7.4 Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Analysen wurde ein BD LSR II Durchflusszytometer mit FACS Diva Software verwendet (BD Bioscience, Heidelberg).

2.7.4.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Für die Analyse der Expression von Oberflächenproteinen wurden fluorochromgekoppelte Antikörper verwendet und für die Färbung in verschiedenen Konzentrationen in FACS-Puffer angesetzt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde zusätzlich der lebend/tot-Farbstoff 7AAD (eBioscience, San Diego, USA) im Verhältnis 1:40 in die Antikörperlösung gegeben. Bis zu 10⁶ Zellen wurden in 96-well Rundbodenplatten überführt, 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 4°C im Dunkeln mit je 100 µl Antikörperlösung inkubiert, bevor sie mit 100 µl FACS-Puffer

gewaschen wurden. Für die anschließende durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in mindestens 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.7.4.2 Intrazelluläre Färbung von IFN- γ und Foxp3

Für die intrazelluläre Färbung von IFN- γ wurden Zellen zunächst in 100 µl IMDM Komplettmedium mit 10 ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin in Anwesenheit von 5 µg/ml des Golgi-Blockers Brefeldin A (alle Sigma Aldrich, Bonn) für 4 Stunden bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmoleküle gefärbt (siehe Kapitel 2.7.4.1). In den nächsten Schritten wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd für 15 min bei 4°C fixiert, mit PBS gewaschen und die Zellmembran mit 0,1 % NP40 (Sigma Aldrich, Bonn) für 4 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer erfolgte die intrazelluläre Färbung mit einem α -IFN- γ Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln und die anschließende durchflusszytometrische Analyse.

Die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 erfolgte nach Färbung der Oberflächenproteine durch Fixierung und Permeabilisierung mit einer „Fix/Perm-Lösung“ (eBioscience, San Diego, USA) für 2 Stunden bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit Perm-Puffer (eBioscience, San Diego, USA) gewaschen und mit einem α -Foxp3 Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt und daraufhin durchflusszytometrisch analysiert.

2.7.5 Sortieren verschiedener Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Für das Sortieren bestimmter Zellpopulationen erfolgte zunächst die Oberflächenmarkierung der entsprechenden Proteine (siehe Kapitel 2.7.4.1) und das anschließende Sortieren der Zellen an einem BD FACS Aria II Zellsorter mit FACS Diva Software (BD Bioscience, Heidelberg). Die Reinheit der sortierten Zellen lag in der Regel bei $\geq 95\%$.

2.7.6 Analyse der Proliferation von Lymphozyten

2.7.6.1 Markierung von Lymphozyten mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor670

Für Proliferationsexperimente wurden HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen mit dem fluoreszenzaktiven Proliferationsfarbstoff eFluor670 („*cell proliferation dye*“, eBioscience, San Diego, USA) nach Herstellerangaben markiert. Das zugrundeliegende Prinzip beruht darauf, dass Lymphozyten sich nach TZR-Stimulus teilen und dabei die Hälfte des Proliferationsfarbstoffs an die hervorgehende Tochterzelle abgeben. Dies ist durchflusszytometrisch anhand der Abnahme der Fluoreszenzintensität detektierbar.

2.7.6.2 *In vitro* Proliferation von HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Naiven BALB/c Mäusen wurden 0,1 µg, 1 µg oder 10 µg DEC-HA i.p. injiziert. Als Kontrolle wurde einer Versuchsgruppe 10 µg des Kontrollkonjugats ISO-HA injiziert. Am Tag darauf wurden CD11c⁺ DCs aus den Milzen und MLN der Mäuse mittels MACS-Technologie (siehe Kapitel 2.7.3.2) bzw. durchflusszytometrisch aus der Lamina Propria des Kolons (siehe Kapitel 2.7.5) isoliert. Anschließend wurden unterschiedliche Zellzahlen der isolierten DCs mit je $2,5 \times 10^5$ eFluor670-markierten HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in IMDM Komplettmedium ko-kultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde an Tag 4 durchflusszytometrisch bestimmt.

2.7.6.3 *In vivo* Proliferation von HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

RAG2^{-/-} Mäusen wurden 10 µg DEC-HA oder ISO-HA i.p. injiziert. Am nächsten Tag wurden je 1×10^6 eFluor670-markierte CD4⁺ T-Zellen aus Milzen von TCR-HA Mäusen adoptiv in die behandelten RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. 5 Tage nach Zelltransfer wurden Einzelzellsuspension der Milzen, MLN und der Lamina Propria der Kolons präpariert und die Proliferation der transferierten CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.7.7 Differenzierung von HA-spezifischen T_H1-Zellen

Für die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu IFN-γ-produzierenden T_H1-Zellen wurden HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen von TCR-HA transgenen Mäusen durchflusszytometrisch isoliert (siehe Kapitel 2.7.5). $1 - 1,5 \times 10^6$ der sortierten HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurden für die Differenzierung in IMDM Komplettmedium mit folgenden Zusätzen aufgenommen: 1 µg/ml α-CD28, 200 ng/ml α-IL-4, 20 ng/ml rekombinantes IL-12 (R&D Systems, Wiesbaden). Die Zellen wurden

anschließend in einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät. Die Platte war vorher mit 5 µg/ml eines α-CD3e Antikörpers beschichtet worden, indem der in PBS gelöste Antikörper in die 24-well Platte überführt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Platte dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 6 Tage bei 37°C inkubiert. An Tag 3 der Zellkultur wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 in frischem IMDM Komplettmedium inkl. α-IL-4 und IL-12 gesplittet. An Tag 6 erfolgte die Überprüfung der Differenzierung durch intrazelluläre Färbung des Zytokins IFN-γ (siehe Kapitel 2.7.4.2) und anschließende durchflusszytometrische Analyse.

2.7.8 *In vitro* Migrationsexperimente

BALB/c Mäusen wurden an Tag -2 und -1 je 1 µg DEC-HA, ISO-HA oder 200 µl steriles PBS i.p. injiziert. An Tag 0 wurden je 5 x 10⁶ HA-spezifische T_H1-Zellen bzw. 3 x 10⁶ naive CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen von TCR-HA Mäusen adoptiv in die Mäuse transferiert. An Tag 7 nach Zelltransfer erfolgte die durchflusszytometrische Re-Isolation dieser Zellen aus den Milzen der Mäuse. Anschließend wurden *in vitro* Migrationsexperimente in *Transwell* Platten mit Polycarbonat Filtereinsätzen und 5 µm Porengröße (Corning, Tewksbury, USA) durchgeführt. 200 ng/ml des rekombinanten Chemokins CXCL10 (R&D Systems, Wiesbaden) wurde in IMDM Komplettmedium verdünnt und in die untere Kammer der *Transwell* Platte vorgelegt. Die Filtereinsätze wurden anschließend darauf gesetzt und je 5 x 10⁵ der re-isolierten CD4⁺ T-Zellen darauf pipettiert. Die Platte wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die Anzahl der durch die Filtereinsätze migrierten Zellen bestimmt. Der Migrationsindex der Zellen wurde als folgender Quotient ermittelt:

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{Anzahl migrierter Zellen Richtung Medium + CXCL10}}{\text{Anzahl migrierter Zellen Richtung Medium ohne Zusätze}}$$

2.7.9 Aktivierung von CD11c⁺ dendritischen Zellen

CD11c⁺ DCs wurden per MACS-Technologie aus Milzen von Mäusen isoliert (siehe Kapitel 2.7.3.2) und in IMDM Komplettmedium aufgenommen. Je 5 x 10⁵ DCs wurden in einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät und für 18 Stunden bei 37°C mit

100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma Aldrich, Bonn) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die DCs für qPCR Analysen (siehe Kapitel 2.5.3) und die Zellkulturüberstände für die Detektion sezernierter Zytokine (siehe Kapitel 2.7.10) verwendet.

2.7.10 Detektion sezernierter Zytokine

In Zellkulturüberständen wurden die Konzentrationen sezernierter Zytokine analysiert. Für die Detektion von sezerniertem IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12p40, IL-17, IL-23 und TNF- α wurde das „Procarta Cytokine Assay Kit“ (Panomics, Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Durchgeführt wurden die Messungen an einem Luminex200 Gerät mithilfe der Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA).

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 Histopathologische Analyse von Maudärmen

Zur Bestimmung des Schweregrades der Entzündung von Kolons und Dünndärmen sowie von Lungen in den jeweiligen Entzündungsmodellen wurden histopathologische Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Organe präpariert, die Därme in Standardeinbett-Kassetten eingerollt und zur Fixierung in 4 % Paraformaldehyd eingelegt. Die Lungen wurden nach dem Perfundieren ebenfalls in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach anschließender Paraffineinbettung erfolgte das Schneiden der Organe an einem Mikrotom. Die Dünnschnitte wurden daraufhin mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und in einem Lichtmikroskop mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und fotografiert. Der Schweregrad der Pathologie wurde für die untersuchten Organe gemäß der folgenden Parameter bestimmt und jeweils aufsummiert. In Klammern ist der mögliche Schweregrad von 0 (= keine Pathologie) bis 3 bzw. 5 (= hochgradige Pathologie) der entsprechenden Parameter angegeben. Für jedes Kolon bzw. jeden Dünndarm wurde die Beurteilung jeweils für einen oralen, einen mittigen und einen rektalen Abschnitt vorgenommen.

Tabelle 2-7 Beurteilung von Entzündungsparametern im Darm und Lunge

Kolon und Dünndarm	Lunge
Entzündungszellinfiltration in Lamina Propria und Tela Submucosa (0-3)	Infiltration mit Lymphozyten / Plasmazellen (0-5)
Zottenfusion und -verkürzung (0-3)	Akkumulation von Alveolarmakrophagen (0-5)
Epithelzellhyperplasie (0-3)	Epithelzellhyperplasie (0-3)
Epithelzellnekrosen und -erosion (0-3)	Neutrophile Granulozyten in Alveolen und Interstitium (0-3)

Die histopathologischen Analysen erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Achim Gruber und Prof. Dr. Robert Klopffleisch (Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin).

2.8.2 Fluoreszenzmarkierung humaner Darmbiopsien

Biopsien aus dem Ileum bzw. dem Kolon wurden im Zuge einer Ileokoloskopie mittels Zange gewonnen. Bei Patienten mit Morbus Crohn wurde das terminale Ileum bzw. das Kolon biopsiert, bei Patienten mit Kolitis ulcerosa das Kolon. Die Diagnose Morbus Crohn oder Kolitis ulcerosa wurde nach Standardkriterien (klinisch, endoskopisch, histologisch, radiologisch) etabliert. Eine infektiöse Ursache der Entzündung wurde ausgeschlossen. Bei den betroffenen Patienten wurden gezielt spezifisch entzündete Areale biopsiert. Bei Kontrollpatienten wurden die Biopsien aus makroskopisch und korrespondierend auch histologisch regulärer Ileum- bzw. Kolonschleimhaut gewonnen. Die Untersuchungen erfolgten zur Krebsvorsorge bzw. aufgrund unklarer abdomineller Schmerzen. Eine Entzündung des Darms oder eine systemische Entzündung wurde im Vorfeld ausgeschlossen. Die Benutzung der Gewebeproben wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (02-073; 03-43) und das Einverständnis der Patienten genehmigt.

Die Darmbiopsien wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Mithilfe eines Kryostaten (Modell Leitz 1720, Wetzlar) wurden aus den gefrorenen Gewebestücken 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgetragen und bei Raumtemperatur mithilfe eines Ventilators 2 Stunden getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert. Direkt vor der Markierung erfolgte eine Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger in einem Gemisch aus Methanol und Aceton (Verhältnis 1:1) für 10 Minuten bei -20°C. Anschließend wurden die Schnitte weitere 5 Minuten in PBS

gespült und dann sofort markiert. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden zunächst die Primärantikörper (α -CD4 und α -CXCR3) für 10 Minuten separat voneinander mit fluoreszenzmarkierten Fab-Fragmenten (Zenon α -Maus AlexaFluor488 und Zenon α -Maus AlexaFluor647, Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert, bevor sie für eine Stunde auf die Gefrierschnitte gegeben wurden. Es folgten drei 5-minütige Waschschrte mit PBS und die Färbung der Zellkerne mit einem Hoechst-Farbstoff (Hoechst 33342, Sigma Aldrich, Bonn). Eine einem weiteren Waschzyklus mit PBS wurden die gefärbten Schnitte mit Mowiol (Polysciences, USA) eingedeckt. Die mikroskopische Analyse der Präparate erfolgte an einem Zeiss LSM 510 META Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen). Die quantitative Auswertung der Aufnahmen erfolgte unter Verwendung der Bildanalysesoftware ImageJ v1.47. Dafür wurde in den Aufnahmen der Anteil gelber Pixel ($CD4^+CXCR3^+$) an der Gesamtzahl aller blauen Pixel (Zellkerne) bestimmt und als relative CD4/CXCR3-Expression dargestellt.

Die Analysen der humanen Darmbiopsien erfolgten in Kooperation mit PD Dr. Jürgen Büning (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck).

2.9 Statistik

Für die Berechnung statistischer Signifikanzen wurde wie in den Abbildungen angegeben der Student's *t*-Test oder eine *one-way* ANOVA Analyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die Berechnungen dafür erfolgten mit der Software Prism5 (GraphPad, LaJolla, USA). Die errechneten p-Werte wurden dafür folgendermaßen dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Antikörper-Antigen-Konjugaten

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Antigen-Targeting* über den von DCs exprimierten Oberflächenrezeptor DEC-205 zur effizienten Aufnahme eines Zielantigens und dessen Präsentation führt (Kretschmer *et al.*, 2005; Mahnke *et al.*, 2000). Für diese Methode werden Antikörper-Antigen-Konjugate bestehend aus einem α -DEC-205 Antikörper und einem entsprechenden Zielantigen benötigt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* gezielt Toleranz in Entzündungsmodellen des Darms und der Lunge induziert werden kann. Dazu wurden zunächst Konjugate aus einem monoklonalen α -DEC-205 Antikörper und einem immunogenen Epitop des Influenza Hemagglutinin unter der Verwendung des chemischen *cross-linkers* Sulfo-SMCC hergestellt (Abb. 3-1 A). Um die erfolgreiche Kopplung beider Komponenten nachzuweisen, wurde das so entstandene DEC-HA Konjugat über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot unter Verwendung eines α -HA Antikörpers nachgewiesen. Als Kontrolle wurde in dieser Arbeit ein Kontrollkonjugat (ISO-HA) eingesetzt, das durch die Kopplung eines Isotypkontrollantikörpers (α -ISO) und dem HA-Peptid hergestellt wurde.

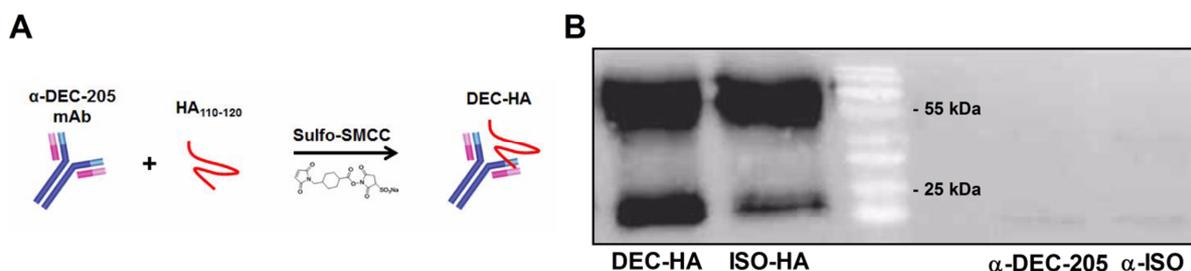


Abbildung 3-1. Nachweis der erfolgreichen Kopplung der Antikörper-Antigen-Konjugate. A) Schematische Darstellung der Komponenten für die Herstellung des DEC-HA Konjugates. B) Je 250 ng DEC-HA und ISO-HA bzw. die gleiche Menge der unkonjugierten monoklonalen Antikörper (α -DEC-205 bzw. α -ISO) wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und anschließend im Western Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper (CMI1.2) die Kopplung des Peptids an die jeweiligen Antikörper detektiert. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt.

Wie in Abbildung 3-1 B dargestellt, war die Kopplung der Antikörper-Peptid-Konjugate erfolgreich. Sowohl für DEC-HA als auch für ISO-HA waren im Western Blot je zwei Banden auf Höhe von ca. 25 kDa und 55 kDa detektierbar, was die

Bindung des HA-Peptids an die Antikörper widerspiegelt, die sich durch Denaturierung im SDS-Gel jeweils in die leichte (~ 25 kDa) und schwere (~ 55 kDa) Kette des Antikörpers aufgetrennt haben. Im Gegensatz dazu waren für die unkonjugierten Antikörper (α -DEC-205 und α -ISO) keine HA-spezifischen Banden detektierbar.

3.2 Funktionalität der Antikörper-Antigen-Konjugate

In den nächsten Schritten wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet, ob das DEC-HA Konjugat auch funktionell zur effizienten Antigenaufnahme und -präsentation durch DCs führt. Dazu wurden naive BALB/c Mäuse mit 0,1-10 μ g DEC-HA bzw. 10 μ g ISO-HA i.p. behandelt. Anschließend wurden aus den Milzen, den MLN und der Lamina Propria des Kolons dieser Mäuse CD11c⁺ DCs mittels magnetischer oder durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert. Die DCs wurden mit je $2,5 \times 10^5$ eFluor670 markierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert. An Tag 4 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellproliferation anhand der Abnahme der Fluoreszenzintensität im eFluor670-Kanal.

In weiteren Experimenten wurden RAG2^{-/-} Mäuse mit je 10 μ g DEC-HA oder ISO-HA behandelt. Anschließend erfolgte der adoptive Transfer eFluor670 markierter, HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in diese Mäuse. An Tag 7 nach Zelltransfer wurden Einzelzellsuspensionen aus den Milzen, den MLN und der Lamina Propria des Kolons hergestellt und durchflusszytometrisch die *in vivo* Proliferation der CD4⁺ T-Zellen analysiert.

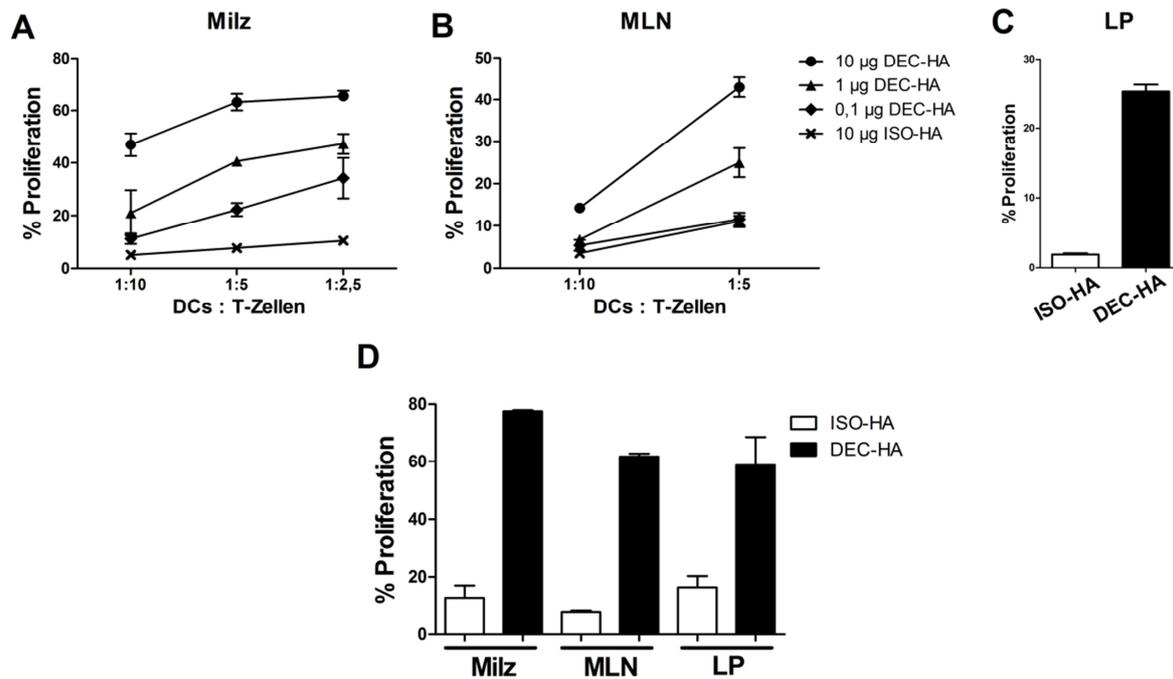


Abbildung 3-2. DEC-HA Antigen-Targeting führt zur Proliferation antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. A+B) Naive BALB/c Mäuse wurden an Tag -1 mit 0,1-10 µg DEC-HA bzw. 10 µg ISO-HA (n=2) i.p. behandelt. An Tag 0 wurden CD11c⁺ DCs aus der Milz und den MLN mittels MACS-Technologie isoliert und im angegebenen Verhältnis mit je 2,5 x 10⁵ eFluor670 markierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert. C) Naive BALB/c Mäuse wurden an Tag -1 mit 10 µg DEC-HA oder ISO-HA (n=2) i.p. behandelt. An Tag 0 wurden CD11c⁺ DCs durchflusszytometrisch aus der Lamina Propria des Kolons isoliert und im Verhältnis 1:10 mit eFluor670 markierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ko-kultiviert. An Tag 4 Tag erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation. D) RAG2^{-/-} Mäuse wurden an Tag -1 mit je 10 µg DEC-HA oder ISO-HA (n=3) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von eFluor670 markierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. An Tag 7 nach Transfer erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Proliferation aus Einzelzellsuspensionen von Milzen, MLN und der Lamina Propria (LP) der Kolons. Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of the mean*, SEM) sind dargestellt. Jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen ist gezeigt.

In Abbildung 3-2 A-C ist dargestellt, dass die Antigenbeladung von DCs mit DEC-HA zur Antigenpräsentation und in Folge dessen zur *in vitro* Aktivierung von HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen führte. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte nicht nur nach Ko-Kultur mit DCs aus lymphoiden Organen wie der Milz und den MLN, sondern auch mit DCs aus der Lamina Propria des Kolons. Auch *in vivo* transferierte HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden durch die DEC-HA Behandlung aktiviert. Die Proliferation der T-Zellen war dabei in allen untersuchten Organen gleich stark (Abb. 3-2 D).

3.3 Therapeutische Immunmodulation in der intestinalen Mukosa

3.3.1 Etablierung eines antigen-spezifischen Entzündungsmodells der Darmmukosa

Es existieren bereits verschiedene Mausmodelle für die Untersuchung von intestinalen Entzündungserkrankungen (Schoeb und Bullard, 2012). Für die spezifische Untersuchung von antigen-spezifischen T-Zell-Antworten in der intestinalen Mukosa sind allerdings nur wenige Modelle etabliert (Brandwein *et al.*, 1997; Kweon *et al.*, 2002). In einer Arbeit von Westendorf und Kollegen konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse, die das Modellantigen Hemagglutinin unter dem Enterozyten-spezifischen VILLIN-Promotor exprimieren, zu einer starken Entzündung des Dünndarms führt (Westendorf *et al.*, 2006). Interessanterweise führt der adoptive Transfer HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in VILLIN-HA Mäuse nicht zur Entzündungsreaktion im Darm (Westendorf *et al.*, 2009a). Allerdings wurde in dieser Arbeit die Gesamtpopulation HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen transferiert, die neben naiven CD4⁺ T-Zellen auch 10-15 % Foxp3⁺ Treg umfasst. Daher besteht die Möglichkeit, dass die enthaltenen Treg die Induktion einer Immunpathologie in VILLIN-HA transgenen Mäusen verhindern können. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen durchflusszytometrisch aus den Milzen von TCR-HA/Foxp3-GFP Mäusen isoliert und ein adoptiver Transfer von $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse und nicht transgene Geschwistertiere durchgeführt (Abb. 3-3).

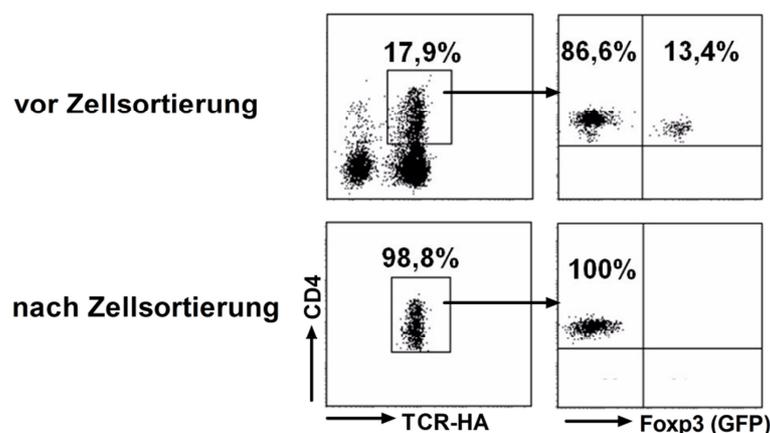


Abbildung 3-3. Zellsortierung HA-spezifischer CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen. HA-spezifische (TCR-HA) CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus den Milzen von TCR-HA/Foxp3-GFP Mäusen wurden durchflusszytometrisch isoliert. Exemplarisch sind *Dot Plots* einer repräsentativen Zellsortierung dargestellt.

Nach dem Zelltransfer wurden die Mäuse täglich auf Anzeichen für eine Erkrankung kontrolliert, indem das Gewicht bestimmt und die Mobilität der Tiere sowie der Stuhl überprüft wurden.

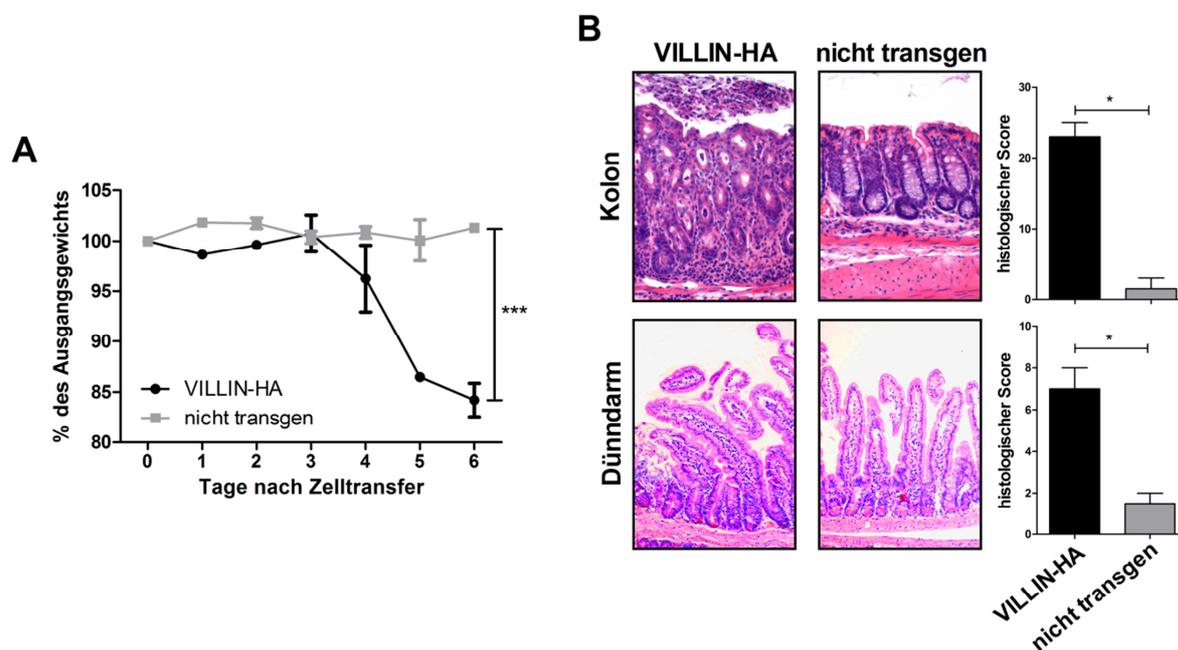


Abbildung 3-4. Der adoptive Transfer HA-spezifischer CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse führt zu einer starken Entzündung des Kolons. HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen wurden aus den Milzen von TCR-HA/Foxp3-GFP transgenen Mäusen durchflusszytometrisch sortiert und anschließend wurde der adoptive Transfer von $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgene (n=2) und nicht transgene Geschwistertiere (n=2) durchgeführt. A) Die Veränderung des Gewichts ist als Mittelwert \pm SEM in Prozent ausgehend vom Ausgangsgewicht angegeben. B) An Tag 6 wurden die Därme entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Exemplarisch ist je ein Ausschnitt pro Kolon und Dünndarm dargestellt. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Das Gewicht der nicht transgenen Kontrolltiere zeigte über den Versuchsverlauf von 6 Tagen keine Veränderungen. Im Gegensatz dazu verloren VILLIN-HA transgene Mäuse ab Tag 4 nach Transfer kontinuierlich Gewicht und hatten an Tag 6 bis zu 15 % ihres Ausgangsgewichtes verloren (Abb. 3-4 A). Die histologische Analyse der Därme zeigte eine starke Pathologie mit Lymphozyten- und Granulozyteninfiltraten sowie mittel bis stark ausgeprägte Abszesse der Krypten im Kolon der VILLIN-HA transgenen Mäuse (Abb. 3-4 B). Die Pathologie war im Dünndarm der VILLIN-HA transgenen Mäuse deutlich schwächer ausgeprägt als im Kolon. Die Därme der nicht transgenen Kontrolltiere waren ohne besonderen Befund. Um die Entzündung in den VILLIN-HA Mäusen detaillierter zu charakterisieren, wurden Biopsien aus dem Kolon

und Dünndarm der jeweiligen Tiere entnommen, RNA isoliert und die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert.

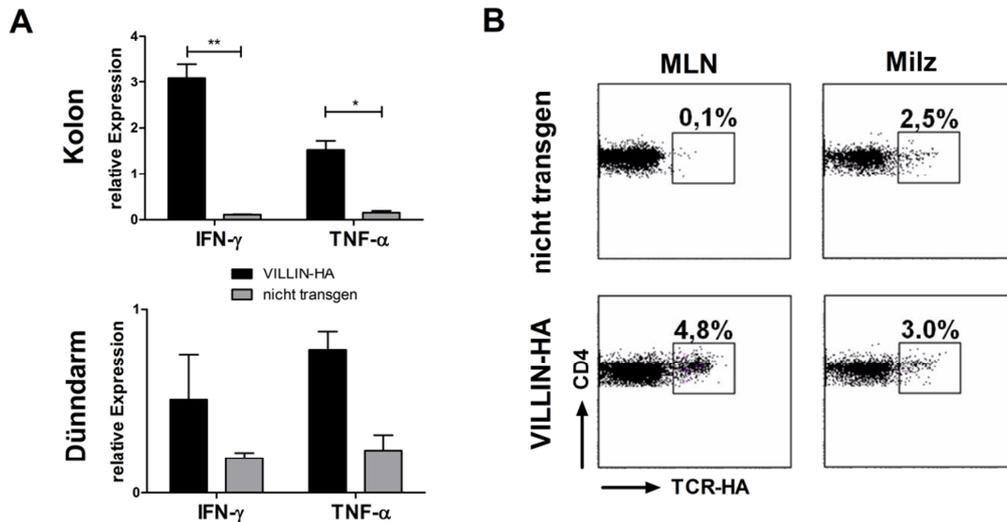


Abbildung 3-5. Charakterisierung der Darmentzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen. HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen wurden wie in Abbildung 3-4 beschrieben isoliert und adoptiv in VILLIN-HA Mäuse (n=2) oder nicht transgene Geschwistertiere (n=2) transferiert. A) 6 Tage nach Transfer wurde aus Kolon- und Dünndarmbiopsien RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ und TNF- α analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). B) Aus der Milz und den MLN wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und durchflusszytometrisch der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) bestimmt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der TCR-HA-positiven Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation. Exemplarisch sind *Dot Plots* für je eine VILLIN-HA und eine nicht transgene Maus dargestellt.

Entsprechend der stark ausgeprägten Histopathologie im Darm der VILLIN-HA transgenen Mäuse konnte auch eine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α im Kolon der Tiere detektiert werden (Abb. 3-5 A). Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen in der Milz und MLN zeigte eine massive Expansion HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in den MLN der VILLIN-HA transgenen Mäusen, nicht aber in denen der nicht transgenen Geschwistertiere (Abb. 3-5 B).

Zusammengefasst ist es gelungen, durch den adoptiven Transfer naiver CD4⁺Foxp3⁺ HA-spezifischer T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse ein neues Entzündungsmodell zu etablieren. Dieses Entzündungsmodell ist charakterisiert durch einen hohen Gewichtsverlust, einer starken Histopathologie sowie der erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α im Kolon. Da die Pathologie im Dünndarm deutlich schwächer ausgeprägt war, wurde der Fokus in den weiteren Experimenten auf das Kolon gelegt.

3.3.2 DEC-HA Behandlung verhindert die Entzündungsinduktion im VILLIN-HA Kolitis Modell

Nach der Etablierung des neuen Entzündungsmodells sollte nun analysiert werden, ob die gezielte Antigenbeladung von DEC-205⁺ DCs zur Induktion von Toleranz führt und somit die intestinale Entzündung verhindert werden kann. Dazu wurden VILLIN-HA transgene Mäuse wie in Abbildung 3-6 A dargestellt behandelt. An Tag -2 und -1 vor dem adoptiven Zelltransfer wurde VILLIN-HA transgenen Tieren je 1 µg DEC-HA, ISO-HA oder PBS i.p. injiziert. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von je $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen pro Maus. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet und anschließend analysiert.

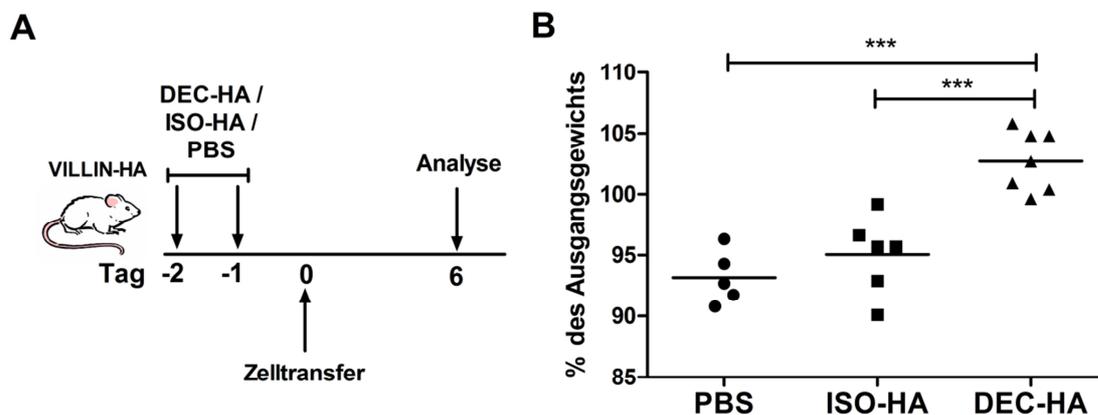


Abbildung 3-6. DEC-HA Behandlung schützt VILLIN-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme. A) VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA, ISO-HA oder PBS i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen pro Maus. B) Das Gewicht der Tiere wurde täglich bestimmt. Dargestellt ist das prozentuale Körpergewicht an Tag 6 nach Transfer ausgehend vom Ausgangsgewicht. Jeder Datenpunkt steht für eine individuelle Maus. Die Daten sind aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die statistische Analyse wurde mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt (***) $p < 0,001$.

In Abbildung 3-6 B ist dargestellt, dass die Behandlung der Tiere mit ISO-HA oder PBS keinen Einfluss auf die Gewichtsabnahme hat. Bis Tag 6 nach Transfer HA-spezifischer CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse kam es zu einem Gewichtsverlust von 5-10 %. Im Gegensatz dazu zeigten die DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäuse über den gleichen Zeitraum ein konstantes Gewicht, das an Tag 6 signifikant höher war als das der Kontrolltiere.

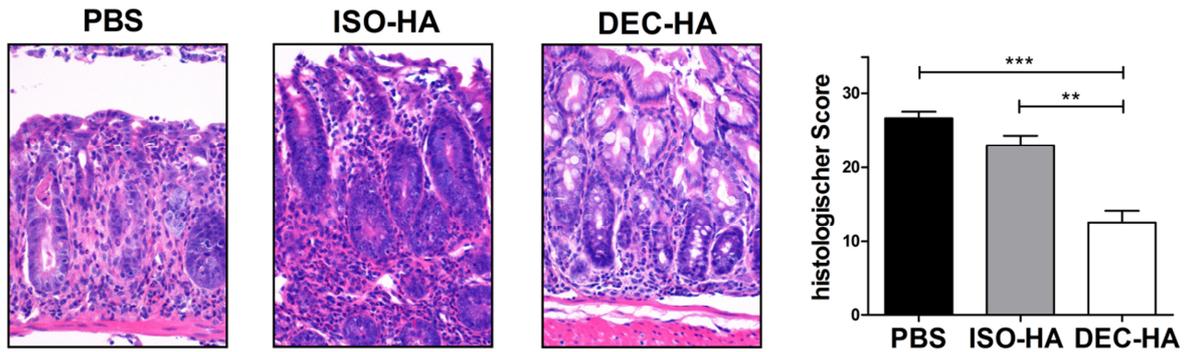


Abbildung 3-7. DEC-HA Behandlung führt zu einer geringeren Histopathologie im Kolon. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA (n=5), ISO-HA (n=4) oder PBS (n=3) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen pro Maus. An Tag 6 wurden die Därme entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die histopathologische Untersuchung zeigte in den ISO-HA und PBS behandelten Kontrollgruppen mittel- bis hochgradige Infiltrationen der Lamina Propria mit Leukozyten sowie teilweise mehrschichtiges Epithel. Zusätzlich waren Kryptabszesse zu sehen, die in der PBS Kontrolle teilweise zum kompletten Verlust von Krypten führten (Abb. 3-7). Im Gegensatz dazu konnte in den DEC-HA behandelten Tieren nur eine sehr schwache Infiltration von Immunzellen im Kolon detektiert werden. Das Epithel war normal ausgebildet und nur wenige Kryptabszesse waren nachweisbar. Zusammengefasst führt die DEC-HA Behandlung zu einer signifikant geringeren Pathologie im Kolon.

Um den Schweregrad der Entzündung genauer zu definieren wurde die $IFN-\gamma$ - und $TNF-\alpha$ -Expression in Kolonbiopsien mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt.

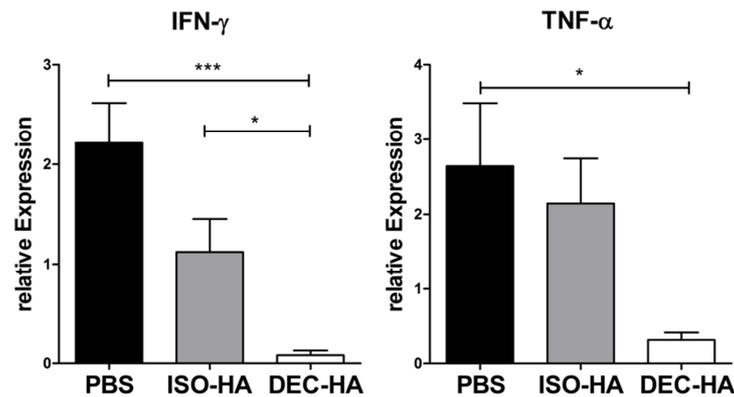


Abbildung 3-8. Die Expression von IFN- γ und TNF- α in Kolonbiopsien ist nach DEC-HA Behandlung reduziert. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μg DEC-HA (n=7), ISO-HA (n=6) oder PBS (n=5) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen pro Maus. 6 Tage nach Zelltransfer wurde aus Kolonbiopsien der Mäuse RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ und TNF- α analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt (* p<0,05; *** p<0,001).

Analog zu der Immunpathologie war auch die IFN- γ - und TNF- α -Expression im Darm der DEC-HA behandelten Gruppe im Vergleich zur ISO-HA und PBS Kontrolle signifikant um den Faktor 15-25 reduziert (Abb. 3-8).

In früheren Studien konnte in entzündlichen Erkrankungen in Mäusen gezeigt werden, dass die Toleranz von CD4⁺ T-Zellen durch das *Antigen-Targeting* über DEC-205 insbesondere durch die Induktion und / oder Expansion von Foxp3⁺ Treg Zellen vermittelt wird. So waren Mäuse durch diesen Ansatz in einem Model des Autoimmundiabetes (Bruder und Westendorf *et al.*, 2005) sowie in einem Mausmodell für Multiple Sklerose (Stern *et al.*, 2010) durch die Treg-Induktion geschützt. Um zu überprüfen, ob im hier untersuchten Kolutismmodell ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt, wurde der Phänotyp der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen 6 Tage nach adoptivem Transfer in VILLIN-HA transgene Mäuse durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden in Zellen aus der Lamina Propria, den MLN und der Milz die Expression von Foxp3 analysiert.

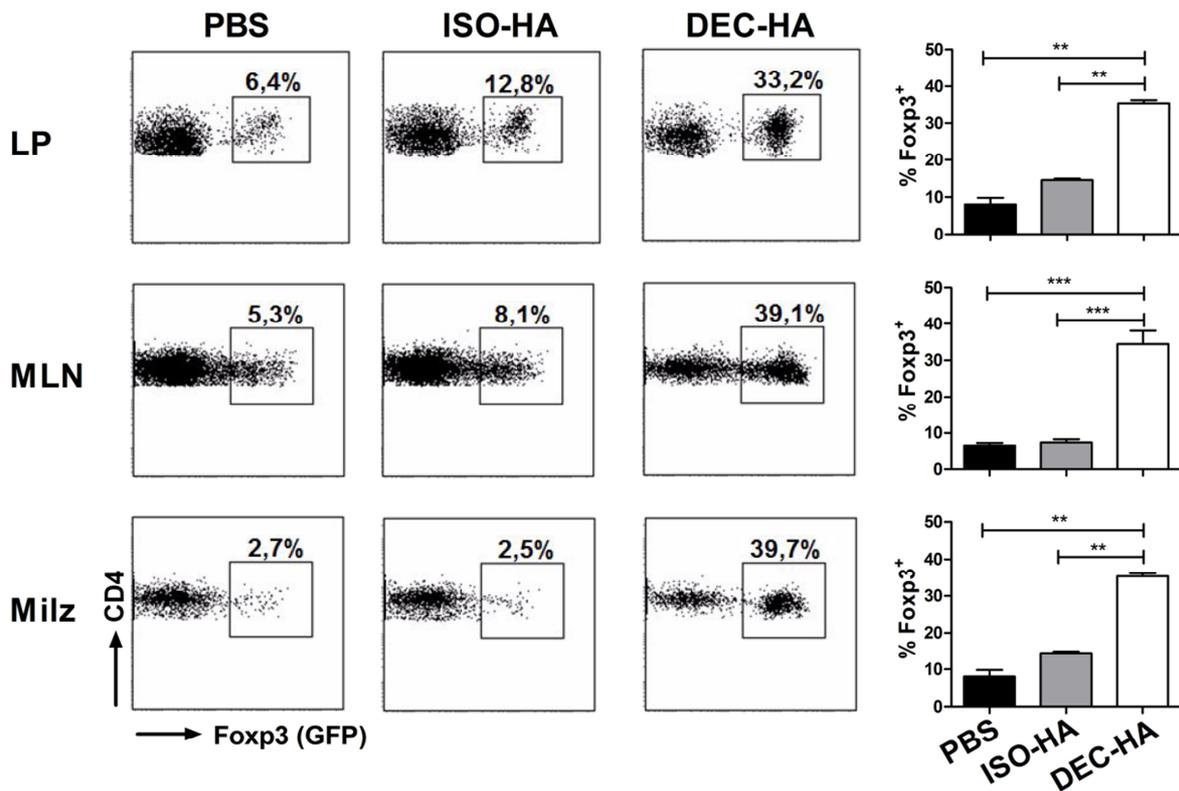


Abbildung 3-9. DEC-HA Behandlung führt zur Induktion von Foxp3⁺ Treg. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA (n=7), ISO-HA (n=6) oder PBS (n=5) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von $2,75 \times 10^6$ HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen pro Maus. An Tag 6 nach Transfer wurden Einzelzellsuspensionen der Milzen, der MLN und der Lamina Propria des Kolons (LP) dieser Mäuse hergestellt und die Foxp3 (GFP) Expression der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Foxp3⁺ T-Zellen aller HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Exemplarisch ist je ein Organ aus jeder Mausgruppe gezeigt. In den Säulendiagrammen ist die Zusammenfassung aller Daten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (** p<0,01; *** p<0,001).

Interessanterweise waren nach Zelltransfer in den drei analysierten Organen aller Mausgruppen HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen nachweisbar. In der ISO-HA und PBS behandelten Kontrollgruppe wurde Foxp3 in bis zu 13 % der transferierten HA-spezifischen T-Zellen, abhängig vom Organ, induziert (Abb. 3-9). Allerdings war der Anteil HA-spezifischer CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen nach DEC-HA Behandlung mit bis zu 40 % signifikant höher als in den Kontrollgruppen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* in dem vorliegenden Kolitismodell durch die *de novo* Induktion von Foxp3⁺ Treg zu einem signifikanten Schutz gegen eine Entzündungsreaktion im Darm führt.

3.3.3 Etablierung eines antigen-spezifischen T_H1-Zell vermittelten Entzündungsmodells der Darmmukosa

Das Immunsystem des Gastrointestinaltraktes muss aufgrund seiner anatomischen Lage kontinuierlich zwischen Immunität und Toleranz gegenüber unzähligen Einflüssen aus der Umwelt (z.B. aus der Nahrung) und kommensalen Darmbakterien entscheiden. Daher liegt im Darm ein permanenter, leichter Entzündungsprozess vor, der auch als „physiologische Entzündung“ bezeichnet wird (Fiocchi, 1997). Kommt diese physiologische Entzündung aus dem Gleichgewicht, kann es zur Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kommen. Maßgeblichen Anteil an der Entstehung und Aufrechterhaltung von CED haben dabei T_H1-Zellen (Fuss *et al.*, 1996b; Matsuoka *et al.*, 2004; Neurath *et al.*, 2002a). Das Ziel einer spezifischen Toleranzinduktion im Darm muss also sein, neben der Modulation naiver CD4⁺ T-Zellen besonders die Aktivität von T_H1-Effektorzellen zu unterdrücken. Daher wurde untersucht, ob das *Antigen-Targeting* über den DEC-205 Rezeptor auch zur Toleranz gegenüber T_H1-Zellen führen kann.

Für diese Untersuchungen wurde das VILLIN-HA Entzündungsmodell erweitert. HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden aus den Milzen von TCR-HA transgenen Mäusen durchflusszytometrisch sortiert (Abb. 3-10 A) und *in vitro* mit α -CD3/ α -CD28 in Anwesenheit von rekombinantem IL-12 stimuliert, um eine T_H1-Differenzierung der Zellen zu erzielen. Die erfolgreiche Differenzierung der Zellen wurde mittels IFN- γ Färbung durchflusszytometrisch gezeigt (Abb. 3-10 B).

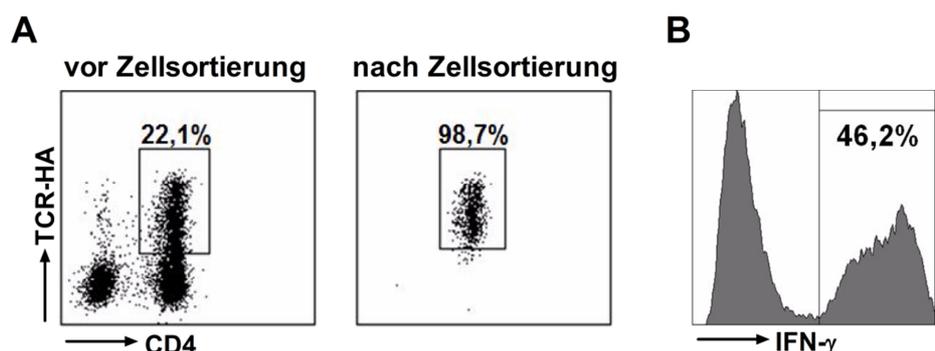


Abbildung 3-10. *In vitro* Differenzierung von HA-spezifischen T_H1-Zellen. HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden aus den Milzen von TCR-HA transgenen Mäusen durchflusszytometrisch isoliert. A) Dargestellt ist die Reinheit der Zellen vor und nach der Sortierung als exemplarischer *Dot Plot*. B) HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden *in vitro* mit α -CD3/ α -CD28 Antikörpern in Anwesenheit von rekombinantem IL-12 und einem α -IL4 Antikörper stimuliert. An Tag 6 der Zellkultur wurden die Zellen nach vierstündiger Stimulation mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A intrazellulär für IFN- γ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Ein exemplarischer *Dot Plot* der IFN- γ Expression ist dargestellt.

An Tag 6 der Zellkultur produzierten 40-60 % der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen IFN- γ . Um das Potential dieser Zellen für die Induktion einer intestinalen Entzündung zu testen, wurden je 3×10^6 Zellen adoptiv in VILLIN-HA transgene Mäuse bzw. nicht transgene Geschwistertiere transferiert. Die Mäuse wurden täglich auf Anzeichen für eine Erkrankung kontrolliert, indem das Gewicht bestimmt und die Mobilität der Tiere sowie der Stuhl überprüft wurden. Der Gewichtsverlauf über fünf Tage nach Zelltransfer ist in Abbildung 3-11 A zusammengefasst.

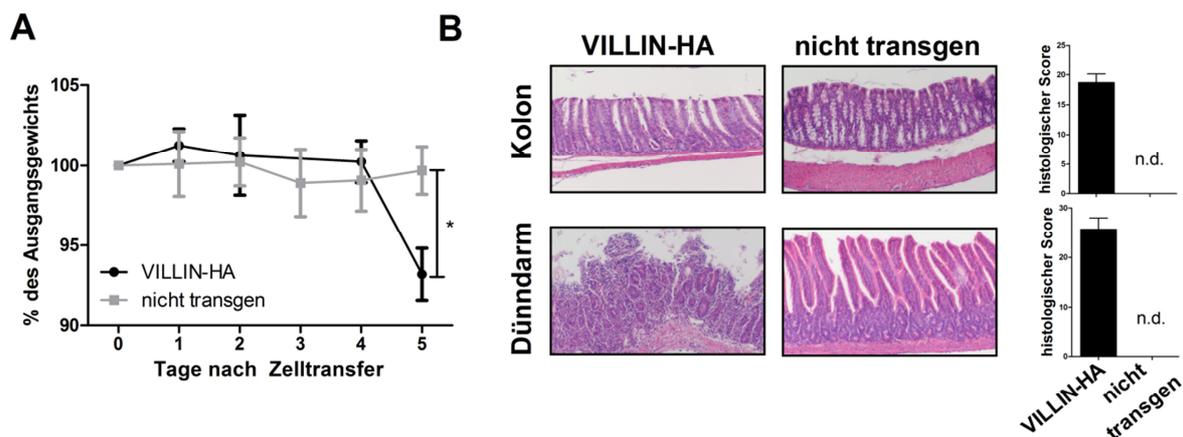


Abbildung 3-11. Der adoptive Transfer von HA-spezifischen T_{H1}-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse führt zur Entzündung des Dünndarms und des Kolons. 3×10^6 HA-spezifische T_{H1}-Zellen wurden adoptiv in VILLIN-HA transgene Mäuse (n=3) oder nicht transgene Geschwistertiere (n=3) transferiert. A) Die Veränderung des Gewichtes ist als Mittelwert \pm SEM in Prozent ausgehend vom Ausgangsgewicht dargestellt. B) An Tag 5 wurden die Därme entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Exemplarisch ist je ein Ausschnitt pro Kolon und Dünndarm dargestellt. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (* $p < 0,05$, n.d. = keine Histopathologie detektierbar).

Die nicht-transgenen Kontrolltiere zeigten keine Gewichtsveränderungen sowie keine histopathologischen Veränderungen nach T_{H1}-Zelltransfer. Im Gegensatz dazu verloren VILLIN-HA transgene Tiere bis Tag 5 bis zu 10 % ihres Ausgangsgewichtes und zeigten eine stark eingeschränkte Mobilität sowie blutigen Stuhl. Die histopathologische Analyse der Därme zeigte eine verstärkte Infiltration des Kolons und des Dünndarms mit Immunzellen (Abb. 3-11 B). Zusätzlich waren im gesamten Darm multifokale, mittel- bis hochgradige Kryptabszesse sowie teilweise Epithelzellhyperplasien zu sehen. Insgesamt war die Pathologie im Kolon und Dünndarm ähnlich stark ausgeprägt.

Auch in diesem Modell erfolgte die nähere Charakterisierung der Entzündungsreaktion im Darm. Hierzu wurde RNA aus Biopsien des Kolons und des Dünndarms der entsprechenden Mäuse isoliert und die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren analysiert.

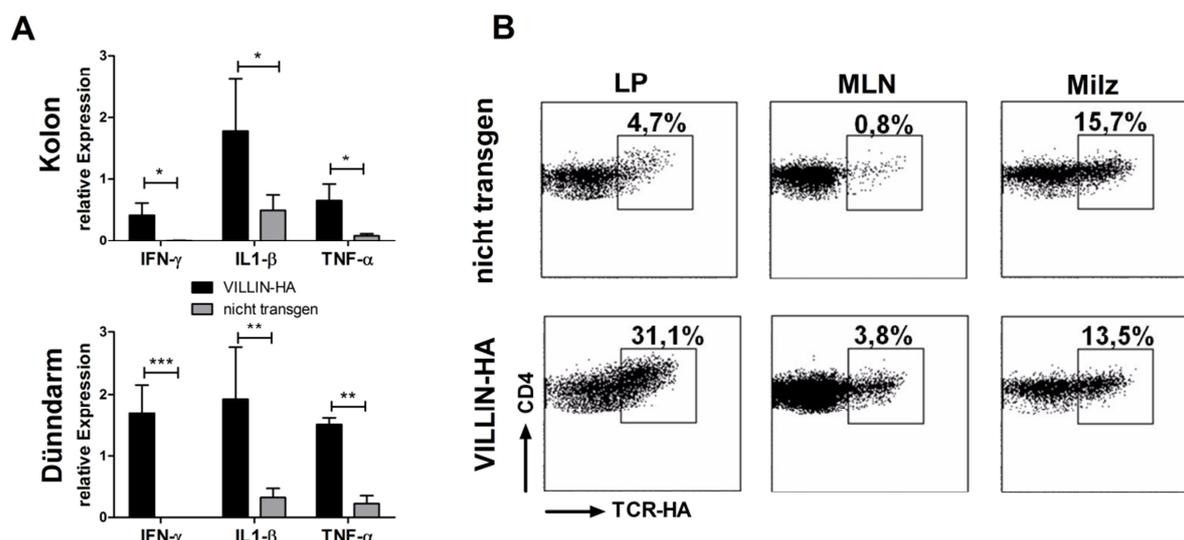


Abbildung 3-12. Charakterisierung der Darmentzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen nach T_H1 -Zelltransfer. 3×10^6 HA-spezifische T_H1 -Zellen wurden adoptiv in VILLIN-HA transgene Mäuse ($n=3$) oder nicht transgene Geschwistertiere ($n=3$) transferiert. A) An Tag 5 nach Transfer wurde aus Kolon- und Dünndarmbiopsien RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ , IL1- β und TNF- α bestimmt. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t -Test (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). B) Aus der Lamina Propria des Kolons (LP), den MLN und der Milz wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und der Anteil HA-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen (TCR-HA) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der TCR-HA-positiven Zellen an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation. Exemplarisch sind *Dot Plots* für je eine VILLIN-HA und eine nicht transgene Maus dargestellt.

Analog zur stark ausgeprägten Pathologie im Darm der VILLIN-HA Mäuse war auch die IFN- γ -, IL1- β - und TNF- α -Expression im Kolon und im Dünndarm nach T_H1 -Zelltransfer im Vergleich zu den nicht transgenen Geschwistertieren signifikant erhöht (Abb. 3-12 A). Dieser Entzündungsprozess korrelierte mit einer starken Infiltration und Expansion der transferierten HA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen im Darm der Mäuse, wie in der durchflusszytometrischen Analyse der Milzen, der MLN und der Lamina Propria des Kolons nach Zelltransfer dargestellt ist (Abb. 3-12 B). Durch den adoptiven Transfer von IFN- γ -produzierenden, HA-spezifischen T_H1 -Zellen in VILLIN-HA Mäuse ist es gelungen, ein T_H1 -Zell vermitteltes Mausmodell zu etablieren, das eine massive Entzündung sowohl des Kolons als auch des Dünndarms aufweist.

3.3.4 DEC-HA Behandlung hat einen protektiven Effekt im T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell

In Kapitel 3.3.2 ist gezeigt, dass die Applikation von DEC-HA im VILLIN-HA Entzündungsmodell zur Konversion von naiven CD4⁺ T-Zellen in CD4⁺Foxp3⁺ Treg und damit zum Schutz führt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss die DEC-HA Behandlung auf die Funktion und den Phänotyp von HA-spezifischen T_H1-Zellen hat. Dazu wurden VILLIN-HA transgene Mäuse mit DEC-HA, ISO-HA oder PBS behandelt und anschließend der adoptive Transfer von HA-spezifischen T_H1-Zellen durchgeführt (Abb. 3-13 A). Die Bewertung des Schweregrades der Entzündung erfolgte in diesem Modell nach den gleichen Kriterien und Parametern wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

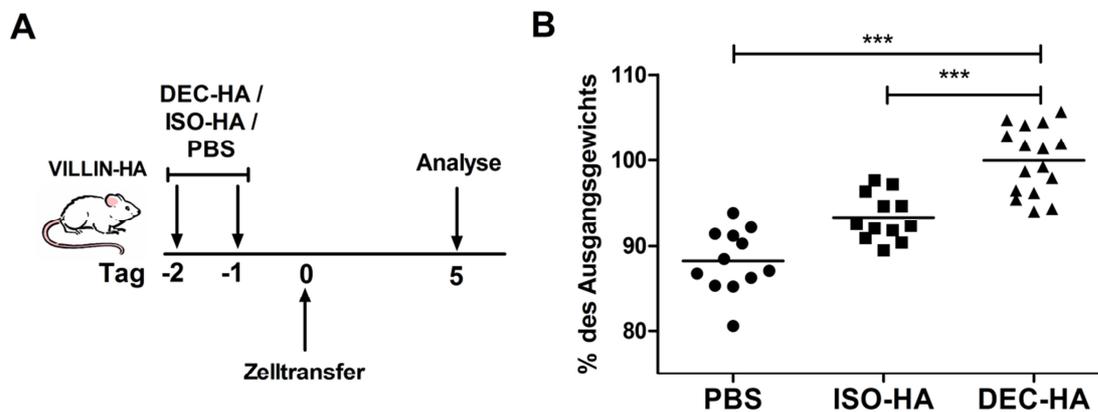


Abbildung 3-13. DEC-HA Behandlung schützt VILLIN-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme. A) VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA, ISO-HA oder PBS i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. B) Dargestellt ist die Veränderung des Körpergewichts an Tag 5 nach Transfer ausgehend vom Ausgangsgewicht. Jeder Datenpunkt steht für eine individuelle Maus. Zusammengefasste Daten aus vier unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt (***) $p < 0,001$.

Ein erstes Indiz dafür, dass die DEC-HA Behandlung auch in diesem Mausmodell einen protektiven Effekt aufweist, war die Entwicklung des Körpergewichts der verschiedenen Mausgruppen (Abb. 3-13 B) im Verlauf des Experimentes. Die ISO-HA und PBS behandelten Kontrollgruppen verloren bis Tag 5 nach Zelltransfer bis zu 15 % ihres Körpergewichtes, DEC-HA behandelte Mäuse dagegen wiesen durchschnittlich ein konstantes Körpergewicht auf. An Tag 5 nach adoptivem Transfer war das Endgewicht der DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höher. Im Folgenden wurden aus den

Kolons und Dünndärmen der Versuchstiere histologische Dünnschnitte angefertigt und die Schwere der Pathologie im Darm der einzelnen Mäuse bestimmt.

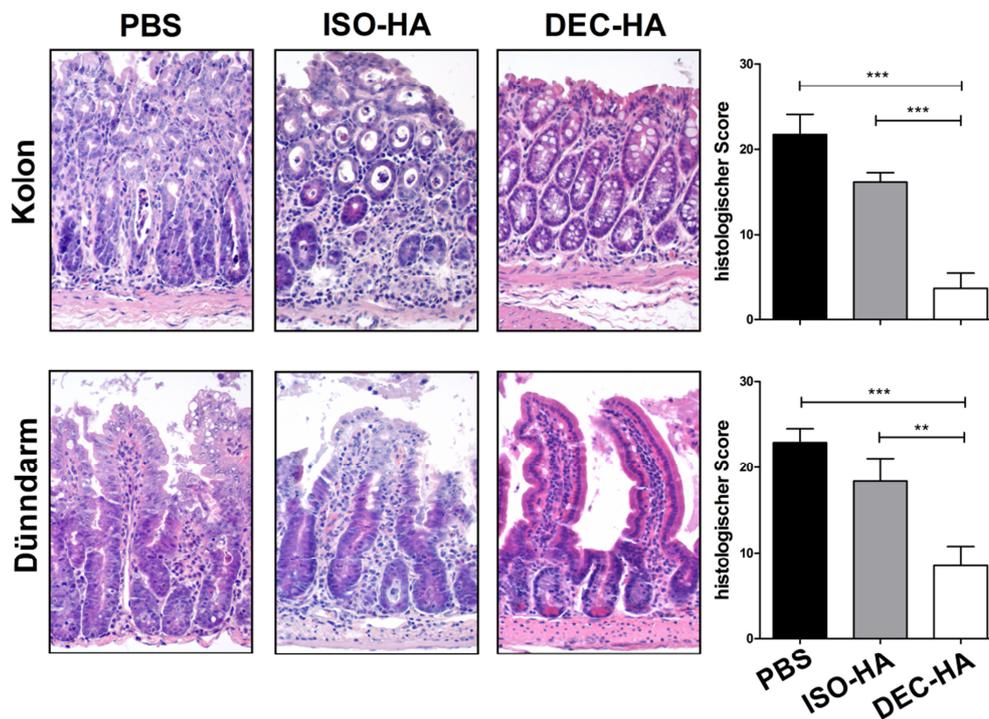


Abbildung 3-14. DEC-HA Behandlung führt zu geringerer Histopathologie im Dünndarm und Kolon. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1µg DEC-HA (n=9), ISO-HA (n=8) oder PBS (n=8) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. An Tag 5 nach Transfer wurden die Därme entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tatsächlich führte die Behandlung der VILLIN-HA transgenen Mäuse mit DEC-HA zu einer deutlich verbesserten Pathologie im Darm. Während im Darm der PBS und ISO-HA behandelten Versuchsgruppen eine sehr starke Entzündungsreaktion detektierbar war, die sich in histologischen Scores von durchschnittlich 17-22 sowohl im Kolon als auch im Dünndarm ausdrückte, war der Schweregrad der Entzündung nach DEC-HA Behandlung in beiden untersuchten Darmkompartimenten gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erniedrigt (Abb. 3-14).

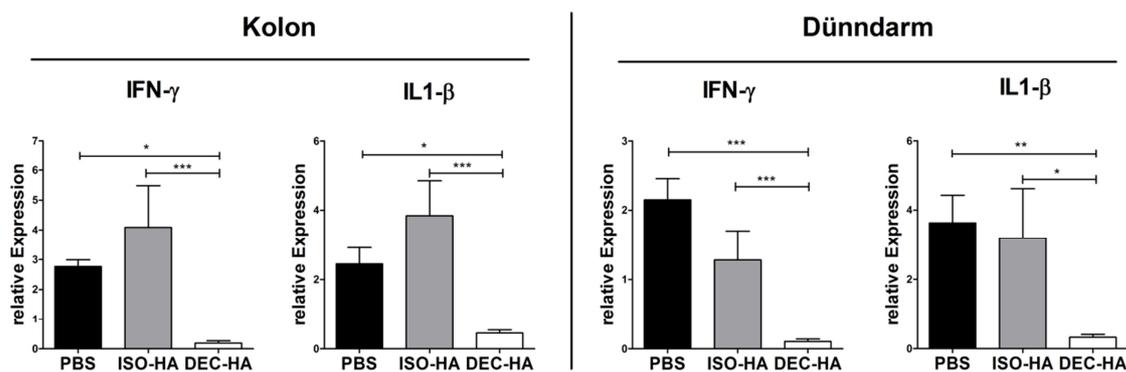


Abbildung 3-15. Die Expression von IFN- γ und IL1- β in Dünndarm- und Kolonbiopsien ist nach DEC-HA Behandlung reduziert. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μ g DEC-HA (n=9), ISO-HA (n=8) oder PBS (n=8) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. An Tag 5 nach Transfer wurde aus Dünndarm- und Kolonbiopsien der Mäuse RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ und IL1- β analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

In den erkrankten PBS und ISO-HA behandelten Kontrollgruppen war eine starke Expression der Zytokine IFN- γ und IL1- β im Kolon und Dünndarm der Mäuse detektierbar (Abb. 3-15). Im Gegensatz dazu lag in den Därmen der DEC-HA Gruppe die Expression beider Mediatoren nur minimal über der Detektionsgrenze der qPCR und damit signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das *Antigen-Targeting* über DEC-205 im T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell ebenfalls zu einem deutlichen Schutz der Mäuse führt, was sich in einem geringeren Gewichtsverlust und einer signifikant verbesserten Histopathologie im Darm widerspiegelt.

Um zu analysieren, ob die geringere Pathologie nach DEC-HA Behandlung in diesem Modell ebenfalls durch Induktion von Treg bzw. Konversion von T_H1-Zellen in Treg vermittelt wird, wurde als nächstes die Expression von Foxp3 in CD4⁺ T-Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen untersucht.

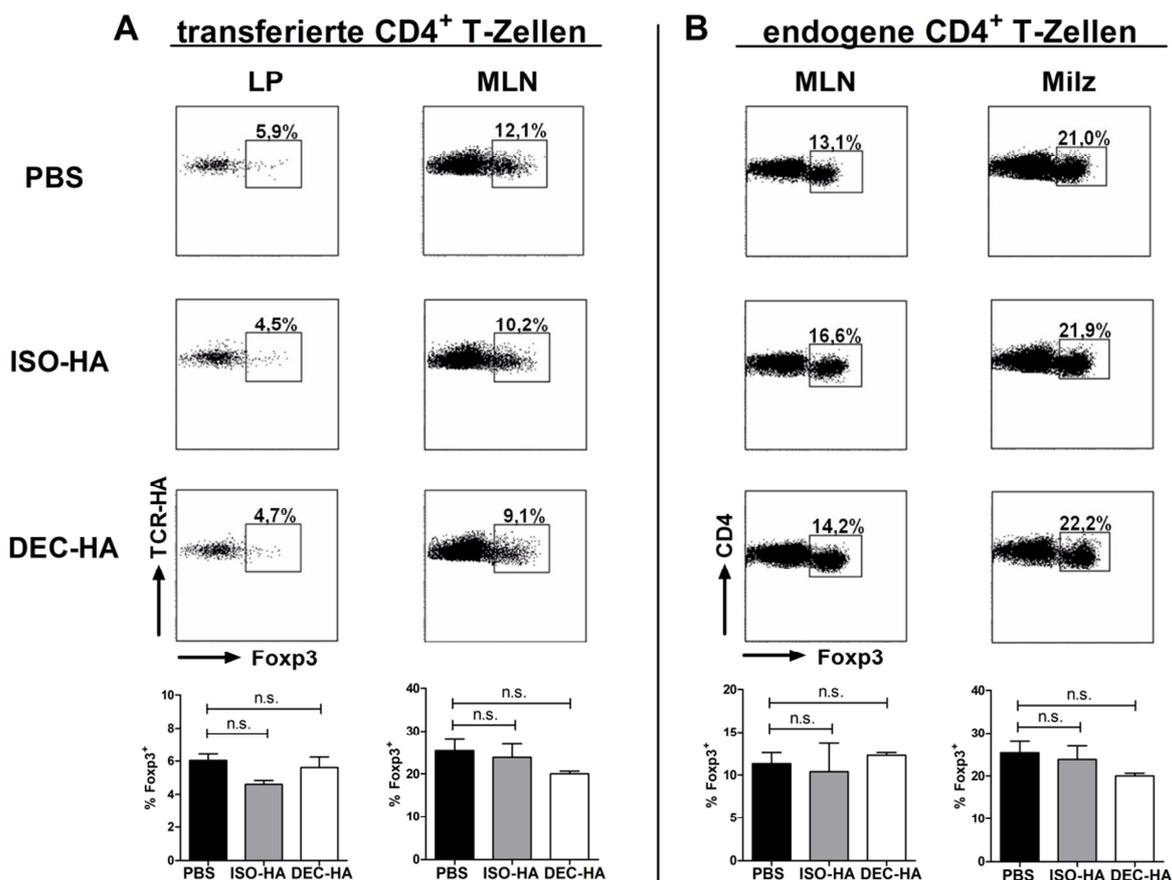


Abbildung 3-16. DEC-HA Behandlung führt nicht zur Konversion von T_H1-Zellen zu Fcpx3⁺ Treg. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA (n=3), ISO-HA (n=3) oder PBS (n=4) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3 × 10⁶ HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. An Tag 5 nach Transfer wurden Einzelzellsuspensionen der Milzen, der MLN und der Lamina Propria des Kolons (LP) dieser Mäuse hergestellt und die Fcpx3 Expression von CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. A) In allen transferierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) wurde die Fcpx3 Expression analysiert. B) In den endogenen CD4⁺ T-Zellen der VILLIN-HA Mäuse exklusive der transferierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde die Fcpx3 Expression analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Fcpx3⁺ T-Zellen an der jeweiligen CD4⁺ T-Zellpopulation. Exemplarisch ist je ein Organ aus jeder Mausgruppe gezeigt. In den Säulendiagrammen ist die Zusammenfassung der Daten aus einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (n.s. = nicht signifikant).

Die Untersuchung der Fcpx3 Expression der CD4⁺ T-Zellen im T_H1-Zell vermittelten Entzündungsmodell zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Dabei war es unabhängig davon, ob für die durchflusszytometrische Analyse nur die transferierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3-16 A) oder die endogenen CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3-16 B) der VILLIN-HA transgenen Mäuse einbezogen wurden. Die Behandlung mit DEC-HA führte daher im Fall der T_H1-Zell vermittelten Entzündung weder zur Induktion von Fcpx3⁺ Treg noch zu einer Konversion von IFN-γ⁺ T_H1-Zellen in Fcpx3⁺ Treg. Der

protektive Effekt der DEC-HA Behandlung in diesem Entzündungsmodell scheint also unabhängig von der Frequenz von Foxp3⁺ Treg zu sein.

Interessanterweise konnte aber beobachtet werden, dass der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen an der gesamt CD4⁺ Population nach Behandlung mit DEC-HA im Darm der VILLIN-HA transgenen Mäuse gegenüber den Kontrollgruppen signifikant reduziert war (Abb. 3-17).

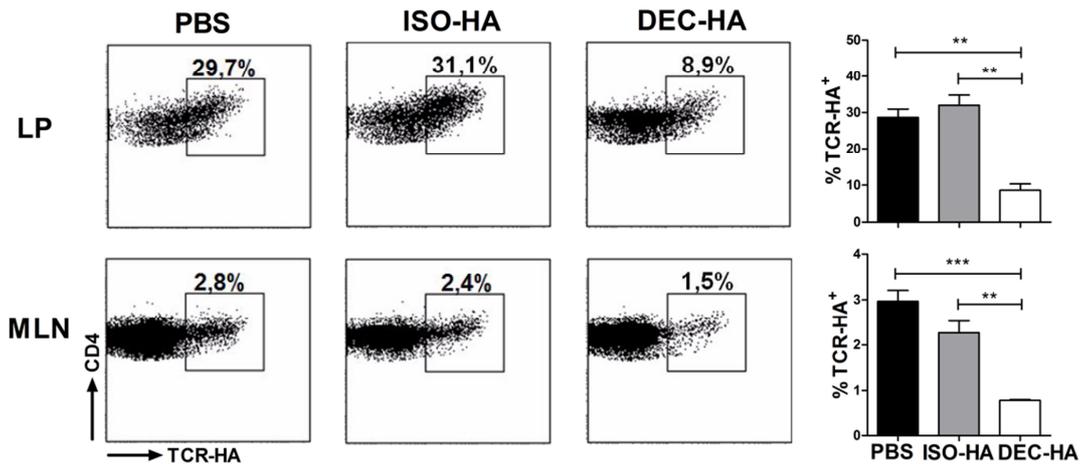


Abbildung 3-17. Der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Darm von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist nach DEC-HA Behandlung reduziert. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA (n=3), ISO-HA (n=3) oder PBS (n=3) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3 x 10⁶ HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. An Tag 5 nach Transfer wurden Einzelzellsuspensionen der MLN und der Lamina Propria des Kolons (LP) dieser Mäuse hergestellt und der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) durchflusszytometrisch bestimmt. Exemplarisch ist je ein Organ aus jeder Mausgruppe gezeigt. In den Säulendiagrammen ist die Zusammenfassung der Daten aus einem repräsentativen von zwei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (** p<0,01; *** p<0,001).

3.3.5 Die Behandlung mit DEC-HA führt zu einer verminderten Migration von antigen-spezifischen T_H1-Zellen in die Mukosa

Um den Phänotyp der transferierten, HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach DEC-HA Behandlung detaillierter zu untersuchen und so den Mechanismus zu identifizieren, durch den der Schutz im Darmentzündungsmodell vermittelt wird, wurden Agilent DNA Microarray Analysen durchgeführt. VILLIN-HA Mäuse wurden mit DEC-HA, ISO-HA oder PBS behandelt und anschließend HA-spezifische T_H1-Zellen adoptiv in die Mäuse transferiert. An Tag 5 nach dem Transfer wurden die HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus der Lamina Propria des Kolons dieser Mäuse durchflusszytometrisch re-isoliert und Microarray Analysen unterzogen.

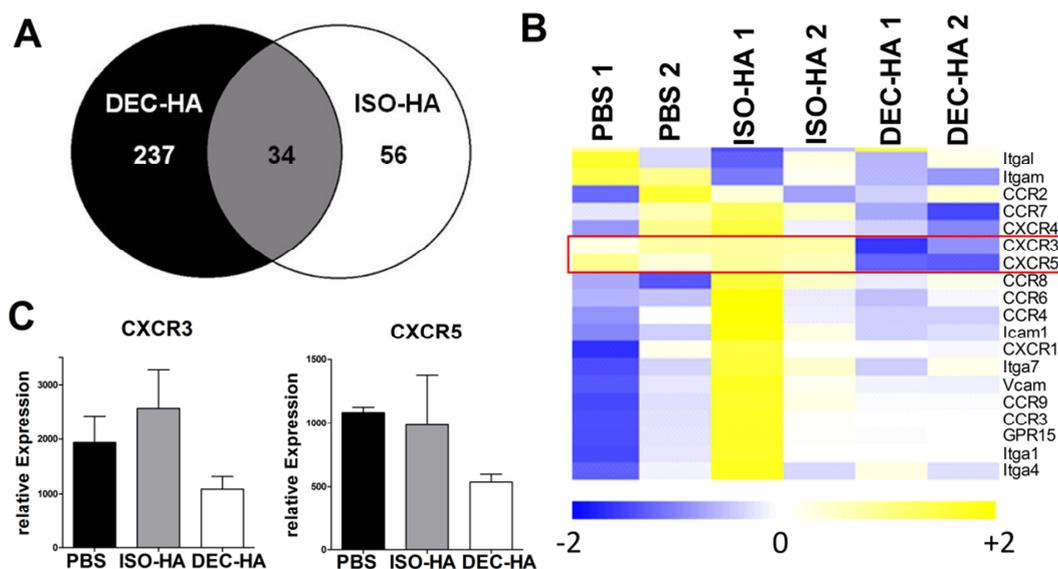


Abbildung 3-18. DNA Microarray Analyse von HA-spezifischen T_H1 -Zellen aus DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μg DEC-HA ($n=3$), ISO-HA ($n=3$) oder PBS ($n=2$) behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. An Tag 5 nach dem Transfer wurden die HA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen aus der Lamina Propria des Kolons dieser Mäuse durchflusszytometrisch re-isoliert. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen extrahiert und Transkriptomanalysen unter Verwendung von Agilent Maus 4x44k Microarrays durchgeführt. A) Die Anzahl der differentiell regulierten (Hoch- / Herunterregulation mind. um den Faktor 2) Gene in DEC-HA bzw. ISO-HA behandelten Zellen im Vergleich zur PBS behandelten Gruppe ist dargestellt. B) Eine Auswahl an Genen, die an der Zellmigration von Immunzellen beteiligt sind, ist als *Heatmap* dargestellt; blau: Herunterregulation um den Faktor 2, gelb: Hochregulation um den Faktor 2; C) Die Expression von CXCR3 und CXCR5 aus den Microarraydaten ist im Säulendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Behandlung mit DEC-HA bzw. ISO-HA führte im Vergleich zur PBS Behandlung in HA-spezifischen T_H1 -Zellen zur differentiellen Regulation von 237 bzw. 56 Genen (Abb. 3-18 A). Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, führt die DEC-HA Behandlung im Vergleich zu der PBS oder ISO-HA Behandlung zu einer reduzierten Frequenz HA-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen im Kolon von VILLIN-HA transgenen Mäusen (siehe Abb. 3-17). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die reduzierte Migration dieser Zellen in den Darm sein. Um diese Hypothese detaillierter zu untersuchen, wurden gezielt die Expressionsdaten verschiedener Gene untersucht, die wichtig für die Migration von Immunzellen zu Entzündungsherden sind. Eine Auswahl dieser Gene, inkl. der bekannten *gut-homing* Gene CCR9 und Itga4, ist in Abbildung 3-18 B dargestellt. Eine differentielle Regulation nach DEC-HA Behandlung konnte nur für die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR5 festgestellt werden, die im Vergleich zu den Kontrollgruppen ca. um den Faktor 2 herunterreguliert waren (Abb. 3-18 B, roter Kasten und Abb. 3-18 C). Um zunächst eine mögliche Funktion dieser Rezeptoren im vorliegenden Entzündungsmodell zu klären, wurde untersucht, ob die Liganden

dieser beiden Chemokinrezeptoren im T_H1 -Zell vermittelten Darmentzündungsmodell exprimiert werden. Dazu wurden HA-spezifische T_H1 -Zellen adoptiv in VILLIN-HA transgene Mäuse bzw. nicht transgene Geschwistertiere transferiert und anschließend die Expression von CXCL9 und CXCL10 (CXCR3 Liganden) sowie von CXCL13 (CXCR5 Ligand) im Kolon und Dünndarm dieser Mäuse mittels qPCR analysiert.

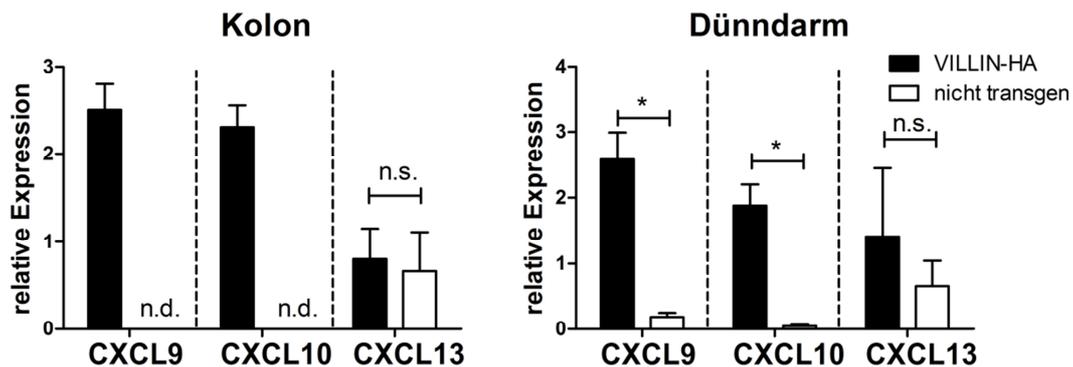


Abbildung 3-19. Die Expression von CXCL9 und CXCL10 im Dünndarm und Kolon von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist T_H1 -vermittelten Entzündungsmodell stark erhöht. VILLIN-HA transgenen Mäusen (n=5) oder nicht transgenen Geschwistertieren (n=3) wurden 3×10^6 HA-spezifische T_H1 -Zellen i.v. injiziert. 5 Tage nach Transfer wurde RNA aus Kolon- und Dünndarmbiopsien der Mäuse isoliert und anschließend mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von CXCL9, CXCL10 und CXCL13 analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (* $p < 0,05$; n.d. = nicht detektierbar; n.s. = nicht signifikant).

Die Expression des CXCR5 Liganden CXCL13 war im Entzündungszustand weder im Kolon noch im Dünndarm von VILLIN-HA transgenen Mäusen im Vergleich zu gesunden, nicht transgenen Kontrolltieren verändert (Abb. 3-19). Im Gegensatz dazu war die Expression der CXCR3 Liganden CXCL9 und CXCL10 im Kolon und Dünndarm der erkrankten VILLIN-HA transgenen Mäuse stark hochreguliert, während nur ein schwaches oder kein Signal in den Kontrolltieren detektierbar war. Die CXCR3-CXCL9/10-Achse spielt in diesem Mausmodell also möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entzündungsvermittlung.

Im nächsten Schritt wurden zunächst die Ergebnisse für die CXCR3 Expression aus den Genexpressionsanalysen verifiziert. Dazu wurden VILLIN-HA transgene Mäuse mit DEC-HA oder ISO-HA behandelt und anschließend der adoptive Transfer von HA-spezifischen T_H1 -Zellen durchgeführt. An Tag 5 nach dem Transfer wurden die

HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus der Lamina propria des Kolons durchflusszytometrisch re-isoliert und die CXCR3 Expression per qPCR bestimmt.

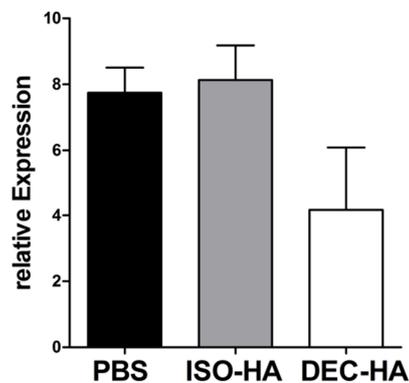


Abbildung 3-20. Die CXCR3 Expression ist in HA-spezifischen TH1-Zellen nach DEC-HA Behandlung reduziert. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA (n=3), ISO-HA (n=2) oder PBS (n=3) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 3×10^6 HA-spezifischen TH1-Zellen pro Maus. 5 Tage nach Transfer wurden die HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus der Lamina Propria des Kolons durchflusszytometrisch re-isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die CXCR3 Expression analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Die Daten für die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 aus den Genexpressionsanalysen konnten bestätigt werden und zeigen eine spezifische Herunterregulation in der DEC-HA Gruppe gegenüber der ISO-HA bzw. PBS Gruppe (Abb. 3-20).

Um zu analysieren, ob die reduzierte CXCR3 Expression auch funktionelle Konsequenzen hat und die Migration der TH1-Zellen beeinträchtigt, wurden *in vitro* Migrationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden naive BALB/c Mäuse mit DEC-HA, ISO-HA oder PBS behandelt und anschließend HA-spezifische TH1-Zellen in diese Mäuse transferiert. 7 Tage nach Zelltransfer wurden die HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus den Milzen der Mäuse durchflusszytometrisch re-isoliert und die Migration der Zellen *in vitro* mit rekombinantem CXCL10 als Chemokin untersucht (Abb. 3-21 A). Als Negativkontrolle wurden naive HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen eingesetzt, die kein CXCR3 exprimieren.

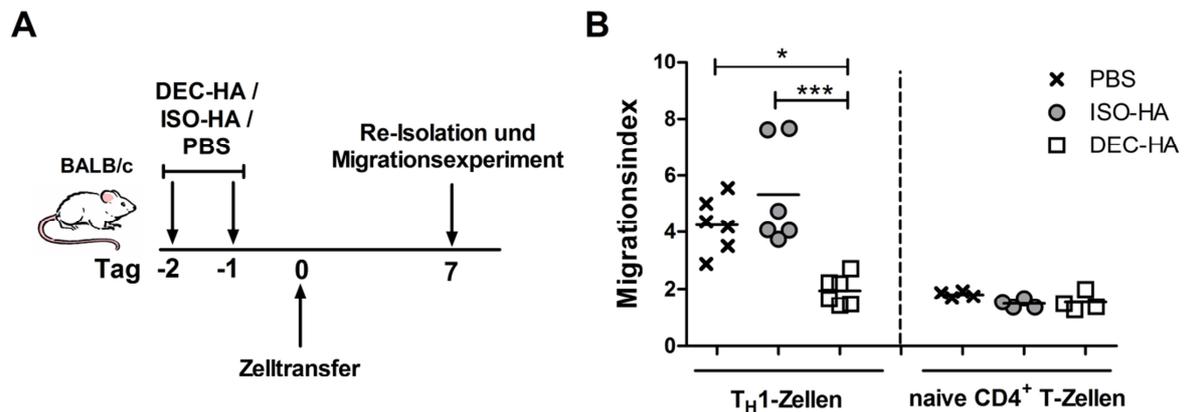


Abbildung 3-21. Die Migration HA-spezifischer T_H1 -Zellen ist nach DEC-HA Behandlung *in vitro* reduziert. A) VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μg DEC-HA, ISO-HA oder PBS i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 5×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. 7 Tage nach Transfer wurden HA-spezifische $CD4^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch aus den Milzen der Mäuse re-isoliert und in Migrationsexperimenten mit rekombinantem CXCL10 als Chemokin eingesetzt. B) Nach vierstündiger Inkubation wurde die Anzahl migrierter Zellen bestimmt. Angegeben ist der Migrationsindex der Zellen (siehe Kapitel 2.7.8). Jeder Datenpunkt entspricht einer individuellen Maus. Zusammengefasst sind die Daten aus drei (T_H1 -Zellen) bzw. zwei (naive $CD4^+$ T-Zellen) unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

T_H1 -Zellen, die aus ISO-HA und PBS behandelten Mäusen re-isoliert wurden, zeigten *in vitro* eine starke Migration als Reaktion auf rekombinantes CXCL10 (Abb. 3-21 B). Im Gegensatz dazu war die Migration der Zellen, die aus DEC-HA behandelten Mäusen isoliert wurden, nahezu vollständig aufgehoben. Die Migration war signifikant geringer als die der Kontrollgruppen und entsprach der Migration von naiven $CD4^+$ T-Zellen. Die DEC-HA vermittelte Herunterregulation von CXCR3 führt also auch funktionell zur Einschränkung der Migration von differenzierten T_H1 -Zellen in Richtung eines entsprechenden Chemokinliganden.

3.4 CXCR3-abhängige Migration von $CD4^+$ T-Zellen in den Darm

3.4.1 Differentielle Expression von CXCR3 im peripheren Blut und Darmbiopsien von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten

In den letzten Jahren wurden zunehmend sehr spezifisch wirkende Chemokinliganden / -rezeptorpaare identifiziert, die eine differenzierte Migration verschiedener Zellpopulationen in die intestinale Mukosa gewährleisten (Marsal und Agace, 2012). Zusätzlich ist ein Kennzeichen chronischer Entzündungsprozesse die verstärkte Einwanderung und Retention von Effektorzellen in Entzündungsherde

(Baumgart und Carding, 2007). Es wurde bereits gezeigt, dass die CXCL10 Expression in Patienten mit CED deutlich erhöht ist (Ostvik *et al.*, 2013). Der kausale Zusammenhang mit einer veränderten CXCR3 Expression auf Immunzellen bzw. CD4⁺ T-Zellen wurde bisher allerdings noch nicht untersucht bzw. gezeigt.

Daher wurde in Blutproben und Darmbiopsien von Morbus Crohn bzw. Kolitis ulcerosa Patienten mit aktivem Entzündungsschub der Anteil der CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen bestimmt. Interessanterweise war der Anteil der CXCR3⁺ T-Zellen an der gesamt CD4⁺ T-Zellpopulation im Blut von Morbus Crohn bzw. Kolitis ulcerosa Patienten gegenüber gesunden Probanden signifikant reduziert (Abb. 3-22), was auf eine vermehrte Migration während einer aktiven Entzündung dieser Zellen in die Mukosa hindeuten könnte.

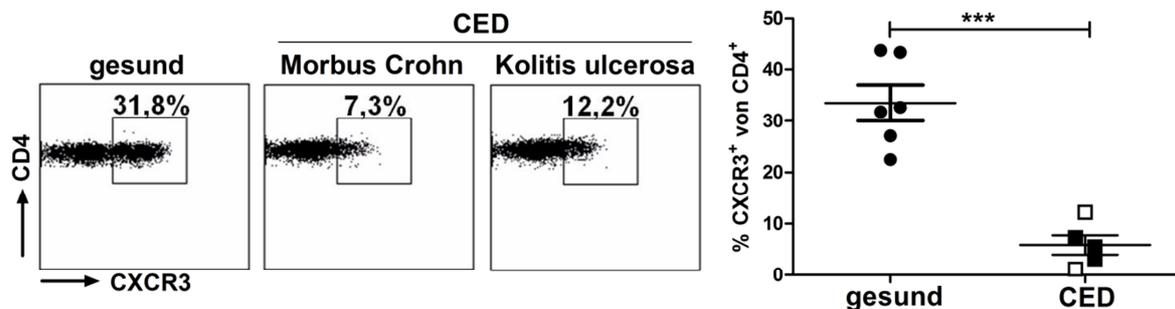


Abbildung 3-22. Der Anteil der CXCR3⁺ CD4⁺ T-Zellen im Blut von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten ist reduziert. Aus dem Blut von gesunden Probanden (n=6) sowie von Morbus Crohn (n=3) und Kolitis ulcerosa (n=2) Patienten mit aktivem Entzündungsschub wurden PBMCs isoliert und durchflusszytometrisch die CXCR3 Expression auf CD4⁺ T-Zellen analysiert. Exemplarisch sind *Dot Plots* für jede untersuchte Gruppe abgebildet. Im Punktdiagramm sind die Ergebnisse für alle untersuchten Personen dargestellt. Dabei sind die Daten der Morbus Crohn (■) und Kolitis ulcerosa (□) Patienten in der Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zusammengefasst. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (***) $p < 0,001$.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kolon- und Ileumbiopsien von gesunden Spendern ergab nur eine sehr geringe Anzahl CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen in der Mukosa. Im Gegensatz dazu konnte im Kolon von Kolitis ulcerosa Patienten sowie im Kolon und Ileum von Morbus Crohn Patienten eine drastische Akkumulation dieser Zellen beobachtet werden. Gegenüber nicht entzündeten Bereichen des Darms war der Anteil der CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen in entzündeten Arealen signifikant erhöht (Abb. 3-23).

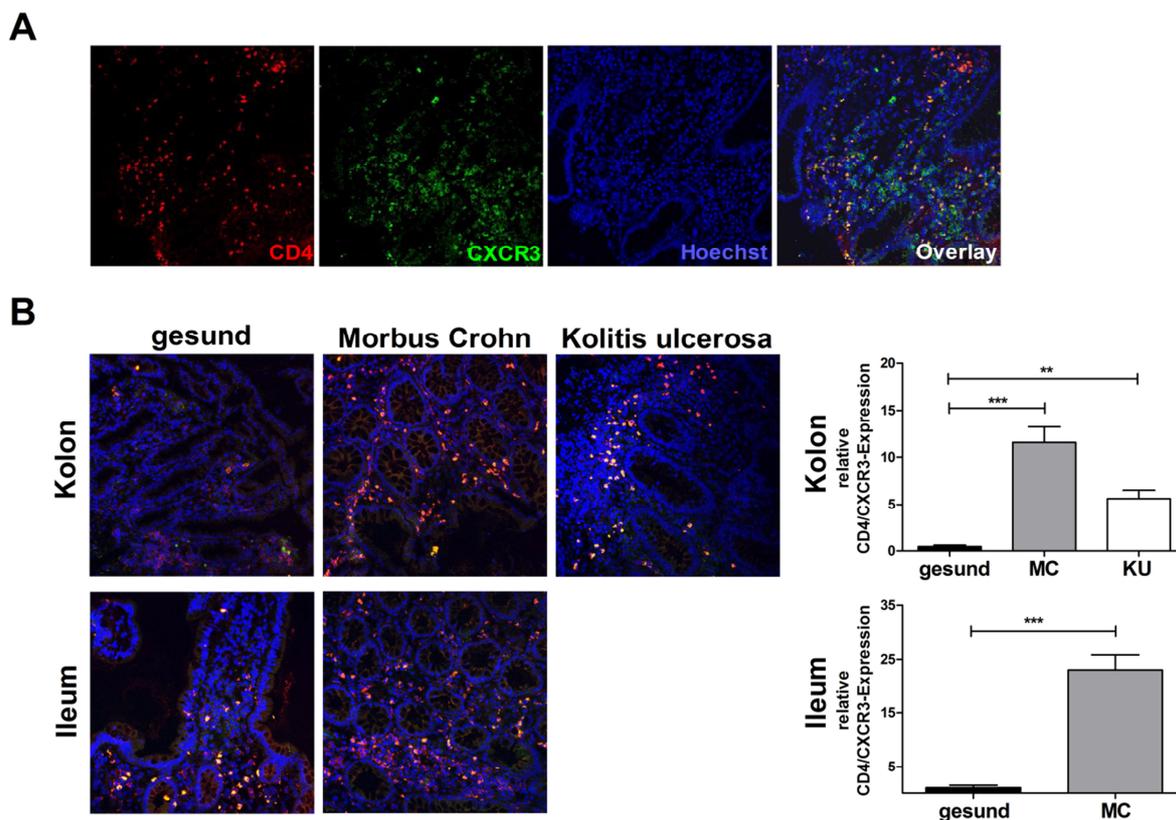


Abbildung 3-23. CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen akkumulieren in der entzündeten Darmmukosa von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten. Aus Kolon- und Ileumbiopsien von gesunden Probanden (n=5) sowie von Morbus Crohn (MC) (n=5) und Kolitis ulcerosa (KU) (n=5) Patienten mit aktivem Entzündungsschub wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen CD4 (rot) und CXCR3 (grün) markiert. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit einem Hoechst Farbstoff (blau). A) Exemplarisch sind die Einzelfärbungen für CD4, CXCR3 und der Zellkerne sowie die Zusammenführung aller Einzelbilder (*Overlay*) eines Gefrierschnittes aus dem Kolon dargestellt. B) Das *Overlaybild* je eines gefärbten Gefrierschnittes aus dem Kolon und dem Ileum von gesunden Probanden sowie von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten ist dargestellt. Pro Darmbiopsie wurden je zwei Gefrierschnitte gefärbt und pro Gefrierschnitt jeweils vier Gesichtsfelder für die Quantifizierung (siehe Kapitel 2.8.2) analysiert. In den Säulendiagrammen sind die Daten aus allen analysierten Gefrierschnitten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (Kolon) bzw. mit dem Student's *t*-Test (Ileum) (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Tatsächlich kommt es in der Darmmukosa von CED Patienten während eines Entzündungsschubes zu einer starken Akkumulation von CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Modulation der CXCR3-CXCL10 Achse in Patienten mit CED ein interessanter therapeutischer Ansatzpunkt sein könnte.

3.4.2 Applikation eines CXCR3 Antagonisten für die Therapie intestinaler Entzündung

Um im Folgenden zu untersuchen, welchen Einfluss die systemische Blockierung von CXCR3 im Vergleich zur DEC-HA vermittelten Herunterregulation von CXCR3 im Darmentzündungsmodell hat, wurden Experimente mit einem CXCR3 Antagonisten durchgeführt. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden wie in Abbildung 3-24 A beschrieben mit PBS bzw. DEC-HA (a) oder einem CXCR3 (b) Antagonisten behandelt. An Tag 5 nach dem adoptiven Transfer HA-spezifischer T_H1-Zellen wurden die Tiere analysiert.

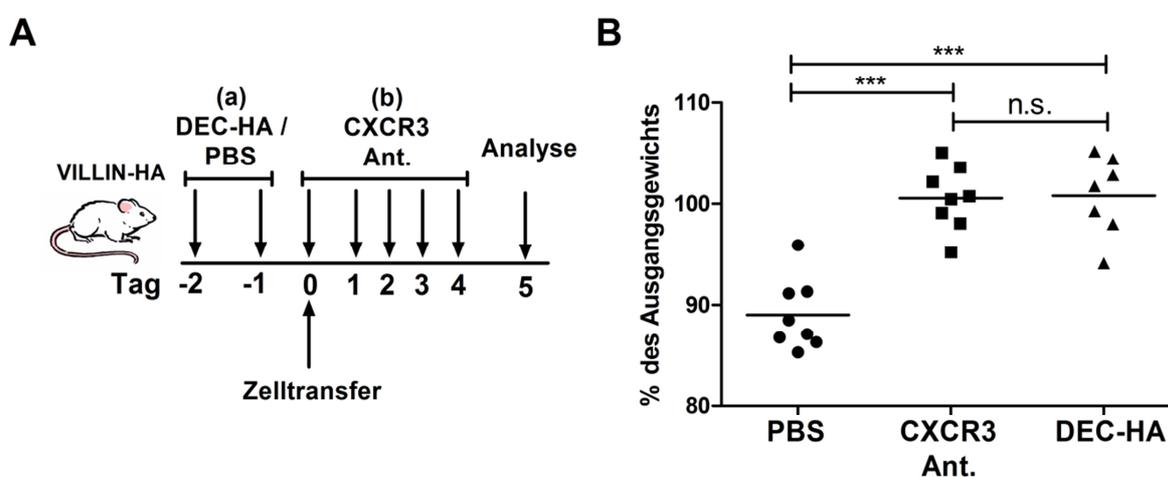


Abbildung 3-24. Die Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten schützt VILLIN-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme. A) VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 µg DEC-HA oder PBS (a) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3 x 10⁶ HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 µg eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (b) oder sterilem PBS i.p. behandelt. B) Das Gewicht der Tiere wurde täglich bestimmt. Dargestellt ist das prozentuale Körpergewicht an Tag 5 nach Transfer ausgehend vom Ausgangsgewicht. Jeder Datenpunkt steht für eine individuelle Maus. Die Daten sind aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt (*** p<0,001; n.s. = nicht signifikant).

In der PBS Kontrollgruppe war nach Transfer der HA-spezifischen T_H1-Zellen eine starke Gewichtsabnahme der Mäuse zu beobachten (Abb. 3-24 B). Im Gegensatz dazu konnte die tägliche Behandlung mit dem CXCR3 Antagonisten den Gewichtsverlust verhindern. Die Antagonist behandelten Tiere wiesen ein ähnliches Endgewicht wie die DEC-HA behandelten Tiere auf.

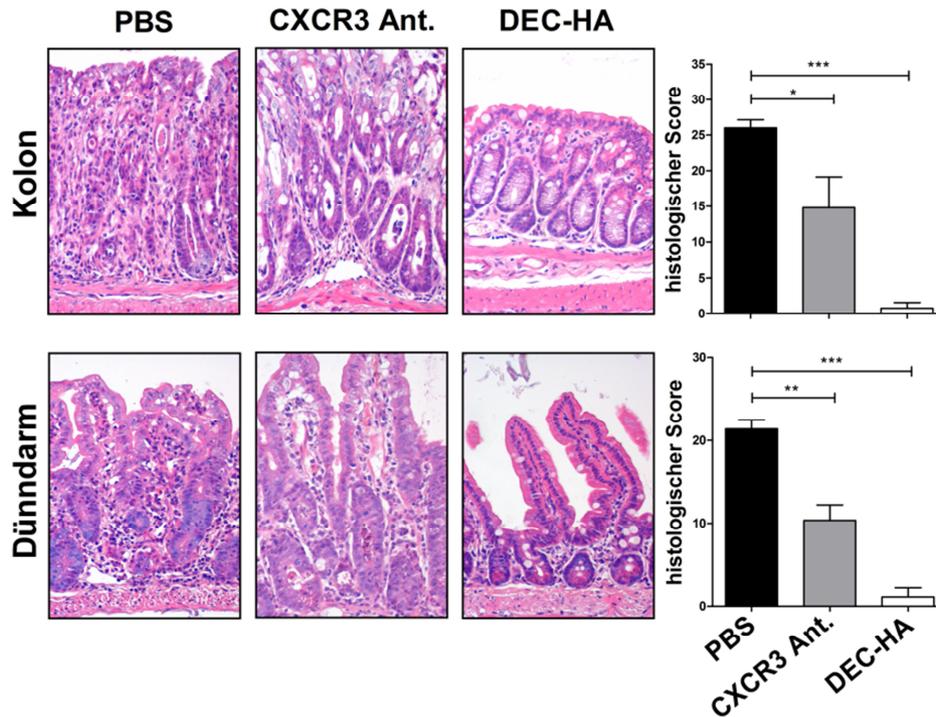


Abbildung 3-25. Die Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten führt zu geringerer Histopathologie im Dünndarm und Kolon von VILLIN-HA transgenen Mäusen. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 µg DEC-HA (n=8) oder PBS (n=8) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 µg eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (n=8) oder sterilem PBS i.p. behandelt. An Tag 5 nach Transfer wurden die Därme entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die histopathologische Analyse der Kolons und Dünndärme der verschiedenen Versuchsgruppen bestätigte den protektiven Effekt des CXCR3 Antagonisten im untersuchten Entzündungsmodell. VILLIN-HA transgene Mäuse, die mit dem CXCR3 Antagonisten behandelt worden waren, zeigten bei Versuchsende eine signifikant geringere Pathologie in beiden untersuchten Darmkompartimenten verglichen mit PBS behandelten Mäusen (Abb. 3-25). Bemerkenswert ist allerdings, dass die DEC-HA behandelte Gruppe die geringste Pathologie entwickelte.

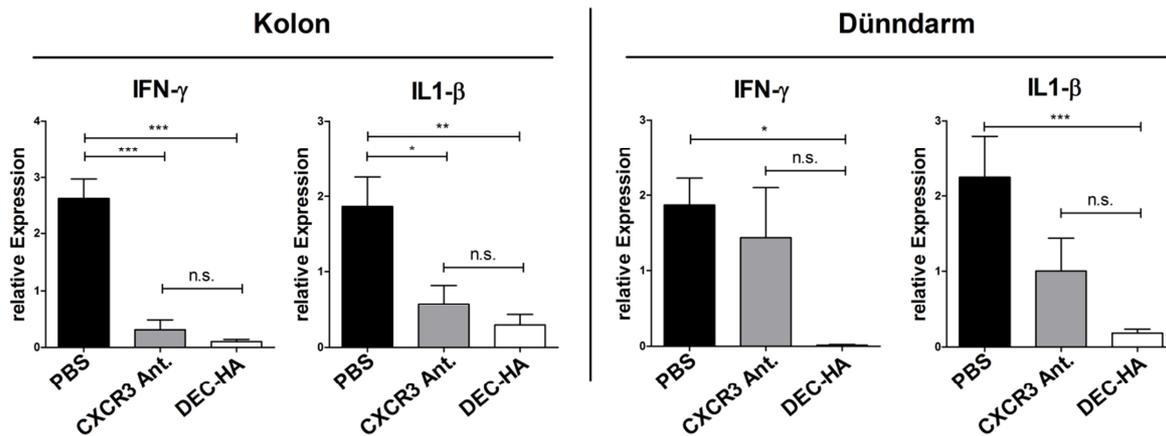


Abbildung 3-26. Die Expression von IFN- γ und IL1- β in Dünndarm- und Kolonbiopsien ist nach Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten reduziert. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 μ g DEC-HA (n=8) oder PBS (n=8) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 μ g eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (n=8) oder sterilem PBS i.p. behandelt. 5 Tage nach Transfer wurde aus Dünndarm- und Kolonbiopsien der Mäuse RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ und IL1- β analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001; n.s. = nicht signifikant).

Die Expressionsanalyse in den Darmbiopsien zeigte, dass im Kolon der Mäuse, die durchgehend mit dem CXCR3 Antagonisten behandelt worden waren, signifikant weniger IFN- γ und IL1- β exprimiert wurden als im Kolon der PBS Gruppe (Abb. 3-26). Die Expression war hier vergleichbar mit den DEC-HA behandelten Mäusen. In den Dünndärmen derselben Mäuse waren die Tendenzen ähnlich, allerdings war auch hier der protektive DEC-HA Effekt stärker ausgeprägt.

Um zu überprüfen, ob die CXCR3 Antagonist Behandlung tatsächlich zu einer verminderten Migration von transferierten T_H1-Zellen in den Darm der VILLIN-HA Mäuse führt, wurden abschließend Zellen aus den MLN und der Lamina Propria des Kolons durchflusszytometrisch untersucht.

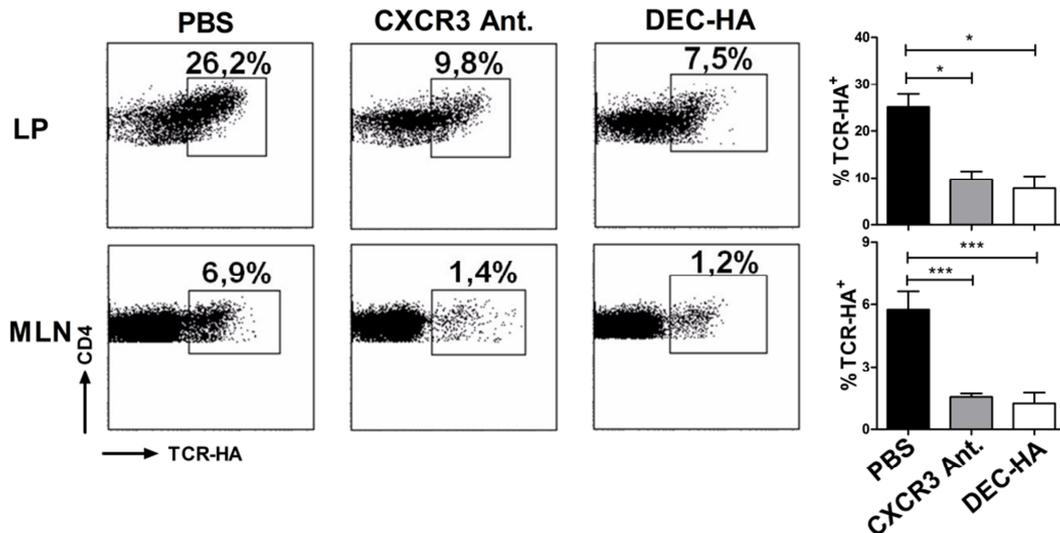


Abbildung 3-27. Der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Darm von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist nach Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten reduziert. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 µg DEC-HA (n=8) oder PBS (n=8) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 µg eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (n=8) oder sterilem PBS i.p. behandelt. An Tag 5 nach Transfer wurden Einzelzellsuspensionen der MLN und der Lamina Propria des Kolons (LP) dieser Mäuse hergestellt und der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) durchflusszytometrisch bestimmt. Exemplarisch ist je ein Organ aus jeder Mausgruppe gezeigt. In den Säulendiagrammen ist die Zusammenfassung aller Daten als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* p<0,05; *** p<0,001).

Die Behandlung von VILLIN-HA transgenen Mäusen mit dem CXCR3 Antagonisten nach dem Transfer von HA-spezifischen T_H1-Zellen führte zur signifikant geringeren Einwanderung dieser Zellen in den Darm der Mäuse (Abb. 3-27). Sowohl in der Lamina Propria des Kolons als auch in den MLN war der Anteil der transferierten T_H1-Zellen deutlich geringer als in den PBS behandelten Kontrolltieren und vergleichbar zu den Anteilen in den DEC-HA behandelten Tieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die systemische Blockierung des Chemokinrezeptors CXCR3 im vorliegenden Entzündungsmodell dazu führt, dass die Migration HA-spezifischer T_H1-Zellen in den Darm der VILLIN-HA transgenen Mäuse reduziert ist, was zu einer deutlich verbesserten Pathologie im Darm der Tiere führt. Grundsätzlich lässt sich aber auch feststellen, dass der protektive Effekt der DEC-HA Behandlung deutlich stärker ausgeprägt ist.

3.4.3 IL-10 beeinflusst die CXCR3-abhängige Migration von T_H1-Zellen

In Kapitel 3.3.5 konnte gezeigt werden, dass es nach DEC-HA Behandlung im T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell zu einer Herunterregulation des Chemokinrezeptors CXCR3 auf T_H1-Zellen kommt, was zu einer geringeren Migration dieser Zellen in den Darm führt. Es ist jedoch unklar wie dieser Mechanismus vermittelt wird.

Kürzlich konnten Ring und Kollegen zeigen, dass *Antigen-Targeting* mittels *single chain fragments* (ScFv) über DEC-205 nicht nur zur effizienten Antigenpräsentation, sondern zusätzlich zur erhöhten Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch DCs führt (Ring *et al.*, 2013). Daher sollte getestet werden, ob dieser Effekt auch durch die Behandlung mit DEC-HA nachgewiesen werden kann. Dazu wurden naive BALB/c Mäuse mit DEC-HA, ISO-HA oder PBS behandelt, nach 24 Stunden CD11c⁺ DCs aus den Milzen der Mäuse isoliert und die Expression von IL-10 untersucht.

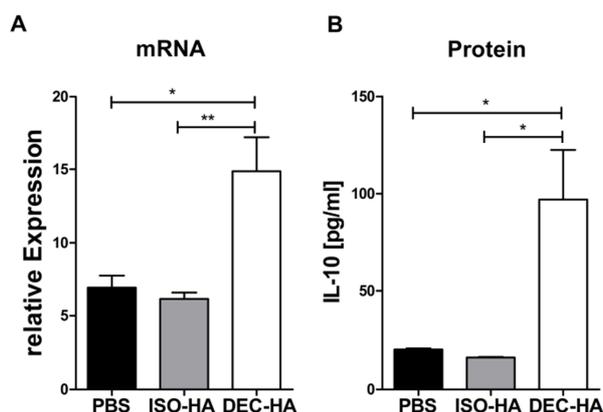


Abbildung 3-28. Die IL-10 Expression ist in DCs nach DEC-HA Behandlung erhöht. Naive BALB/c Mäuse wurden mit je 10 µg DEC-HA (n=6), ISO-HA (n=6) oder sterilem PBS (n=6) i.p. behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung wurden CD11c⁺ DCs aus den Milzen dieser Mäuse mittels MACS-Technologie isoliert und über Nacht mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die IL-10 Expression in den DCs wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (A) und Luminex Technologie (B) analysiert. Dargestellt sind zusammengefasste Daten als Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* p<0,05; ** p<0,01).

Nach Applikation von DEC-HA in BALB/c Mäuse wurde eine signifikant erhöhte Expression von IL-10 in DCs verglichen mit PBS und ISO-HA behandelten Mäusen detektiert. Dieser Effekt war sowohl auf mRNA- (Abb. 3-28 A) als auch auf Proteinebene (Abb. 3-28 B) nachweisbar.

IL-10 ist ein wichtiges Zytokin für die Homöostase des Darms. Dies drückt sich u.a. darin aus, dass das Fehlen von IL-10 zur massiven Entzündungsreaktion im Darm von IL-10^{-/-} Mäusen führt (Kuhn *et al.*, 1993). Trotz der elementaren Funktion von IL-10 im Darm ist bisher wenig über seine Funktion im Zusammenhang mit T_H1-Zellen und im Speziellen auf deren Migrationsfähigkeit bekannt. Um zu untersuchen, ob die durch DEC-HA induzierte Expression von IL-10 Einfluss auf die Migration von T_H1-Zellen hat, wurden ähnlich wie in Abbildung 3-21 dargestellt (siehe Kapitel 3.3.5) *in vitro* Migrationsexperimente durchgeführt. Zusätzlich zur DEC-HA und ISO-HA Behandlung wurde den Versuchsmäusen täglich ein neutralisierender α -IL-10 bzw. ein Isotypkontrollantikörper injiziert (Abb. 3-29 A). Als interne Kontrolle wurde einer Gruppe nur steriles PBS injiziert.

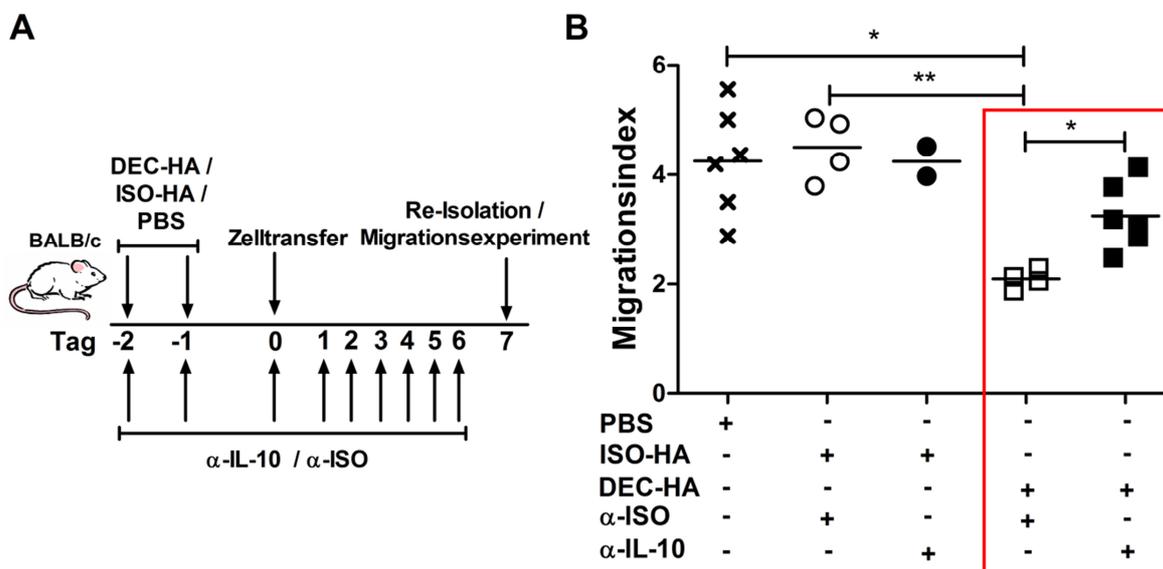


Abbildung 3-29. Die DEC-HA vermittelte Reduzierung der Migration wird durch Neutralisierung von IL-10 aufgehoben. A) Naive BALB/c Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μ g DEC-HA oder ISO-HA i.p. behandelt. Parallel wurde diesen Mäusen täglich 50 μ g eines neutralisierenden α -IL-10 bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (α -ISO) bis zum Versuchsende i.p. injiziert. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 5×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. An Tag 7 nach Transfer wurden die HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch aus den Milzen der Mäuse re-isoliert und in Migrationsexperimenten mit rekombinantem CXCL10 als Chemokin eingesetzt. B) Angegeben ist der Migrationsindex der Zellen (siehe Kapitel 2.7.8). Jeder Datenpunkt entspricht einer individuellen Maus. Zusammengefasst sind die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Wie bereits in vorherigen Experimenten (siehe Abb. 3-21) gezeigt, wiesen re-isolierte CD4⁺ T-Zellen aus ISO-HA behandelten Mäusen eine starke *in vitro* Migration Richtung des rekombinanten CXCL10 auf. Die Behandlung mit einem neutralisierenden α -IL-10 Antikörper hatte in diesen Mäusen keinen Einfluss auf die

Migration (Abb. 3-29 B). HA-spezifische CD4⁺ T-Zellen aus DEC-HA behandelten Mäusen migrierten signifikant geringer in Richtung des Chemokins. Interessanterweise wurde dieser Effekt vollständig aufgehoben, wenn IL-10 durch Applikation eines Antikörpers neutralisiert wurde. Dies zeigte sich in einer signifikant erhöhten Migration der T-Zellen im *in vitro* Experiment (Abb. 3-29 B, rotes Rechteck).

Um zu überprüfen, ob die von DEC-HA/IL-10 vermittelte Reduzierung der Migration HA-spezifischer T_H1-Zellen nicht nur *in vitro* nachweisbar ist, sondern auch im T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell Konsequenzen hat, wurde die α -IL-10 Behandlung im Folgenden auch in diesem Modell eingesetzt. Dazu wurde VILLIN-HA transgenen Mäusen im T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell zusätzlich zur DEC-HA bzw. ISO-HA Behandlung ein neutralisierender α -IL-10 oder ein Isotypkontrollantikörper injiziert (Abb. 3.30 A).

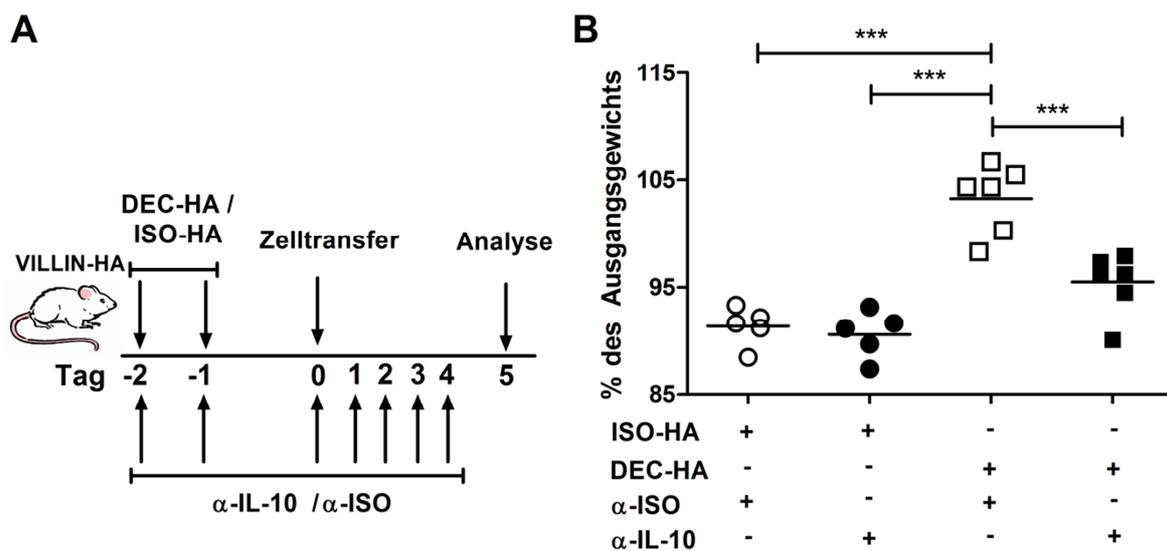


Abbildung 3-30. Die Neutralisierung von IL-10 führt in DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen zur Umkehrung des DEC-HA vermittelten Schutzes vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme. A) VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μ g DEC-HA oder ISO-HA i.p. behandelt. Parallel wurde diesen Mäusen täglich 50 μ g eines neutralisierenden α -IL-10 bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (α -ISO) bis zum Versuchsende i.p. injiziert. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. B) Das Gewicht der Tiere wurde täglich bestimmt. Dargestellt ist das prozentuale Körpergewicht an Tag 5 nach Transfer ausgehend vom Ausgangsgewicht. Jeder Datenpunkt steht für eine individuelle Maus. Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (***) $p < 0,001$.

ISO-HA behandelte Mäuse hatten 5 Tage nach Transfer von HA-spezifischen T_H1-Zellen rund 10 % ihres Ausgangsgewichtes verloren, unabhängig davon ob sie mit einem α -IL-10 oder Isotypkontrollantikörper behandelt worden waren

(Abb. 3-30 B). DEC-HA behandelte Mäuse, denen zusätzlich ein Isotypkontrollantikörper injiziert worden waren, wiesen weiterhin ein konstantes Gewicht über den Versuchszeitraum auf (Abb. 3-30 B). Bemerkenswerterweise wurde der protektive Effekt der DEC-HA Behandlung vollständig aufgehoben, wenn das IL-10 in den Mäusen mit einem Antikörper neutralisiert wurde (Abb. 3-30 B). Die Mäuse verloren signifikant mehr Gewicht; vergleichbar mit dem Gewichtsverlust in den ISO-HA Kontrollgruppen.

Auch die Untersuchung der weiteren Entzündungsparameter wie der Histopathologie (Abb. 3-31) und der Expression von IFN- γ im Darm (Abb. 3-32) bestätigten, dass der protektive DEC-HA Effekt durch die Neutralisierung von IL-10 nahezu vollständig aufgehoben wurde.

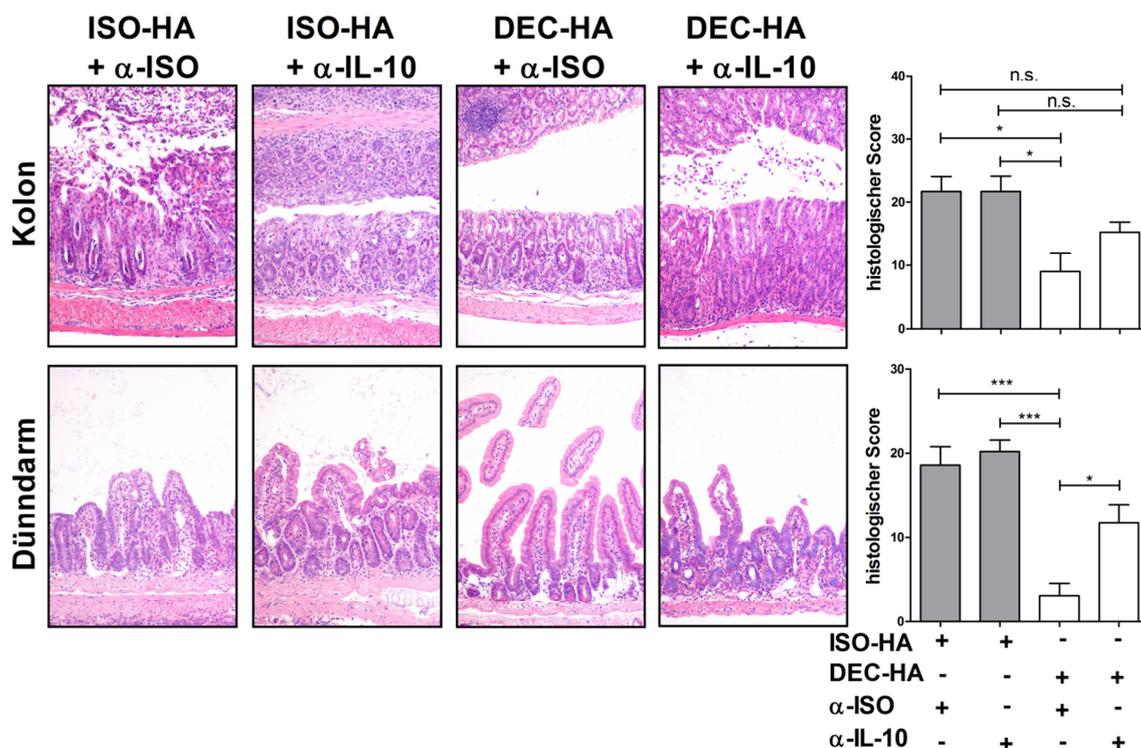


Abbildung 3-31. Die Neutralisierung von IL-10 führt in DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen zu einer erhöhten Histopathologie. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μ g DEC-HA (n=6) oder ISO-HA (n=5) i.p. behandelt. Parallel wurde diesen Mäusen täglich 50 μ g eines neutralisierenden α -IL-10 (n=6) bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (α -ISO) (n=5) bis zum Versuchsende i.p. injiziert. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. An Tag 5 nach Transfer wurden die Därme entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in 2.8.1 beschrieben bewertet. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant).

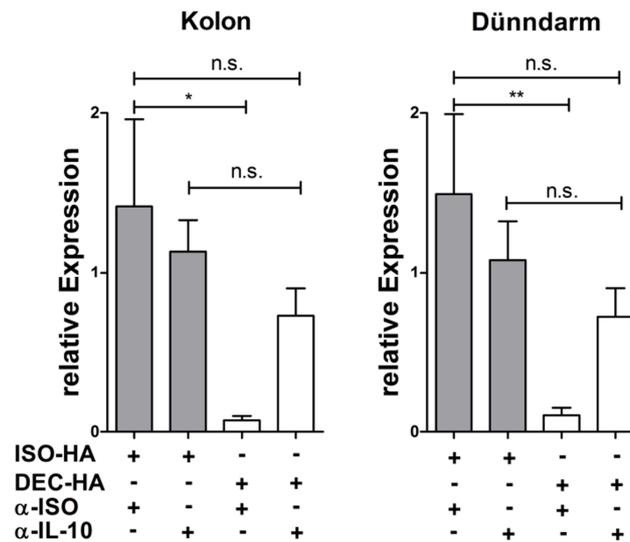


Abbildung 3-32. Die Neutralisierung von IL-10 führt in DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen zu erhöhter IFN- γ Expression in Dünndarm- und Kolonbiopsien. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 μ g DEC-HA (n=6) oder ISO-HA (n=5) i.p. behandelt. Parallel wurde diesen Mäusen täglich 50 μ g eines neutralisierenden α -IL-10 (n=6) bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (α -ISO) (n=5) bis zum Versuchsende i.p. injiziert. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 3×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. 5 Tage nach dem Transfer wurde aus Dünndarm- und Kolonbiopsien der Mäuse RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant).

Im abschließenden Schritt wurde überprüft, ob die Neutralisierung von IL-10 dazu führt, dass die Migration der T_H1 -Zellen in den Darm der VILLIN-HA transgenen Mäuse trotz der DEC-HA Behandlung verstärkt wird. Dazu wurde der Anteil der HA-spezifischen T_H1 -Zellen im Kolon und den MLN 5 Tage nach Transfer durchflusszytometrisch bestimmt.

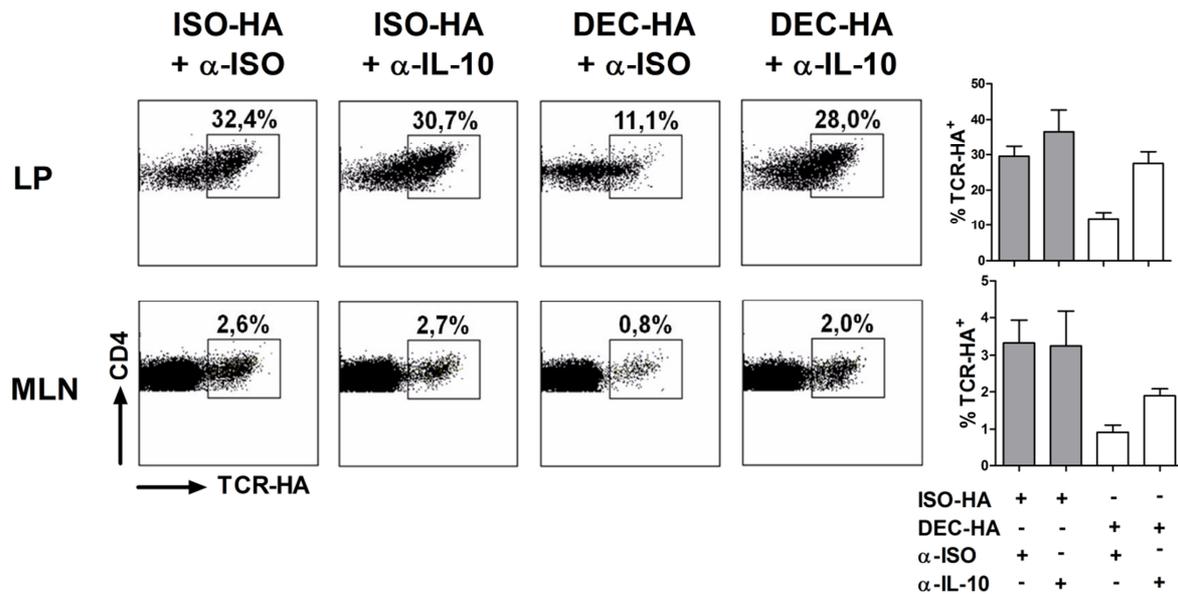


Abbildung 3-33. Der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Darm von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist nach DEC-HA und α-IL-10 Behandlung erhöht. VILLIN-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit je 1 µg DEC-HA (n=6) oder ISO-HA (n=5) i.p. behandelt. Parallel wurde diesen Mäusen täglich 50 µg eines neutralisierenden α-IL-10 (n=6) bzw. eines Isotypkontrollantikörpers (α-ISO) (n=5) bis zum Versuchsende i.p. injiziert. An Tag 0 erfolgte der adoptive Transfer von 3x10⁹ HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. An Tag 5 nach dem Transfer wurden Einzelzellsuspensionen der MLN und der Lamina Propria des Kolons (LP) dieser Mäuse hergestellt und der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) durchflusszytometrisch bestimmt. Exemplarisch ist je ein Organ aus jeder Mausgruppe gezeigt. In den Säulendiagrammen ist die Zusammenfassung der Daten aus zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM dargestellt.

In den MLN und der Lamina Propria des Kolons von DEC-HA behandelten Mäusen war der Anteil der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wie bereits in den vorangegangenen Experimenten deutlich geringer als in den ISO-HA Kontrollgruppen. Durch die Neutralisierung von IL-10 in den DEC-HA behandelten Mäusen wurde dieser Effekt wieder aufgehoben, so dass der Anteil der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erhöht und vergleichbar mit dem der ISO-HA behandelten Gruppen war (Abb. 3-33).

Als Zusammenfassung dieser Daten lässt sich festhalten, dass die Migration von T_H1-Zellen in dem untersuchten Modell abhängig von IL-10 ist. Durch die DEC-HA Behandlung kommt es zu einer erhöhten Expression von IL-10 durch DCs. Diese führt zu einer Herunterregulation der CXCR3 Expression auf den transferierten HA-spezifischen T_H1-Zellen und als Konsequenz zu einer verminderten Migration dieser Zellen in den Darm. Wird IL-10 neutralisiert, wird dieser Effekt aufgehoben und es kommt trotz DEC-HA Behandlung zu einer starken Entzündungsreaktion im Darm der Mäuse.

3.5 Therapeutische Immunmodulation in der Lunge

3.5.1 Etablierung eines T_H1-Zell vermittelten Lungenentzündungsmodells

Im T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell konnte ein neuer Toleranzmechanismus identifiziert werden, der auf *Antigen-Targeting* über DEC-205 beruht. Für den potentiellen therapeutischen Einsatz ist es interessant zu untersuchen, ob dieser Ansatz spezifisch die Migration von Effektorzellen in den Darm beeinflusst oder auch die Migration in andere Organe moduliert.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde das transgene SPC-HA Mausmodell genutzt. SPC-HA transgene Mäuse exprimieren das Modellantigen Hemagglutinin unter dem *surfactant protein C* (SPC) Promotor, der in alveolaren Epithelzellen des Typ II aktiv ist (Bruder *et al.*, 2004). Zunächst wurde untersucht, ob analog zum VILLIN-HA Darmentzündungsmodell der Transfer von HA-spezifischen T_H1-Zellen in SPC-HA Mäuse zu einer Entzündung der Lunge führt.

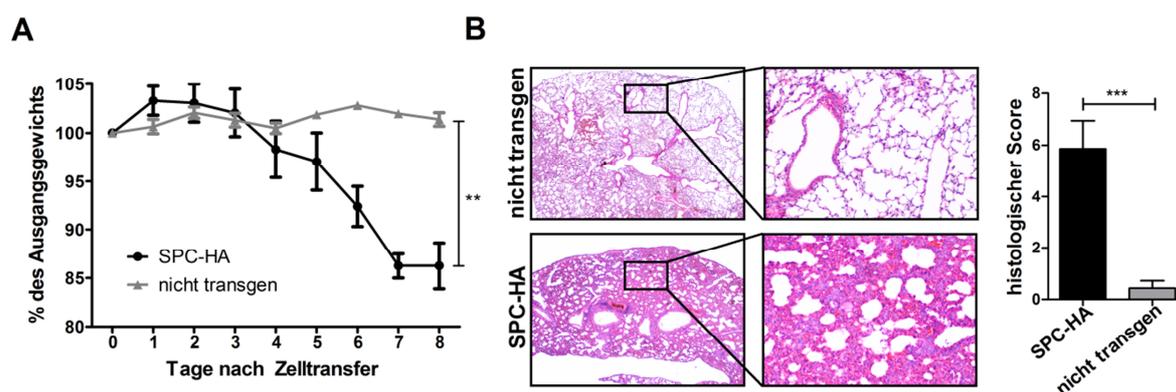


Abbildung 3-34. Der adoptive Transfer von HA-spezifischen T_H1-Zellen in SPC-HA transgene Mäuse führt zur Entzündung der Lunge. 1×10^6 HA-spezifische T_H1-Zellen wurden adoptiv in SPC-HA transgene Mäuse (n=3) oder nicht transgene Geschwistertiere (n=3) transferiert. A) Die Veränderung des Gewichts ist als Mittelwert \pm SEM in Prozent ausgehend vom Ausgangsgewicht dargestellt. B) An Tag 8 nach Zelltransfer wurden die Lungen entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Exemplarisch ist je ein Ausschnitt pro Lunge dargestellt. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nach dem Zelltransfer wurde täglich das Körpergewicht der Mäuse kontrolliert. Ab Tag 5 nach dem Zelltransfer zeigten SPC-HA transgene Mäuse einen Gewichtsverlust, der sich bis Tag 8 nach Transfer verstärkte (Abb. 3-34 A). Im Gegensatz dazu blieb das Körpergewicht der nicht transgenen Geschwistertiere

konstant. An Tag 8 nach Zelltransfer wurden die Lungen histopathologisch untersucht. In den Lungen der nicht transgenen Mäuse waren keine pathologischen Veränderungen zu beobachten. In den SPC-HA transgenen Mäusen dagegen war das Lungengewebe stark verdichtet. Bei Vergrößerung des Bildausschnitts waren stark verbreitete Alveolarsepten, einige Pneumozytenhyperplasien sowie eine verstärkte Infiltration der Lunge mit Lymphozyten detektierbar. Der Transfer von HA-spezifischen T_H1 -Zellen in SPC-HA Mäuse führt also zu einer massiven Entzündungsreaktion in der Lunge.

3.5.2 DEC-HA Behandlung führt im T_H1 -Zell vermittelten Lungenentzündungsmodell zu einem geringen Schutz vor Entzündung

Als nächstes wurde das Potential der DEC-HA Behandlung für die Prävention der Entzündung in diesem Modell analysiert. Insbesondere sollte auch untersucht werden, ob die CXCR3/CXCL10-vermittelte Migration der transferierten T_H1 -Zellen in diesem Modell eine Rolle spielt. Dazu wurden SPC-HA transgene Mäuse vor Zelltransfer mit DEC-HA oder PBS (a), oder nach dem Zelltransfer mit einem CXCR3 Antagonisten (b) behandelt (Abb. 3-35 A).

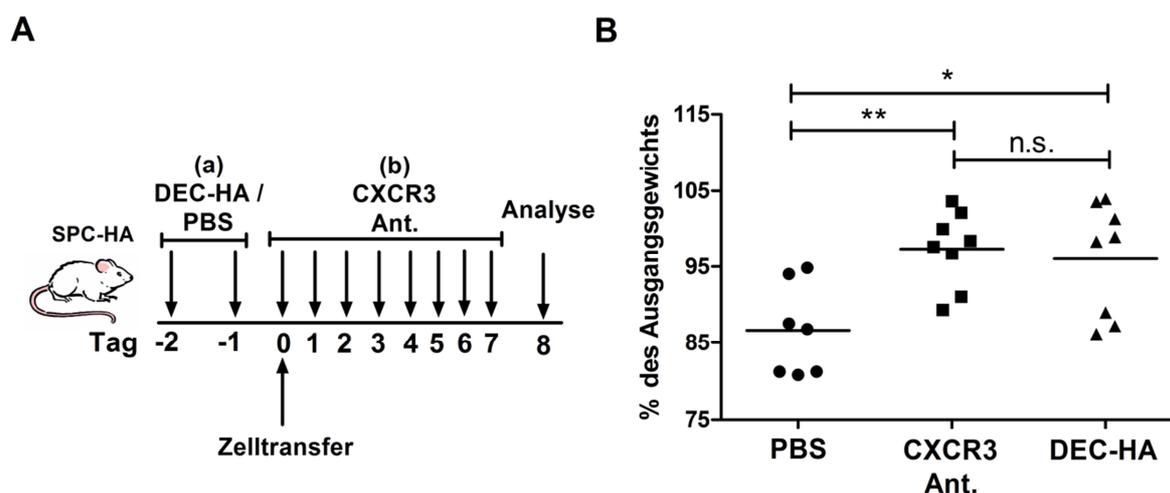


Abbildung 3-35. Die Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten schützt SPC-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme. A) SPC-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 µg DEC-HA oder PBS i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 1×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 µg eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) oder sterilem PBS i.p. behandelt. B) Das Gewicht der Tiere wurde täglich bestimmt. Dargestellt ist das prozentuale Körpergewicht an Tag 8 nach Transfer ausgehend vom Ausgangsgewicht. Jeder Datenpunkt steht für eine individuelle Maus. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant).

Sowohl die Behandlung mit DEC-HA als auch mit einem CXCR3 Antagonisten führte im Lungenentzündungsmodell dazu, dass die Mäuse im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe einen signifikant geringeren Gewichtsverlust aufwiesen (Abb. 3-35 B), was auf einen potentiell protektiven Effekt beider Behandlungsansätze auch im Lungenentzündungsmodell hindeutet. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der verbesserte Gewichtsverlauf auch zu einer verbesserten Histopathologie der Lunge in den DEC-HA bzw. CXCR3 Antagonist behandelten Gruppen führte.

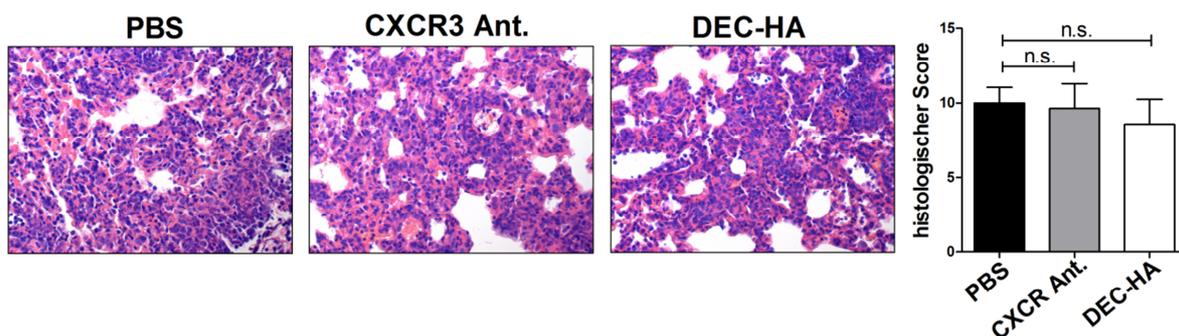


Abbildung 3-36. Die Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten führt zu keiner verbesserten Histopathologie in den Lungen von SPC-HA transgenen Mäusen. SPC-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 µg DEC-HA (n=8) oder PBS (n=7) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 1×10^6 HA-spezifischen T_H1 -Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 µg eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (n=8) oder sterilem PBS i.p. behandelt. An Tag 8 nach Zelltransfer wurden die Lungen entnommen, Gewebeschnitte angefertigt und H&E Färbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem 40x Objektiv mikroskopiert und die Pathologie wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben bewertet. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (n.s. = nicht signifikant).

Trotz des deutlich besseren Gewichtsverlaufs in den DEC-HA und CXCR3 Antagonist behandelten Gruppen zeigte die histopathologische Analyse der Lungen keine Unterschiede im Schweregrad der Pathologie in den verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 3-36).

In den Lungen der mit PBS behandelten Mäuse war nach T_H1 -Zelltransfer eine starke Expression von IFN- γ und TNF- α detektierbar (Abb. 3-37). Die Expression dieser Gene war in den Gruppen, die mit einem CXCR3 Antagonisten oder DEC-HA behandelt wurden, zwar tendenziell niedriger, allerdings in keiner Gruppe signifikant gegenüber der PBS Kontrollgruppe reduziert. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass SPC-HA Mäuse nach CXCR3 Antagonist bzw. DEC-HA Behandlung nur bedingt vor der T_H1 -Zell vermittelten Entzündung der Lunge geschützt sind.

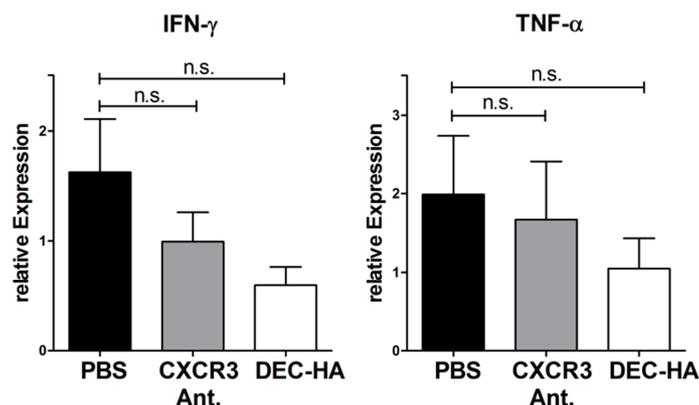


Abbildung 3-37. Die IFN- γ und TNF- α Expression in der Lunge ist nach Behandlung mit DEC-HA bzw. einem CXCR3 Antagonisten leicht reduziert. SPC-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 μ g DEC-HA (n=8) oder PBS (n=7) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 1×10^6 HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 μ g eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (n=8) oder sterilem PBS i.p. behandelt. 8 Tage nach Zelltransfer wurde aus Lungenbiopsien der Mäuse RNA isoliert und mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von IFN- γ und TNF- α analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer *one-way* ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (n.s. = nicht signifikant).

Ein möglicher Grund für den verminderten Schutz nach DEC-HA bzw. CXCR3 Antagonist Behandlung könnte darin liegen, dass CXCL9 und CXCL10 im untersuchten Entzündungsmodell nicht verstärkt in der Lunge exprimiert werden. Um diesen Punkt zu klären, wurde die Expression von CXCL9 und CXCL10 in der Lunge von SPC-HA transgenen Mäusen nach Transfer von HA-spezifischen T_H1-Zellen analysiert.

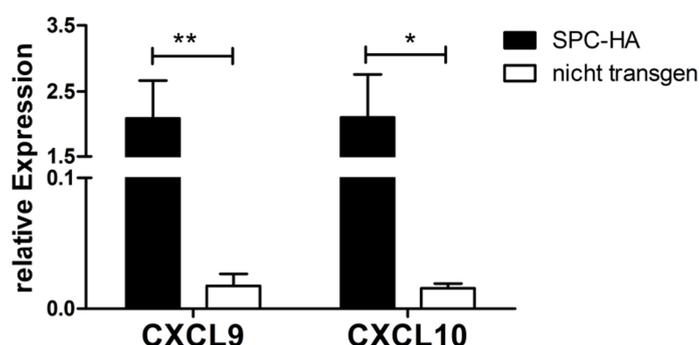


Abbildung 3-38. Die CXCL9 und CXCL10 Expression in der Lunge von SPC-HA transgenen Mäusen ist nach T_H1-Zelltransfer stark erhöht. SPC-HA transgenen Mäusen (n=5) oder nicht transgenen Geschwistertieren (n=5) wurden 1×10^6 HA-spezifische T_H1-Zellen i.v. injiziert. 8 Tage nach Transfer wurde RNA aus Lungenbiopsien der Mäuse isoliert und anschließend mittels quantitativer Real-Time PCR die Expression von CXCL9 und CXCL10 analysiert. Die Normalisierung der Werte wurde gegen das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Dargestellt sind die Daten für alle untersuchten Mäuse als Mittelwert \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's *t*-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Interessanterweise war wie im T_H1-Zell vermitteltem Darmentzündungsmodell die CXCL9 und CXCL10 Expression in den entzündeten Lungen der SPC-HA transgenen Mäuse signifikant erhöht (Abb. 3-38). Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob die Migration der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in diesem Modell beeinflusst war. Dazu wurde der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Lunge und den bronchialen Lymphknoten (BLN) nach DEC-HA bzw. CXCR3 Antagonist Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt.

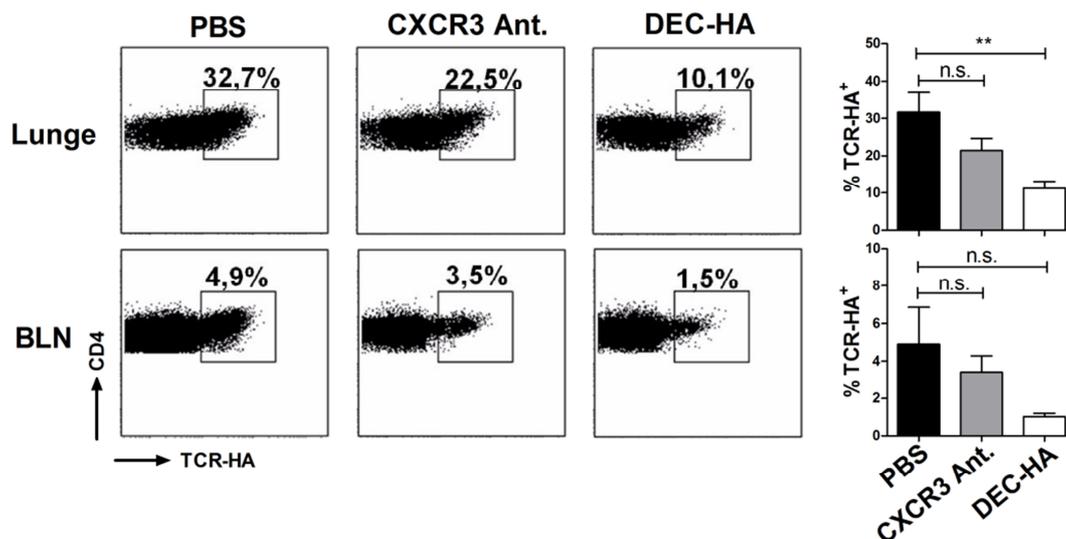


Abbildung 3-39. Der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Lunge von SPC-HA transgenen Mäusen ist nach Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten reduziert. SPC-HA transgene Mäuse wurden an Tag -2 und -1 mit 1 µg DEC-HA (n=8) oder PBS (n=7) i.p. behandelt. An Tag 0 erfolgte der adoptive Zelltransfer von 1 × 10⁶ HA-spezifischen T_H1-Zellen pro Maus. Ab dem Tag des Transfers wurde eine Gruppe täglich bis Versuchsende mit 150 µg eines CXCR3 Antagonisten (CXCR3 Ant.) (n=8) oder sterilem PBS i.p. behandelt. An Tag 8 nach dem Transfer wurden Einzelzellsuspensionen der BLN und der Lungen dieser Mäuse hergestellt und der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen (TCR-HA) durchflusszytometrisch bestimmt. Exemplarisch ist je ein Organ aus jeder Mausgruppe gezeigt. In den Säulendiagrammen ist die Zusammenfassung aller Daten als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einer one-way ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur (** p<0,01; n.s. = nicht signifikant).

In den Lungen und BLN der PBS behandelten SPC-HA transgenen Mäuse war der Anteil der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation nach Zelltransfer mit ca. 30 % (Lunge) bzw. 5 % (BLN) sehr hoch (Abb. 3-39). In der mit dem CXCR3 Antagonist behandelten Gruppe war dieser Anteil in beiden Kompartimenten geringer, allerdings nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Durch die Behandlung der Mäuse mit DEC-HA verringerte sich der Anteil der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Lunge auf ca. 10 % und in den BLN auf ca. 1,5 %.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten im untersuchten Lungenentzündungsmodell nur zu einem schwachen Schutz der Tiere führt. Obwohl das Gewicht der SPC-HA transgenen Mäuse nach Zelltransfer konstant blieb, die IFN- γ und TNF- α Expression stark vermindert war und der Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Lunge reduziert war, konnten keine Unterschiede in der Pathologie detektiert werden.

4 Diskussion

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa weisen insbesondere in Industrieländern eine stark steigende Inzidenz und Prävalenz auf (Molodecky *et al.*, 2012). Durch die schubförmig verlaufende Charakteristik der Erkrankungen geht das Auftreten von CED mit einer deutlichen Verschlechterung der Lebensqualität der Patienten einher. Studien weisen auch auf eine geringere Lebenserwartung für CED Patienten hin (O'Toole *et al.*, 2014). Dies ist u.a. darin begründet, dass Betroffene ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms aufweisen (Ekbom *et al.*, 1990).

Kurative Therapien gegen CED sind trotz intensiver Forschungsbemühungen der letzten Dekaden nicht verfügbar. Vielmehr dienen die verfügbaren Therapeutika dem Erreichen von zwei Hauptzielen: der Induktion einer Remission während akuter Entzündungsschübe sowie der Aufrechterhaltung der Remission in entzündungsfreien Intervallen (Zenlea und Peppercorn, 2014). Diese Therapien sind in Bezug auf die Ursache der Erkrankungen unspezifisch und beruhen auf der Suppression des gesamten Immunsystems. Der Grund für die geringe Verfügbarkeit kausaler Therapieformen gegen CED ist die nur unzureichend verstandene und sehr diverse Ätiologie dieser Erkrankungen. Es gilt als sicher, dass erst das komplexe Zusammenspiel von Umwelteinflüssen, Veränderungen des intestinalen Mikrobioms und fehlerhafter Immunantworten in genetisch prädisponierten Personen zur Entstehung von CED führt (Scaldaferri und Fiocchi, 2007). Eine zentrale Rolle bei diesem Prozess spielt der Verlust immunologischer Toleranz gegenüber nicht pathogenen Antigenen von kommensalen Bakterien und Nahrungsantigenen (Podolsky, 2002). Daher stellt die aktive Vermittlung von Toleranz eine vielversprechende Interventionsmöglichkeit für die Behandlung chronischer Entzündungsprozesse im Darm dar. Einen Ansatzpunkt dafür bieten DCs als professionelle APCs des Immunsystems. In den letzten Jahren war u.a. die Subpopulation der DCs, die den Oberflächenrezeptor DEC-205 exprimieren, im Fokus vieler Studien. Es konnte gezeigt werden, dass die Antigenbeladung unreifer DCs spezifisch über diesen Rezeptor zu einer sehr effizienten Antigenpräsentation führt und in der Induktion von Toleranz resultiert (Hawiger *et al.*, 2001; Kretschmer *et al.*, 2005). Über diesen Ansatz ist es möglich in Mausmodellen u.a. für Diabetes und

Multiple Sklerose die Entstehung von Autoimmunität zu unterdrücken (Bruder und Westendorf *et al.*, 2005; Mukhopadaya *et al.*, 2008).

In den initialen Experimenten dieses Projektes konnte erstmals gezeigt werden, dass das *Antigen-Targeting* über DEC-205 zur Präsentation eines entsprechenden Zielantigens durch DCs nicht nur in der Milz, sondern auch in der Lamina Propria des Kolons und den MLN führt (siehe Abb. 3-2). Nach systemischer Applikation von DEC-HA konnte die Proliferation HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in den genannten Kompartimenten beobachtet werden; eine Grundvoraussetzung für die Untersuchung darmrelevanter Fragestellungen bezüglich DEC-205 vermittelter Toleranzinduktion.

Wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben, existiert eine Vielzahl von Mausmodellen für die Untersuchung intestinaler Entzündungsprozesse. Modelle, in denen antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen die Entzündung vermitteln, sind jedoch nur unzureichend beschrieben. Cong und Kollegen konnten zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen aus dem C3H/HeJBir Mausstamm einen TZR besitzen, der spezifisch für Antigene kommensaler Bakterien ist. Der adoptive Transfer dieser antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in SCID Mäuse führt ca. drei Monate nach Zelltransfer zu einer chronischen Entzündung des Kolons (Cong *et al.*, 1998). Allerdings ist die Voraussetzung für die Entzündungsinduktion der Zelltransfer in SCID Mäuse, die kein adaptives Immunsystem besitzen und somit immunkomprimiert sind (Bosma *et al.*, 1983). Um die Fragestellungen in dieser Arbeit in immunkompetenten Mäusen zu studieren, wurde zunächst ein Darmentzündungsmodell entwickelt, das durch CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird, die spezifisch für ein Epitop des Modelantigens Hemagglutinin sind und die Entzündung in immunkompetenten Mäusen initiieren können. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer HA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse zu einer starken Entzündung des Dünndarms der Tiere führt (Westendorf *et al.*, 2006). Die Induktion einer Entzündung durch den Transfer HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in diese Mäuse gelang allerdings nicht (Westendorf *et al.*, 2009b). In dieser Arbeit wurde die Gesamtpopulation HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen transferiert, die auch 10-15 % Foxp3⁺ Treg umfasst. Durch ihre suppressiven Eigenschaften sind Treg in der Lage die Entstehung von Entzündungsprozessen u.a. im Darm zu unterdrücken (Mottet *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurde die Hypothese formuliert, dass Treg die Entstehung einer Immunpathologie im Darm nach Transfer HA-spezifischer

CD4⁺ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse verhindern. Daher wurden HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen aus TCR-HA/Foxp3-GFP transgenen Mäusen durchflusszytometrisch isoliert (siehe Abb. 3-3) und adoptiv in VILLIN-HA transgene Mäuse transferiert. Tatsächlich führte dieser Ansatz zur Entstehung einer akuten Entzündung der intestinalen Mukosa der Tiere, die durch hohen Gewichtsverlust, schwere Histopathologie und starke Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Darm charakterisiert war (siehe Abb. 3-4 und 3-5). Auf diese Weise ist es erstmals gelungen, ein Mausmodell zu etablieren, das die Untersuchung CD4⁺ T-Zell vermittelter Immunantworten bei intestinalen Entzündungsvorgängen ermöglicht. Ein großer Vorteil dieses Modells liegt darin, dass VILLIN-HA Mäuse ein voll funktionsfähiges Immunsystem besitzen und nicht wie in den meisten T-Zelltransfer Modellen immundefiziente Mäuse für die Entzündungsinduktion notwendig sind. Darüber hinaus wird in diesem Modell noch einmal das Potential von Treg für die Unterdrückung von Immunreaktionen deutlich, da erst der Ausschluss dieser Zellen aus der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen zur Entzündung des Darms führt.

Wie bereits beschrieben konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die gezielte Antigenbeladung unreifer DCs über DEC-205 zur Toleranzvermittlung und so zur Unterdrückung von Autoimmunreaktionen führt. Liegen die DCs dagegen in einem reifen Stadium vor (z.B. nach TLR-Stimulation durch bakterielle oder virale Komponenten), kommt es stattdessen zur Ausbildung effizienter Immunantworten gegenüber dem entsprechenden Antigen (Idoyaga *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2007). In den Studien, in denen Autoimmunität unterbunden wurde, handelte es sich beim Ort der Toleranzvermittlung um Organe, in denen weitestgehend ein steriles Milieu vorherrscht; z.B. das Pankreas im Diabetesmodell oder das Zentralnervensystem im Multiple Sklerose Modell. Dagegen ist der Gastrointestinaltrakt das Organ im Körper, das am stärksten mit Umwelteinflüssen konfrontiert ist. Zusätzlich dazu ist der Darm mit einer immensen Zahl kommensaler Bakterien besiedelt, die potentiell zur Aktivierung des Immunsystems und insbesondere zur Reifung von DCs führen können (Eckburg *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Gegebenheiten liegt im Darm ein permanenter, leichter Entzündungsprozess vor, der als „physiologische Entzündung“ bezeichnet wird (Fiocchi, 1997). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das *Antigen-Targeting* über DEC-205 trotz der beschriebenen Umstände zur Toleranzinduktion im Darm und somit zur Prävention der Entzündung in dem neu etablierten Darmentzündungsmodell führen kann.

Tatsächlich waren VILLIN-HA transgene Mäuse durch die Behandlung mit DEC-HA vor adoptivem Transfer HA-spezifischer CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen von der Entstehung der Darmentzündung geschützt. Dieser Schutz war durch deutlich geringeren Gewichtsverlust der Mäuse, minimaler Histopathologie und geringer Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α im Kolon der Tiere gekennzeichnet (siehe Abb. 3-6 bis 3-8).

Die Vermittlung von Toleranz durch das *Antigen-Targeting* über DEC-205 umfasst im Wesentlichen drei Mechanismen: die Deletion und die Anergie antigen-spezifischer T-Zellen (Hawiger *et al.*, 2001; Hawiger *et al.*, 2004) sowie die Induktion von Treg aus naiven T-Zellen (Kretschmer *et al.*, 2005). In durchflusszytometrischen Analysen zeigte sich, dass in 30-40 % der transferierten HA-spezifischen CD4⁺Foxp3⁻ T-Zellen nach DEC-HA Behandlung nicht nur in der Milz, sondern auch in der Lamina Propria des Kolons und den MLN der VILLIN-HA transgenen Mäuse Foxp3 induziert wurde (siehe Abb. 3-9). Dies zeigt zum einen erneut die Kapazität von Treg für die *in vivo* Unterdrückung von Immunantworten und zum anderen das Potential des DEC-205 vermittelten *Antigen-Targetings* für die Induktion immunologischer Toleranz auch im Darm. Es liegt nahe, dass es sich bei der Treg Induktion durch DEC-205⁺ DCs um einen systemischen Effekt handelt, da der gleiche Mechanismus bereits für andere Organe postuliert wurde (Bruder und Westendorf *et al.*, 2005; Stern *et al.*, 2010).

Interessanterweise konnten auch in den Därmen der Kontrollgruppen (PBS und ISO-HA) HA-spezifische CD4⁺Foxp3⁺ Treg detektiert werden, deren Anteil zwischen 5 und 13 % an der Gesamtpopulation HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen lag (siehe Abb. 3-9). Ein möglicher Grund dafür könnte die geringe Menge des HA-Peptids sein, die im ISO-HA Konjugat vorliegt und durch APCs präsentiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Abgabe geringer Peptidmengen durch osmotische Pumpen CD4⁺ T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften induzieren kann (Apostolou und von Boehmer, 2004). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass IECs, die ein Selbstantigen exprimieren, auch in Abwesenheit von DCs in der Lage sind, antigen-spezifische Treg zu expandieren (Westendorf *et al.*, 2009b). Beide Beobachtungen zusammen könnten das Vorliegen Foxp3⁺ Treg auch nach ISO-HA Behandlung erklären.

Für die Initiierung effizienter Immunantworten gegenüber intestinalen Pathogenen müssen naive CD4⁺ T-Zellen aus der Peripherie in den Darm einwandern, wo sie in

den MLN durch DCs aktiviert und zu Effektorzellen differenziert werden (Macpherson und Smith, 2006). Die ausdifferenzierten T-Zellen sind anschließend in der Lage, in die Lamina Propria zu migrieren und dort zur Bekämpfung der eingedrungenen Pathogene beizutragen (Mowat, 2003). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass diese Aktivierung und Differenzierung auch gegenüber Antigenen kommensaler Bakterien stattfindet und dies der Auslöser für die Entwicklung von CED im Menschen sein kann (Kobozev *et al.*, 2010). Eine wesentliche Rolle spielen dabei differenzierte T_H1-Zellen. Insbesondere für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Morbus Crohn konnte in vielen Studien nachgewiesen werden, dass IFN- γ -produzierende T_H1-Zellen die Hauptvermittler der Entzündung sind (Fuss *et al.*, 1996b; Matsuoka *et al.*, 2004; Neurath *et al.*, 2002b). Die Entstehung der Kolitis ulcerosa gilt im Allgemeinen als T_H2-Zell vermittelt, jedoch lässt sich nicht ausschließen, dass auch hier T_H1-Zellen beteiligt sind (Danese und Fiocchi, 2011). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit belegt werden. In Kolonbiopsien von Kolitis ulcerosa Patienten wurden im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant mehr CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen detektiert (siehe Abb. 3-23 B). Da CXCR3 ein Marker für T_H1-Zellen ist (Loetscher *et al.*, 1998), legt diese Beobachtung nahe, dass auch dieser Zelltyp in der Pathogenese der Kolitis ulcerosa eine Rolle spielt. Eine Konsequenz aus diesen Beobachtungen ist, dass das Ziel für eine therapeutische Intervention in CED die Toleranzinduktion nicht nur gegenüber naiven CD4⁺ T-Zellen, sondern auch gegenüber differenzierten T_H1-Effektorzellen sein muss.

Bereits im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* im Darm in der Lage ist, Toleranz gegenüber naiven CD4⁺ T-Zellen zu induzieren. Es existieren jedoch keine Daten darüber, ob es über diesen Ansatz auch möglich ist, Immunantworten differenzierter T_H1-Zellen zu modulieren. Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde analog zum ersten Darmentzündungsmodell ein weiteres Modell etabliert, in dem der adoptive Transfer *in vitro* differenzierter, HA-spezifischer T_H1-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse zu einer akuten Entzündung des Darms führt, die durch hohen Gewichtsverlust der Tiere, starker Histopathologie im gesamten Darm und erhöhter Expression pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert ist (siehe Abb. 3-11 und 3-12). Ein Vorteil dieses Modells ist, dass die Entzündung nicht nur im Kolon der Tiere zu beobachten ist, sondern auch der Dünndarm gleichermaßen betroffen ist.

Die Behandlung VILLIN-HA transgener Mäuse mit DEC-HA führte auch im T_H1-Zell vermittelten Entzündungsmodell eindrucksvoll zur Prävention der Entzündungsinduktion im Darm. DEC-HA behandelte Mäuse wiesen nach T_H1-Zelltransfer ein konstantes Körpergewicht auf und zeigten nur eine schwache Histopathologie sowie eine geringe Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL1- β im Kolon und Dünndarm (siehe Abb. 3-13 bis 3-15). Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass das *Antigen-Targeting* über DEC-205 die Immunantwort differenzierter T_H1-Zellen modulieren kann.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen zeigte nach T_H1-Zelltransfer keine Unterschiede in der Foxp3 Expression. Weder in den transferierten, HA-spezifischen noch in den endogenen CD4⁺ T-Zellen der VILLIN-HA transgenen Mäuse war der Anteil der Foxp3⁺ Treg verändert (siehe Abb. 3-16), so dass die Konversion von T_H1-Zellen in Foxp3⁺ Treg als potentieller Mechanismus für den Schutz vor der intestinalen Entzündungsreaktion ausgeschlossen werden kann. Diese Beobachtung ist nicht überraschend, da postuliert wurde, dass Foxp3⁺ Treg durch einen starken TZR-Stimulus in T_H1-Zellen konvertiert werden können (Lu *et al.*, 2010), der umgekehrte Weg aber offenbar nicht möglich ist (Caretto *et al.*, 2010). Die endogenen CD4⁺ T-Zellen der VILLIN-HA transgenen Mäuse wiesen auch keine Unterschiede in der Treg Population auf, da es sich bei dem Hemagglutinin in diesen Tieren um ein Selbstantigen handelt. HA-spezifische T-Zellen werden bei der Reifung im Thymus durch Mechanismen der zentralen Toleranz daher deletiert.

Interessanterweise zeigte die durchflusszytometrische Analyse aber einen Unterschied im prozentualen Anteil der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Darm der unterschiedlichen Versuchsgruppen. So konnten in der Lamina Propria des Kolons und den MLN der DEC-HA behandelten Mäuse signifikant geringere Frequenzen der transferierten CD4⁺ T-Zellen detektiert werden als in den Kontrollgruppen (siehe Abb. 3-17). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in einer reduzierten Migration der T_H1-Zellen in den Darm der Mäuse liegen.

Für die Migration von T-Zellen in intestinale Kompartimente sind insbesondere zwei Oberflächenrezeptoren verantwortlich: der Chemokinrezeptor CCR9 und das Integrin $\alpha\beta 7$ (Itga4), die zu den sogenannten *gut-homing* Molekülen zählen. Die entsprechenden Liganden CCL25 bzw. MAdCAM-1 werden spezifisch im Dünndarm

exprimiert und vermitteln so die Rekrutierung von T-Zellen in dieses Organ (Berlin *et al.*, 1993; Kunkel *et al.*, 2000). Kürzlich konnte zusätzlich der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR15 für die Migration von CD4⁺ T-Zellen und insbesondere von Foxp3⁺ Treg in das Kolon identifiziert werden (Kim *et al.*, 2013). Ein Kennzeichen entzündlicher Erkrankungen ist die fehlerhaft erhöhte Rekrutierung und Retention von Effektorzellen in betroffene Organe (Baumgart und Carding, 2007). Damit stellt das Wissen über die Mechanismen, die für die Migration von Effektorzellen in den Darm wichtig sind, einen potentiellen Ansatz für die Therapie solcher Erkrankungen inkl. CED dar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass durch diese Intervention tatsächlich therapeutischer Erfolg erzielt werden kann. Die Behandlung mit dem CCR9 Antagonisten CCX282-B hatte einen positiven Effekt für die Remissionserhaltung in Morbus Crohn Patienten (Keshav *et al.*, 2013). Auch die Behandlung mit Vedolizumab, einem blockierenden Antikörper gegen das $\alpha 4\beta 7$ Integrin, konnte in CED Patienten ein klinisch verbessertes Bild bewirken. Die Wirksamkeit von Vedolizumab in Kolitis ulcerosa Patienten war in diesen Studien höher als in Morbus Crohn Patienten (Feagan *et al.*, 2013; Sandborn *et al.*, 2013).

In globalen Genexpressionsanalysen der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die in DEC-HA behandelte VILLIN-HA transgene Mäuse transferiert worden waren, konnte allerdings keine differentielle Regulation der *gut-homing* Moleküle im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden (siehe Abb. 3-18 B). Interessanterweise war aber die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf den HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus DEC-HA behandelten Mäusen im Vergleich zu den PBS und ISO-HA Kontrollgruppen differentiell herunterreguliert (siehe Abb. 3-18 B, C und 3-20). Zusammen mit der Beobachtung, dass im entzündeten Kolon und Dünndarm VILLIN-HA transgener Mäuse nach Transfer HA-spezifischer CD4⁺ T_H1-Zellen die Expression der CXCR3 Liganden CXCL9 und CXCL10 stark hochreguliert war (siehe Abb. 3-19), wurde die Hypothese formuliert, dass die CXCR3-CXCL9/10-Achse in diesem Entzündungsmodell eine wichtige Rolle spielen könnte und womöglich durch das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* moduliert wird.

CXCR3 wird während der Aktivierung und Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in T_H1-Zellen auf diesen stark hochreguliert (Loetscher *et al.*, 1998). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass T_H1-Zellen durch die erhöhte Expression der CXCR3 Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 nach Infektionen oder

Entzündungsprozessen verstärkt in die betroffenen Areale migrieren und dort ihre Effektorfunktion ausüben (Liu *et al.*, 2011). In verschiedenen Studien konnte ebenfalls in entzündlichen Erkrankungen wie Typ-1 Diabetes gezeigt werden, dass die fehlerhaft erhöhte Migration von T_H1-Zellen zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen kann (Uno *et al.*, 2010). Dies verdeutlicht das Potential für eine therapeutische Intervention in diesen Signalweg für eine Reihe entzündlicher Immunreaktionen. Auch im Darm kommt der CXCR3 vermittelten Migration von T_H1-Zellen eine wichtige Rolle zu. So konnte z.B. im IL10^{-/-} Entzündungsmodell gezeigt werden, dass der Einsatz eines α -CXCL10 Antikörpers zu einer deutlich verbesserten Immunpathologie im Darm der Mäuse führt (Singh *et al.*, 2003). Funktionelle Relevanz besitzen diese Moleküle auch in humanen CED. Die Expression von CXCL10 und CXCR3 in Kolonbiopsien aus Arealen mit aktiver Entzündung von Morbus Crohn sowie von Kolitis ulcerosa Patienten ist auf mRNA Ebene gegenüber nicht entzündeten Bereichen deutlich erhöht (Ostvik *et al.*, 2013). Bemerkenswert ist, dass diese Beobachtung auch für Kolitis ulcerosa Patienten zutrifft. Im Allgemeinen zählt diese Erkrankung zu den T_H2-Zell vermittelten Entzündungen. Diese Daten legen jedoch nahe, dass CED nicht so stringent betrachtet werden sollten. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Gefrierschnitten aus dem entzündeten Kolon von Kolitis ulcerosa sowie aus dem entzündeten Kolon und Ileum von Morbus Crohn Patienten zeigte einen signifikant höheren Anteil der CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen im Vergleich zu Darmbiopsien gesunder Probanden (siehe Abb. 3-23 B). Interessanterweise war der Anteil der CXCR3⁺ T-Zellen an der gesamt CD4⁺ Population im Blut beider Patientengruppen signifikant erniedrigt (siehe Abb. 3-22). Dies deutet darauf hin, dass es während eines akuten Entzündungsschubes zur verstärkten Migration und Akkumulierung dieser Zellen aus der Peripherie in den Darm kommt. Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht postuliert und ist interessant für die therapeutische Intervention. So wäre es sinnvoll während entzündungsfreier Perioden die T-Zellen so zu modulieren, dass deren Migration in den Darm auch nach einem potentiellen Auslöser unterbunden wird.

In der Tat wird in klinischen Studien die CXCL10 vermittelte Migration von T-Zellen bereits als Therapieansatz für die Kolitis ulcerosa untersucht. In einer kürzlich veröffentlichten Phase-II Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem α -CXCL10 Antikörper BMS-936557 während eines akuten Entzündungsschubes

das klinische Bild der Entzündung in Kolitis ulcerosa Patienten signifikant verbessert (Mayer *et al.*, 2014).

Dieser Signalweg kann möglicherweise auch spezifischer durch das *Antigen-Targeting* über DEC-205 moduliert werden. Die funktionelle Analyse der reduzierten CXCR3 Expression auf HA-spezifischen T_H1-Zellen nach DEC-HA Behandlung zeigte eine drastisch reduzierte *in vitro* Migration der Zellen als Reaktion auf rekombinantes CXCL10 (siehe Abb. 3-21). Erstmals konnte so gezeigt werden, dass die Antigenbeladung und -präsentation durch DEC-205⁺ DCs die Migrationsfähigkeit antigen-spezifischer T_H1-Zellen beeinflusst.

Durch die Applikation eines chemischen CXCR3 Antagonisten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in dem untersuchten Entzündungsmodell tatsächlich die CXCR3 vermittelte Migration der T_H1-Zellen für die Entstehung der Entzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen verantwortlich ist. Die tägliche Injektion von 150 µg des CXCR3 Antagonisten Axon1800 führte nach T_H1-Zelltransfer zu einem deutlichen Schutz vor der Entzündungsinduktion in den Tieren. Dieser war charakterisiert durch ein konstantes Körpergewicht der Tiere, signifikant verbesserte Histopathologie und reduzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Darm (siehe Abb. 3-24 bis 3-26). Bemerkenswert ist, dass der Effekt sowohl im Kolon als auch im Dünndarm gleichermaßen beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu den *gut-homing* Molekülen CCR9 und α4β7, die die Migration von T-Zellen spezifisch in den Dünndarm regulieren, bietet CXCR3 in diesem Modell also die Möglichkeit der Therapie in beiden Organen. Der Grund dafür liegt möglicherweise in der ähnlich hohen Expression der CXCR3 Liganden CXCL9 und CXCL10 im entzündeten Kolon und Dünndarm VILLIN-HA transgener Mäuse (siehe Abb. 3-19).

Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte, dass die Migration der HA-spezifischen T_H1-Zellen in den Darm der VILLIN-HA transgenen Mäuse durch die Applikation des CXCR3 Antagonisten in der Tat signifikant reduziert wurde; und zwar in gleich starkem Maße wie in der DEC-HA behandelten Gruppe (siehe Abb. 3-27). Dennoch war insbesondere die Immunpathologie durch die DEC-HA Behandlung im Gegensatz zur CXCR3 Antagonist Behandlung deutlicher verbessert (siehe Abb. 3-25). Diese Beobachtung legt nahe, dass zusätzlich zur reduzierten Migration der T_H1-Zellen weitere Mechanismen existieren, die zum DEC-HA vermittelten

Schutz in diesem Modell beitragen. Für einen möglichen Einsatz als Therapieform gegen chronische Entzündungen im Darm bedarf es der näheren Untersuchung dieser Mechanismen.

Wie bereits erwähnt wird die Modulation der CXCR3 abhängigen Migration von Effektorzellen u.a. in den Darm zurzeit intensiv für die therapeutische Intervention untersucht. Erste Ergebnisse aus klinischen Studien sind vielversprechend. Allerdings ist die CXCR3-CXCL9/10-Achse in erster Linie wichtig für die korrekte Initiierung von Immunantworten gegenüber Infektionen. Ein systemischer Block dieser Achse, wie er durch Applikation eines α -CXCL10 Antikörpers erreicht wird, könnte daher die Gefahr für das Auftreten von Infektionen mit pathogenen Organismen deutlich erhöhen bzw. deren Bekämpfung erschweren (Liu *et al.*, 2011). Entsprechend wünschenswert wäre aus diesem Grund die Entwicklung von Therapeutika, die deutlich spezifischer in diesen Signalweg eingreifen. Da die DEC-205 vermittelte Beladung von DCs antigen-spezifische T-Zellantworten moduliert, bietet dieser Ansatz den großen Vorteil einer sehr spezifischen Therapiemöglichkeit.

Während in Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose oder Typ-I Diabetes die Antigenspezifität von T-Zellen relativ gut definiert ist (Hopp *et al.*, 2014), ist dies in CED nicht der Fall. Jedoch gibt es zahlreiche Hinweise aus murinen und humanen Studien, die zeigen, dass T-Zellen, die spezifisch für Antigene kommensaler Bakterien sind, Auslöser für intestinale Entzündungen sein können. Dieser Zusammenhang wird u.a. darin deutlich, dass $IL10^{-/-}$ Mäuse eine spontane Entzündung des Kolons nur dann entwickeln, wenn sie über ein normales Mikrobiom verfügen, nicht aber, wenn die Besiedlung des Darms mit kommensalen Bakterien (in sogenannten *germ-free* Mäusen) unterbunden wird (Sellon *et al.*, 1998). In entzündeten Därmen konnte hier ein T_H1 -Zell typisches Zytokinprofil identifiziert werden.

Ein konkreteres Beispiel für ein mögliches Antigen, das zu einer T-Zell vermittelten Darmentzündung führt, wurde von Cong und Kollegen postuliert. Sie konnten zeigen, dass $CD4^+$ T-Zellen aus C3H/HeJBir Mäusen einen für ein bakterielles Antigen spezifischen TZR exprimieren und in der Lage sind, eine Darmentzündung in SCID Mäusen zu induzieren (Cong *et al.*, 1998). In einer weiteren Arbeiten zeigte sich, dass im Serum von C3H/HeJBir Mäusen Antikörper gegen das Flagellin CBir1

detektiert werden können (Lodes *et al.*, 2004). Interessanterweise wurden in dieser Arbeit auch Antikörper gegen CBir1 im Serum von Morbus Crohn Patienten aber nicht im Serum von gesunden Spendern gefunden, was auf eine Rolle dieser bakteriellen Komponente bei der Entwicklung von CED schließen lässt. Bei Flagellinen handelt es sich um eine Familie von Strukturproteinen, die von der Mehrzahl kommensaler Bakterienspezies im Darm exprimiert wird und für deren Motilität wichtig ist (Winstanley und Morgan, 1997). In einer Arbeit von Shen und Kollegen konnte später gezeigt werden, dass auch CD4⁺ T-Zellen aus Morbus Crohn Patienten spezifisch für CBir1 sind (Shen *et al.*, 2008). Diese proliferierten und zeigten durch hohe IFN- γ -Expression einen T_H1-Zell Phänotyp nach Stimulation mit dem CBir1 Protein. So konnte erstmals ein konkretes Antigen identifiziert werden, das in intestinalen Entzündungen von CD4⁺ T-Zellen erkannt wird und eine Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankungen spielt.

Darüber hinaus konnte die Beteiligung weiterer bakterieller Antigene aus der kommensalen Darmflora auch für die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen dargelegt werden. Duchmann und Kollegen isolierten insgesamt 210 T-Zell Klone aus drei CED Patienten mit aktivem Entzündungsschub. Die Stimulation einiger dieser Klone mit Lysaten, die aus einzelnen Stämmen kommensaler Bakterien gewonnen wurden, führte zu deren Proliferation (Duchmann *et al.*, 1999). Allerdings ist die genaue Spezifität dieser T-Zellen nicht bekannt.

Insgesamt wird deutlich, dass für potentielle Therapieansätze zur Behandlung von CED die Identifizierung weiterer Antigene mit immunogenem Potential notwendig ist. In Bezug auf das *Antigen-Targeting* über DEC-205 als möglichen Therapieansatz für die Behandlung von CED ist mit CBir1 bereits heute ein vielversprechendes Antigen bekannt. Zusätzlich dazu bietet dieser Weg aber auch den Vorteil, dass eine Kombination verschiedener Antigene an einen α -DEC-205 Antikörper konjugiert werden können und so die Immunantwort gegenüber mehrere Antigene gleichzeitig moduliert werden könnte.

Nach Stimulation von C-Typ Lektin Rezeptoren, zu denen auch DEC-205 gehört, kann neben der Expression pro-inflammatorischer Zytokine auch die erhöhte Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 beobachtet werden (Kerrigan und Brown, 2011). Als erstes Beispiel dafür wurde Dectin-1 identifiziert, das nach Stimulation mit einem entsprechenden Liganden in DCs zur erhöhten Sekretion von

IL-10 führt und als Resultat Toleranz gegenüber Effektor-T-Zellen vermitteln kann (Dillon *et al.*, 2006). Kürzlich konnte erstmals auch eine erhöhte Expression von IL-10 durch DCs nach Stimulation des DEC-205 Rezeptors gezeigt werden (Ring *et al.*, 2013). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. DCs, die *in vivo* mit DEC-HA beladen wurden, wiesen eine signifikant erhöhte IL-10 Expression im Vergleich zu Kontrollgruppen auf (siehe Abb. 3.28). Diese Daten legen nahe, dass DEC-205 vermitteltes *Antigen-Targeting* nicht ausschließlich zur effizienten Antigenpräsentation führt, sondern zusätzlich durch die Expression von IL-10 und möglicherweise weiterer anti-inflammatorischer Mediatoren immunmodulierend auf eine T-Zellantwort wirken kann.

IL-10 spielt bei der intestinalen Homöostase eine zentrale Rolle. Mäuse mit einer Genmutation im IL-10-Gen sind nicht in der Lage, das immunologische Gleichgewicht im Darm aufrechtzuerhalten und entwickeln wenige Monate nach Geburt eine chronische Kolitis (Kuhn *et al.*, 1993). Auch im Menschen konnten Mutationen im IL-10-Gen in Zusammenhang mit der Entstehung sowohl von Morbus Crohn als auch von Kolitis ulcerosa gebracht werden (Franke *et al.*, 2008; van der Linde *et al.*, 2003). Im Darm wird IL-10 hauptsächlich von Treg und unreifen APCs wie DCs sekretiert und kann seine Funktion über verschiedene Mechanismen ausüben. So kann das Zytokin z.B. direkten Einfluss auf DCs haben, indem es die Reifung der Zellen unterbindet oder die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 oder TNF- α hemmt (Bhattacharyya *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 1996). Auch für zahlreiche weitere Zelltypen wie IECs, Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen und B-Zellen sind anti-inflammatorische Effekte beschrieben, die durch IL-10 vermittelt werden (Paul *et al.*, 2012). Der Effekt von IL-10 auf Effektor-T-Zellen scheint in erster Linie indirekt über die beschriebene Modulation von APCs vermittelt zu werden. Direkte IL-10 Interaktionen mit Effektor-T-Zellen konnten bisher kaum nachgewiesen werden, möglicherweise weil der IL-10-Rezeptor auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen herunterreguliert wird (Liu *et al.*, 1994). Dennoch konnten Naundorf und Kollegen zeigen, dass rekombinantes IL-10 auch in Abwesenheit von APCs die IFN- γ Expression von antigen-erfahrenen Gedächtnis-T-Zellen hemmen kann, was für einen direkten Effekt des Zytokins spricht (Naundorf *et al.*, 2009). In einer interessanten Arbeit von Huss und Kollegen wurde gezeigt, dass die Aktivität differenzierter T_H1-Zellen durch TGF- β erhöht werden kann, dies aber gleichzeitig dazu führt, dass vermehrt IL-10 durch diese Zellen sekretiert wird. Das IL-10 bewirkt

direkt eine Autoregulation der T_H1-Zellen, was sich darin äußert, dass die Zellen das Potential verlieren eine Entzündung des Zentralnervensystems in Mäusen auszulösen (Huss *et al.*, 2010).

Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass IL-10 ein sehr potentes Zytokin für die Modulation von Immunantworten ist. Speziell in Bezug auf differenzierte T_H1-Zellen ist die Untersuchung der IL-10 Funktionen jedoch noch nicht abgeschlossen. So existieren beispielsweise keinerlei Daten darüber, ob IL-10 Einfluss auf die Migration von Effektor-T-Zellen hat.

Aufgrund der Beobachtung, dass es nach DEC-HA Applikation zur erhöhten Sekretion von IL-10 durch DCs kommt (siehe Abb. 3-28), wurde untersucht ob dieses Zytokin für die reduzierte Migration verantwortlich ist, die in T_H1-Zellen aus DEC-HA behandelten Mäusen beobachtet wurde (siehe Abb. 3-21). In der Tat war die verminderte *in vitro* Migration DEC-HA behandelter T_H1-Zellen durch *in vivo* Neutralisierung von IL-10 vollständig aufgehoben (siehe Abb. 3-29). Erstmals konnte so nachgewiesen werden, dass zusätzlich zu den vielen immunmodulatorischen Funktionen auch die Migration differenzierter T_H1-Zellen durch IL-10 beeinflusst wird. Diese Beobachtungen wurden eindrucksvoll im Entzündungsmodell in VILLIN-HA transgenen Mäusen bestätigt. Durch die Applikation eines neutralisierenden α -IL-10 Antikörpers wurde der DEC-HA vermittelte Schutz nach Transfer HA-spezifischer T_H1-Zellen nahezu vollständig aufgehoben. So wiesen die α -IL-10 behandelten Tiere trotz vorausgegangener DEC-HA Applikation einen erhöhten Gewichtsverlust, verstärkte Histopathologie sowie höhere IFN- γ Expression im Darm auf (siehe Abb. 3-31 bis 3-33). Entscheidend für den IL-10 vermittelten Mechanismus war in diesen Experimenten, dass in der Lamina Propria des Kolons und den MLN dieser Mäuse ein erhöhter Anteil HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnte. Die Applikation des α -IL-10 Antikörpers in den Kontrollmäusen hatte keinen Einfluss auf den Schweregrad der Entzündung.

Durch die Beobachtungen aus diesen Experimenten lässt sich ein neuer Mechanismus postulieren, der durch IL-10 vermittelt wird. Bisher wurde der Zusammenhang zwischen diesem Zytokin und der Migration von T_H1-Zellen nicht beschrieben. Ob es sich hierbei um einen direkten Effekt von IL-10 auf T_H1-Zellen handelt oder ob er über andere Zellen des Immunsystems wie z.B. DCs vermittelt wird, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch ist noch nicht klar, ob die Restimulation

des TZR der T_H1-Zellen durch DCs dafür notwendig ist; ebenso wenig, ob es durch die Antigenbeladung über DEC-205 zur Modulation weiterer Signalwege innerhalb der DCs kommt, die möglicherweise Einfluss auf den beobachteten Phänotyp der T_H1-Zellen haben.

In den vergangenen Jahren wurde das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* in vielen Studien als potentieller Ansatz für die Induktion antigen-spezifischer T-Zell-Toleranz postuliert. Die beschriebenen Mechanismen (wie z.B. die Induktion von Treg) werden in verschiedensten Organen vermittelt und scheinen somit systemisch zu funktionieren. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit im zuerst untersuchten Darmentzündungsmodell in VILLIN-HA transgenen Mäusen durch die Treg-Induktion bestätigt werden (siehe Kapitel 2.3.2).

Die reduzierte Migration der Effektorzellen im T_H1-Zell vermittelten Entzündungsmodell wurde im Zusammenhang mit der Antigenbeladung über DEC-205 jedoch noch nicht beschrieben. Ein Hinweis darauf, dass auch dieser Mechanismus systemisch vermittelt wird, ist die verringerte *in vitro* Migration antigen-spezifischer T_H1-Zellen nach DEC-HA Behandlung (siehe Abb. 3-21). Diese Beobachtung war unabhängig vom Vorliegen einer Entzündung, da für diese Experimente naive BALB/c Mäuse für die Antigenbeladung eingesetzt wurden.

Zusätzlich zum Darm sollte der Nutzen dieses Ansatzes in einem weiteren Entzündungsmodell überprüft werden. Dafür wurden HA-spezifische T_H1-Zellen analog zum VILLIN-HA Modell adoptiv in SPC-HA transgene Mäuse transferiert, die das Modellantigen Hemagglutinin unter dem Alveolarepithelzell-spezifischen Promotor *surfactant protein C* exprimieren. Auch hier war ein starker Gewichtsverlust der Tiere zu beobachten, der mit einer massiven Histopathologie der Lungen einherging (siehe Abb. 3-35). Somit weist dieses Modell Parallelen mit der humanen chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) auf. Neben der ähnlichen Pathologie in der Lunge, gibt es auch für COPD deutliche Hinweise für die Beteiligung antigen-spezifischer T_H1-Zellen (Lee *et al.*, 2007).

Die Applikation sowohl von DEC-HA als auch eines CXCR3 Antagonisten lieferte in diesem Modell keine eindeutigen Resultate. Zwar waren SPC-HA transgene Mäuse in Bezug auf das Körpergewicht durch beide Behandlungsansätze geschützt (siehe

Abb. 3-35), jedoch zeigte die Analyse der IFN- γ - und TNF- α -Expression in den Lungen nur ein tendenziell verbessertes Bild im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (siehe Abb. 3-37). Entscheidender war die histopathologische Analyse der Lungen, die in allen drei Versuchsgruppen eine gleichermaßen starke Entzündung aufwies (siehe Abb. 3-36). Die Möglichkeit, dass die CXCR3-CXCL9/10-Achse in diesem Modell keine Rolle spielt, konnte ausgeschlossen werden, da in den entzündeten Lungen der SPC-HA transgenen Mäuse die Expression von CXCL9 und CXCL10 stark erhöht war (siehe Abb. 3-38). Interessanterweise war die Migration der HA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in die Lunge nach DEC-HA Behandlung signifikant gegenüber der PBS behandelten Gruppe jedoch reduziert. Nach CXCR3 Applikation konnte hier nur eine leichte Reduktion beobachtet werden (siehe Abb. 3-39).

Es lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend feststellen, ob das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* auch im Lungenentzündungsmodell einen protektiven Effekt hat. Da es sich um ein neu etabliertes Mausmodell handelt, ist es notwendig weitere Analysen durchzuführen und das Modell genauer zu charakterisieren. Es ist z.B. denkbar, dass für die Induktion der Entzündung schon eine deutlich geringere Zahl HA-spezifischer T_H1-Zellen ausreichend ist als in diesen Experimenten transferiert wurden. Daher könnte ein möglicher Schutz in den durchgeführten Experimenten nicht festgestellt worden sein. Dennoch konnten in den Lungen der DEC-HA behandelten Tiere signifikant geringere Anteile HA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen detektiert werden, so dass der Mechanismus der reduzierten T-Zellmigration prinzipiell auch in diesem Organ zu funktionieren scheint. Da durch die Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten jedoch keine so deutliche Reduktion der Migration detektiert werden konnte, ist es möglich, dass durch die DEC-205 vermittelte Antigenbeladung weitere Mechanismen vermittelt werden, die zu dem beobachteten Ergebnis führen.

Beruhend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist Abbildung 4-1 schematisch dargestellt, wie durch das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* potentiell immunologische Toleranz gegenüber CD4⁺ T-Zellen induziert werden kann. Nach der Bindung eines α -DEC-205-Antigen-Konjugates an DEC-205 auf der Oberfläche unreifer DCs kommt es zur effizienten Internalisierung des Antigens und seiner Assoziation an MHC-II Moleküle in endosomalen Kompartimenten. Die MHC-II-Antigen-Komplexe werden auf der Oberfläche der DCs naiven, antigen-

spezifischen CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Diese erkennen das Antigen über den TZR und werden in suppressive Foxp3⁺ Treg konvertiert. Durch die Bindung des α-DEC-205-Antigen-Konjugates kommt es außerdem über einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Induktion des IL-10 Gens (und möglicherweise weiterer Gene) und somit zur erhöhten Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch die DCs. Die erhöhte IL-10-Expression bewirkt die Herunterregulation des Chemokinrezeptors CXCR3 auf T_H1-Zellen und so zur Verminderung der Migration der Zellen in entzündetes Gewebe, in denen entsprechende Liganden (z.B. CXCL10) stark exprimiert werden. Dadurch wird die Immunantwort der T_H1-Zellen unterbunden. Ob dies ein direkter von IL-10 vermittelter Mechanismus ist oder weitere Immunzellen involviert sind, ist unklar. Auch ist unklar, ob für diesen Prozess die Erkennung des Antigens durch den TZR der T_H1-Zelle notwendig ist.

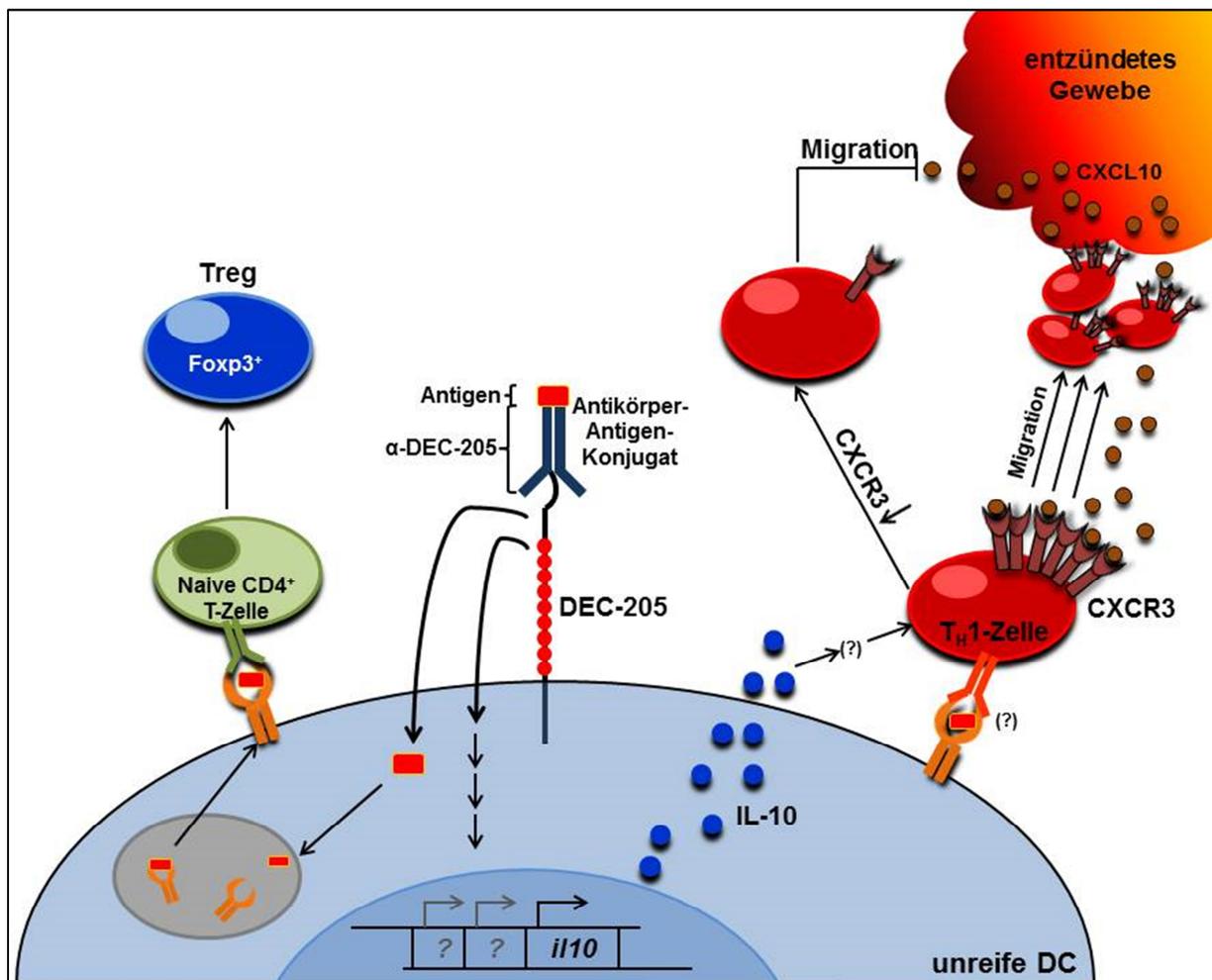


Abbildung 4-1. Mechanismen der Toleranzinduktion gegenüber antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durch DEC-205 vermitteltes *Antigen-Targeting*.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das *Antigen-Targeting* über DEC-205 ein vielversprechendes Werkzeug für die Induktion von T-Zell-Toleranz und somit für die Vermeidung unerwünschter Immunantworten darstellt. Wie in der vorliegenden und weiteren Arbeiten gezeigt werden konnte, kann dieser Ansatz variabel für verschiedene Organe eingesetzt werden. Der große Vorteil liegt dabei in der Vermittlung antigen-spezifischer Toleranz, wodurch wenig oder kaum in Immunantworten gegenüber Pathogenen eingegriffen wird. Darüber hinaus sind Antikörper-Antigen-Konjugate kostengünstig und flexibel produzierbar. Daraus ergibt sich eine große Bandbreite dieser Methode für mögliche Anwendungen. Entscheidend wird sein, ob die Effekte, die in Mausstudien belegt wurden, auch auf das humane Immunsystem übertragbar sind. Studien mit humanen DCs zeigen, dass die Antigenbeladung *in vitro* über DEC-205 ähnlich effizient funktioniert wie im murinen System und zur Antigenpräsentation entsprechender Antigene führt (Birkholz *et al.*, 2010). Darüber hinaus wurde kürzlich in einer ersten Phase-I Studie dieser Art gezeigt, dass die *in vivo* Anwendung mit α -DEC-205-Antigen-Konjugaten im Menschen sicher und gut verträglich ist (Dhodapkar *et al.*, 2014). Zwar wurde hier durch die gleichzeitige Applikation eines TLR-Liganden antigen-spezifische Immunität anstatt Toleranz induziert, dennoch wird so das Potential dieses Ansatzes für die Anwendung in humanen Entzündungserkrankungen deutlich.

5 Zusammenfassung

Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa sind zwei die Hauptformen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) im Menschen. Für die Behandlung von CED sind derzeit nur wenige Therapieansätze verfügbar. Die wirksamste Therapieform stellt die Behandlung mit anti-TNF- α Antikörpern dar, allerdings geht dieser Ansatz mit starken Nebenwirkungen einher und führt bei einem Großteil der Patienten nicht zur Verbesserung des klinischen Bildes. Aus diesen Gründen ist es notwendig, neue und spezifischere Therapieansätze für CED zu entwickeln.

Der immunologische Toleranzverlust gegenüber Nahrungsantigenen und / oder Antigenen kommensaler Bakterien scheint ein Auslöser für die Entwicklung von CED zu sein. Daher ist ein vielversprechender Ansatz für die Unterbindung dieser Entzündungsprozesse die Induktion immunologischer Toleranz im Darm. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die spezifische Antigenbeladung unreifer dendritischer Zellen (DCs) über den Oberflächenrezeptor DEC-205 zur Toleranzvermittlung u.a. über die Induktion Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen (Treg) und damit zur Unterbindung von Entzündungsprozessen in verschiedenen Mausmodellen führt. Ob dieser Ansatz auch für die Toleranzinduktion im Darm genutzt werden kann, ist unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das *Antigen-Targeting* über DEC-205 zur effizienten Konversion naiver, antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in Foxp3⁺ Treg im Darm führt. Bemerkenswerterweise konnte über diesen Ansatz die Induktion intestinaler Entzündung in einem neu etablierten Mausmodell unterdrückt werden.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die DEC-205 vermittelte Antigenbeladung zur Modulation der Migration differenzierter, antigen-spezifischer T_H1-Zellen führt, die eine wichtige Rolle bei humanen CED spielen. Dieser Ansatz führte in einem T_H1-Zell vermittelten Darmentzündungsmodell durch die reduzierte Migration der Effektorzellen in den Darm zu einem deutlichen Schutz vor der Entzündung. Interessanterweise konnte durch das DEC-205 vermittelte *Antigen-Targeting* eine verminderte Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf

den T_H1-Zellen beobachtet werden, was zu einer reduzierten Migration der Zellen in den Darm führte. In weiteren Analysen, in denen der Mechanismus hinter diesen Beobachtungen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass es nach *Antigen-Targeting* über DEC-205 zu einer verstärkten IL-10-Sekretion durch unreife DCs kommt. Bemerkenswerterweise führte die erhöhte IL-10-Expression zur direkten Einschränkung der T_H1-Zellmigration in den Darm, da die *in vivo* Neutralisierung von IL-10 die Aufhebung des DEC-205 vermittelten Schutzes im untersuchten Entzündungsmodell zur Folge hatte.

Die Analyse von humanen CED Proben ergab, dass der prozentuale Anteil von CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen im Blut der Patienten reduziert, in der entzündeten Darmmukosa allerdings stark erhöht ist. Dies deutet auf eine verstärkte Migration von CD4⁺CXCR3⁺ T-Zellen während eines akuten Entzündungsschubes aus der Peripherie in die intestinale Mukosa hin. Interessanterweise wird der systemische Block der Effektorzellmigration derzeit in klinischen Studien als therapeutischer Ansatz für die Behandlung humaner CED untersucht.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass das *Antigen-Targeting* über DEC-205 zu einem deutlichen Schutz vor intestinaler Entzündung führt. Dieser Schutz wird durch die Modulation der CXCR3-abhängigen Migration von T_H1-Zellen in den Darm vermittelt, so dass ein neuer, hochspezifischer Ansatz für die Behandlung von CED identifiziert werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde erstmals gezeigt, dass IL-10 in der Lage ist das Migrationsverhalten von Effektorzellen in Entzündungsherde zu beeinflussen und u.a. auf diese Weise anti-inflammatorische Funktionen ausübt.

6 Summary

Crohn's disease and ulcerative colitis are the two major types of inflammatory bowel disease (IBD) in humans. Therapeutic options for IBD to date are rare with anti-TNF- α medication being most efficacious. However, accompanied by side effects and a significant fraction of non-responders there is need for new, more specific therapies for IBD.

The loss of tolerance towards commensal gut bacteria and / or food antigens seems to be an initial event for the manifestation of disease. Therefore, a promising approach for the prevention of IBD is the induction of tolerance in the gut. Antigen-targeting to DEC-205 on immature dendritic cells (DCs) was reported to induce tolerance in different experimental disease settings, i.e. by the induction of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg). However, whether this approach is sufficient to also induce tolerance in the intestine is currently unknown.

In the present study it was demonstrated for the first time that antigen-targeting to DEC-205 leads to the efficient conversion of naive, antigen-specific CD4⁺ T cells into Foxp3⁺ Treg in the gut. Remarkably, this approach resulted in a significant amelioration of disease in a newly established mouse model of intestinal inflammation.

More important, this study provides evidence that targeting antigens to DEC-205 leads to the interference with migratory properties of fully differentiated, antigen-specific T_H1 effector cells, some of the key mediators of human IBD. In a T_H1-cell-mediated mouse model of intestinal inflammation DEC-205-mediated antigen-targeting led to the prevention of inflammation via the reduced migration of T_H1 cells into intestinal compartments. Further experiments revealed that the chemokine receptor CXCR3 was down-regulated on T_H1 cells with this approach, thereby limiting recruitment of the effector cells into the gut. Further investigations on the mechanism behind these observations showed that antigen-targeting to DEC-205 induces high secretion of anti-inflammatory IL-10 by immature DCs. Strikingly, IL-10 directly interfered with migratory properties of T_H1 cells as the *in vivo* neutralization of IL-10 abolished the protective effect of antigen-targeting to DEC-205 in the examined inflammation model by the significant reduction of T_H1 cell migration to the gut.

Moreover, analysis of human IBD samples revealed a reduced percentage of CD4⁺CXCR3⁺ T cells in peripheral blood but increased numbers of these cells in the inflamed mucosa suggesting a preferential migration of CD4⁺CXCR3⁺ T cells from the periphery to the intestinal mucosa during acute inflammation. Interestingly, the systemic block of effector cell migration to the gut is currently under investigation in clinical trials as therapeutic approach for IBD.

In summary, the results from the present study clearly show that antigen-targeting to DEC-205 significantly reduces inflammation of the gut in different inflammatory settings. Protection from inflammation was achieved through the impairment of CXCR3-dependent T_H1 effector cell migration to the gut, providing a novel, highly specific therapeutic approach for IBD. Importantly, it could be demonstrated for the first time that IL-10 is capable of interfering with migratory abilities of effector T cells to sites of inflammation, thereby mediating its anti-inflammatory properties.

7 Literaturverzeichnis

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10, 131-144.

Agnello, D., Lankford, C.S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J.J., and Frucht, D.M. (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *Journal of clinical immunology* 23, 147-161.

Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha(v)beta(5) and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1359-1368.

Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine* 199, 1401-1408.

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8, 411-420.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.T., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-+.

Baumgart, D.C., and Carding, S.R. (2007). Gastroenterology 1 - Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627-1640.

Baumgart, D.C., Metzke, D., Schmitz, J., Scheffold, A., Sturm, A., Wiedenmann, B., and Dignass, A.U. (2005). Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 54, 228-236.

Baumgart, D.C., Metzke, D., Wiedenmann, B., and Dignass, A.U. (2004). Activated dendritic cells are significantly increased in inflamed intestinal mucosa of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 126, A159-A159.

Baumgart, D.C., Olivier, W.A., Reya, T., Peritt, D., Rombeau, J.L., and Carding, S.R. (1998). Mechanisms of intestinal epithelial cell injury and colitis in interleukin 2 (IL2)-deficient mice. *Cell Immunol* 187, 52-66.

Bell, S.J., Rigby, R., English, N., Mann, S.D., Knight, S.C., Kamm, M.A., and Stagg, A.J. (2001). Migration and maturation of human colonic dendritic cells. *Journal of immunology* 166, 4958-4967.

Berg, D.J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., ThompsonSnipes, L., Leach, M.W., and Rennick, D. (1996). Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 98, 1010-1020.

Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993). Alpha 4 beta 7 integrin

mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* *74*, 185-195.

Bhattacharyya, S., Sen, P., Wallet, M., Long, B., Baldwin, A.S., Jr., and Tisch, R. (2004). Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I κ B kinase activity. *Blood* *104*, 1100-1109.

Birkholz, K., Schwenkert, M., Kellner, C., Gross, S., Fey, G., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Schaft, N., and Dorrie, J. (2010). Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood* *116*, 2277-2285.

Boirivant, M., Fuss, I.J., Chu, A., and Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *Journal of Experimental Medicine* *188*, 1929-1939.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8(+) T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* *196*, 1627-1638.

Bosma, G.C., Custer, R.P., and Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* *301*, 527-530.

Braegger, C.P., Nicholls, S., Murch, S.H., Stephens, S., and Macdonald, T.T. (1992). Tumor-Necrosis-Factor-Alpha in Stool as a Marker of Intestinal Inflammation. *Lancet* *339*, 89-91.

Brandwein, S.L., McCabe, R.P., Cong, Y.Z., Waites, K.B., Ridwan, B.U., Dean, P.A., Ohkusa, T., Birkenmeier, E.H., Sundberg, J.P., and Elson, C.O. (1997). Spontaneously colitic C3H/HeJBir mice demonstrate selective antibody reactivity to antigens of the enteric bacterial flora. *Journal of immunology* *159*, 44-52.

Bridger, S., Lee, J.C.W., Bjarnason, I., Jones, J.E.L., and Macpherson, A.J. (2002). In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* *51*, 21-25.

Bruder, D., Westendorf, A.M., Geffers, R., Gruber, A.D., Gereke, M., Enelow, R.I., and Buer, J. (2004). CD4 T lymphocyte-mediated lung disease - Steady state between pathological and tolerogenic immune reactions. *Am J Resp Crit Care* *170*, 1145-1152.

Bruder, D., Westendorf, A.M., Hansen, W., Prettin, S., Gruber, A.D., Qian, Y.J., von Boehmer, H., Mahnke, K., and Buer, J. (2005). On the edge of Autoimmunity - T-cell stimulation by steady-state dendritic cells prevents autoimmune diabetes. *Diabetes* *54*, 3395-3401.

- Caretto, D., Katzman, S.D., Villarino, A.V., Gallo, E., and Abbas, A.K. (2010). Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *Journal of immunology* *184*, 30-34.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., Vaure, C., Chemin, K., Dieu-Nosjean, M.C., and Vicari, A. (2002). Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* *73*, S7-11.
- Cederbom, L., Hall, H., and Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology* *30*, 1538-1543.
- Chatila, T.A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H.M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., and Bowcock, A.M. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* *106*, R75-81.
- Cong, Y., Brandwein, S.L., McCabe, R.P., Lazenby, A., Birkenmeier, E.H., Sundberg, J.P., and Elson, C.O. (1998). CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *The Journal of experimental medicine* *187*, 855-864.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1757-1764.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N.S., Shah, R.S., and Sedergran, D.J. (1993). Clinicopathological Study of Dextran Sulfate Sodium Experimental Murine Colitis. *Lab Invest* *69*, 238-249.
- Critchfield, J.M., Racke, M.K., Zuniga-Pflucker, J.C., Cannella, B., Raine, C.S., Goverman, J., and Lenardo, M.J. (1994). T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* *263*, 1139-1143.
- Cruickshank, S.M., McVay, L.D., Baumgart, D.C., Felsburg, P.J., and Carding, S.R. (2004). Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* *53*, 678-684.
- Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* *30*, 626-635.
- Curtis, J.R., Patkar, N., Xie, A.Y., Martin, C., Allison, J.J., Saag, M., Shatin, D., and Saag, K.G. (2007). Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists. *Arthritis and rheumatism* *56*, 1125-1133.
- Danese, S., and Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *The New England journal of medicine* *365*, 1713-1725.

- den Haan, J.M.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192, 1685-1695.
- Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8, 1086-1094.
- Dhodapkar, M.V., Sznol, M., Zhao, B., Wang, D., Carvajal, R.D., Keohan, M.L., Chuang, E., Sanborn, R.E., Lutzky, J., Powderly, J., *et al.* (2014). Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Science translational medicine* 6, 232ra251.
- Dieleman, L.A., Palmen, M.J.H.J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A.S., Meuwissen, S.G.M., and van Rees, E.P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114, 385-391.
- Dieleman, L.A., Ridwan, B.U., Tennyson, G.S., Beagley, K.W., Bucy, R.P., and Elson, C.O. (1994). Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Occurs in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Gastroenterology* 107, 1643-1652.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasproicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., *et al.* (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116, 916-928.
- Duchmann, R., May, E., Heike, M., Knolle, P., Neurath, M., and Meyer zum Buschenfelde, K.H. (1999). T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut* 44, 812-818.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-1638.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., and Adami, H.O. (1990). Increased Risk of Large-Bowel Cancer in Crohns-Disease with Colonic Involvement. *Lancet* 336, 357-359.
- Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Sands, B.E., Hanauer, S., Colombel, J.F., Sandborn, W.J., Van Assche, G., Axler, J., Kim, H.J., Danese, S., *et al.* (2013). Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *The New England journal of medicine* 369, 699-710.
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2, 77-84.
- Fiocchi, C. (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol-Gastr L* 273, G769-G775.

- Fisher, S.A., Tremelling, M., Anderson, C.A., Gwilliam, R., Bumpstead, S., Prescott, N.J., Nimmo, E.R., Massey, D., Berzuini, C., Johnson, C., *et al.* (2008). Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature genetics* *40*, 710-712.
- Fleissner, D., Hansen, W., Geffers, R., Buer, J., and Westendorf, A.M. (2010). Local induction of immunosuppressive CD8+ T cells in the gut-associated lymphoid tissues. *PLoS one* *5*, e15373.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* *22*, 329-341.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Deviere, J., *et al.* (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* *53*, 987-992.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., *et al.* (2008). Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nature genetics* *40*, 1319-1323.
- Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., *et al.* (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics* *42*, 1118-+.
- Fujimoto, K., Karuppuchamy, T., Takemura, N., Shimohigoshi, M., Machida, T., Haseda, Y., Aoshi, T., Ishii, K.J., Akira, S., and Uematsu, S. (2011). A new subset of CD103+CD8alpha+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *Journal of immunology* *186*, 6287-6295.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., *et al.* (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* *113*, 1490-1497.
- Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., de la Motte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996a). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of immunology* *157*, 1261-1270.

- Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J.S., delaMotte, C., Strong, S.A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996b). Disparate CD4(+) lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease - Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of immunology* *157*, 1261-1270.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* *104*, 2840-2848.
- Gurtner, G.J., Newberry, R.D., Schloemann, S.R., McDonald, K.G., and Stenson, W.F. (2003). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* *125*, 1762-1773.
- Hanauer, S.B., Feagan, B.G., Lichtenstein, G.R., Mayer, L.F., Schreiber, S., Colombel, J.F., Rachmilewitz, D., Wolf, D.C., Olson, A., Bao, W.H., *et al.* (2002). Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* *359*, 1541-1549.
- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L.M., Truong, N., Williams, C.B., and Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *Journal of immunology* *178*, 2961-2972.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *Journal of Experimental Medicine* *194*, 769-779.
- Hawiger, D., Masilamani, R.F., Bettelli, E., Kuchroo, V.K., and Nussenzweig, M.C. (2004). Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* *20*, 695-705.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Burgel, N., Fromm, M., *et al.* (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* *129*, 550-564.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R.M., Romani, N., and Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *European journal of immunology* *26*, 659-668.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* *10*, 159-169.
- Hopp, A.K., Rupp, A., and Lukacs-Kornek, V. (2014). Self-Antigen Presentation by Dendritic Cells in Autoimmunity. *Frontiers in immunology* *5*, 55.
- Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, A., James, R.F., Lernmark, A., Pujol-Borrell, R., Rabinovitch, A., Somoza, N., and Stewart, T.A. (1995). Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* *44*, 658-664.

- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Jr., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., *et al.* (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* *34*, 554-565.
- Huss, D.J., Winger, R.C., Peng, H., Yang, Y., Racke, M.K., and Lovett-Racke, A.E. (2010). TGF-beta enhances effector Th1 cell activation but promotes self-regulation via IL-10. *Journal of immunology* *184*, 5628-5636.
- Idoyaga, J., Lubkin, A., Fiorese, C., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Huang, Y., Rodriguez, A., Clausen, B.E., Park, C.G., Trumppfeller, C., *et al.* (2011). Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 2384-2389.
- Inaba, K., Swiggard, W.J., Inaba, M., Meltzer, J., Mirza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (1995). Tissue Distribution of the Dec-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal-Antibody N1dc-145 .1. Expression on Dendritic Cells and Other Subsets of Mouse Leukocytes. *Cell Immunol* *163*, 148-156.
- Ivanov, I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* *126*, 1121-1133.
- Jager, A., and Kuchroo, V.K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian journal of immunology* *72*, 173-184.
- Janeway, C.A., Jr., and Bottomly, K. (1994). Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* *76*, 275-285.
- Jenkins, M.K., and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* *165*, 302-319.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1213-1222.
- Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology today* *20*, 561-567.
- Kamradt, T., and Mitchison, N.A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *The New England journal of medicine* *344*, 655-664.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends in immunology* *32*, 151-156.
- Keshav, S., Vanasek, T., Niv, Y., Petryka, R., Howaldt, S., Bafutto, M., Racz, I., Hetzel, D., Nielsen, O.H., Vermeire, S., *et al.* (2013). A randomized controlled trial of

the efficacy and safety of CCX282-B, an orally-administered blocker of chemokine receptor CCR9, for patients with Crohn's disease. *PLoS one* 8, e60094.

Kim, S.V., Xiang, W.V., Kwak, C., Yang, Y., Lin, X.W., Ota, M., Sarpel, U., Rifkin, D.B., Xu, R., and Littman, D.R. (2013). GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science* 340, 1456-1459.

Kirberg, J., Baron, A., Jakob, S., Rolink, A., Karjalainen, K., and Vonboehmer, H. (1994). Thymic Selection of Cd8+ Single Positive Cells with a Class-II Major Histocompatibility Complex-Restricted Receptor. *Journal of Experimental Medicine* 180, 25-34.

Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A.Y., Ossendorp, F., Melief, C.J., Stoorvogel, W., *et al.* (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 155, 53-63.

Knuschke, T., Sokolova, V., Rotan, O., Wadwa, M., Tenbusch, M., Hansen, W., Staeheli, P., Epple, M., Buer, J., and Westendorf, A.M. (2013). Immunization with biodegradable nanoparticles efficiently induces cellular immunity and protects against influenza virus infection. *Journal of immunology* 190, 6221-6229.

Koboziev, I., Karlsson, F., and Grisham, M.B. (2010). Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1207 Suppl 1, E86-93.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of experimental medicine* 184, 741-746.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6, 1219-1227.

Kronin, V., Wu, L., Gong, S.C., Nussenzweig, M.C., and Shortman, K. (2000). DEC-205 as a marker of dendritic cells with regulatory effects on CD8 T cell responses. *Int Immunol* 12, 731-735.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.

Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Vierra, M.A., Goodman, S.B., Genovese, M.C., *et al.* (2000). Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *The Journal of experimental medicine* 192, 761-768.

- Kweon, M.N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M.H., Suenobu, N., and Kiyono, H. (2002). Development of anti en induced colitis in SCID mice reconstituted with spleen derived memory type CD4(+) CD45RB(+) T cells. *Gut* 50, 299-306.
- Lahoud, M.H., Ahmet, F., Zhang, J.G., Meuter, S., Policheni, A.N., Kitsoulis, S., Lee, C.N., O'Keeffe, M., Sullivan, L.C., Brooks, A.G., *et al.* (2012). DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 16270-16275.
- Leach, M.W., Bean, A.G.D., Mauze, S., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1996). Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB(high) subset of CD4(+) T cells. *Am J Pathol* 148, 1503-1515.
- Lee, S.H., Goswami, S., Grudo, A., Song, L.Z., Bandi, V., Goodnight-White, S., Green, L., Hacken-Bitar, J., Huh, J., Bakaeen, F., *et al.* (2007). Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nature medicine* 13, 567-569.
- Liu, H., Hu, B., Xu, D., and Liew, F.Y. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *Journal of immunology* 171, 5012-5017.
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J.M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N.O., and Stiles, J.K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & growth factor reviews* 22, 121-130.
- Liu, Y., Wei, S.H., Ho, A.S., de Waal Malefyt, R., and Moore, K.W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *Journal of immunology* 152, 1821-1829.
- Lodes, M.J., Cong, Y., Elson, C.O., Mohamath, R., Landers, C.J., Targan, S.R., Fort, M., and Hershberg, R.M. (2004). Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 113, 1296-1306.
- Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., and Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *European journal of immunology* 28, 3696-3705.
- Loftus, E.V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504-1517.
- Lu, L., Wang, J., Zhang, F., Chai, Y., Brand, D., Wang, X., Horwitz, D.A., Shi, W., and Zheng, S.G. (2010). Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *Journal of immunology* 184, 4295-4306.
- Lutz, M.B., and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology* 23, 445-449.
- Macpherson, A.J., and Smith, K. (2006). Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *The Journal of experimental medicine* 203, 497-500.

- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., and Steinman, R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151, 673-683.
- Mahnke, K., Qian, Y.J., Knop, J., and Enk, A.H. (2003). Induction of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101, 4862-4869.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marsal, J., and Agace, W.W. (2012). Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease. *Journal of internal medicine* 272, 411-429.
- Martin, B., Banz, A., Bienvenu, B., Cordier, C., Dautigny, N., Becourt, C., and Lucas, B. (2004). Suppression of CD4(+) T lymphocyte effector functions by CD4(+)CD25(+) cells in vivo. *Journal of immunology* 172, 3391-3398.
- Matsuoka, K., Inoue, N., Sato, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kishi, Y., Sakuraba, A., Hitotsumatsu, O., Ogata, H., Koganei, K., *et al.* (2004). T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 53, 1303-1308.
- Mayer, L. (2005). Mucosal immunity. *Immunol Rev* 206, 5.
- Mayer, L., Eisenhardt, D., Salomon, P., Bauer, W., Plous, R., and Piccinini, L. (1991). Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100, 3-12.
- Mayer, L., Sandborn, W.J., Stepanov, Y., Geboes, K., Hardi, R., Yellin, M., Tao, X., Xu, L.A., Salter-Cid, L., Gujrathi, S., *et al.* (2014). Anti-IP-10 antibody (BMS-936557) for ulcerative colitis: a phase II randomised study. *Gut* 63, 442-450.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-774.
- Merad, M., and Manz, M.G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418-3427.
- Mills, K.H. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4, 841-855.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., *et al.* (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 142, 46-54.

- Monteleone, G., Pallone, F., and MacDonald, T.T. (2011). Emerging immunological targets in inflammatory bowel disease. *Current opinion in pharmacology* 11, 640-645.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Mottet, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology* 170, 3939-3943.
- Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Mudter, J., Wirtz, S., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2002). 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* 70, 170-176.
- Mukhopadhyaya, A., Hanafusa, T., Jarchum, I., Chen, Y.G., Iwai, Y., Serreze, D.V., Steinman, R.M., Tarbell, K.V., and DiLorenzo, T.P. (2008). Selective delivery of beta cell antigen to dendritic cells in vivo leads to deletion and tolerance of autoreactive CD8+ T cells in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 6374-6379.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology*, 8th ed. edn (London: Garland Science ; London : Taylor & Francis [distributor]).
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *Journal of immunology* 171, 6173-6177.
- Naundorf, S., Schroder, M., Hoflich, C., Suman, N., Volk, H.D., and Grutz, G. (2009). IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. *European journal of immunology* 39, 1066-1077.
- Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., and Strober, W. (1995). Antibodies to Interleukin-12 Abrogate Established Experimental Colitis in Mice. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1281-1290.
- Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P.R., *et al.* (2002a). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *Journal of Experimental Medicine* 195, 1129-1143.
- Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P.R., *et al.* (2002b). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *The Journal of experimental medicine* 195, 1129-1143.

- Niess, J.H., Leithauser, F., Adler, G., and Reimann, J. (2008). Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. *Journal of immunology* *180*, 559-568.
- Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2007). Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *133*, 1670-1689.
- Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews* *13*, 668-677.
- O'Connor, W., Jr., Kamanaka, M., Booth, C.J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J.K., and Flavell, R.A. (2009). A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* *10*, 603-609.
- O'Toole, A., Walsh, P., Keegan, D., Byrne, K., Doherty, G., O'Donoghue, D., and Mulcahy, H. (2014). Mortality in inflammatory bowel disease patients under 65 years of age. *Scandinavian journal of gastroenterology*.
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* *118*, 240-249.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., *et al.* (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603-606.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative-Colitis in Mice. *Gastroenterology* *98*, 694-702.
- Ostanin, D.V., Pavlick, K.P., Bharwani, S., Souza, D.D., Furr, K.L., Brown, C.M., and Grisham, M.B. (2006). T cell-induced inflammation of the small and large intestine in immunodeficient mice. *Am J Physiol-Gastr L* *290*, G109-G119.
- Ostvik, A.E., Granlund, A.V., Bugge, M., Nilsen, N.J., Torp, S.H., Waldum, H.L., Damas, J.K., Espevik, T., and Sandvik, A.K. (2013). Enhanced expression of CXCL10 in inflammatory bowel disease: potential role of mucosal Toll-like receptor 3 stimulation. *Inflamm Bowel Dis* *19*, 265-274.
- Parrello, T., Monteleone, G., Cucchiara, S., Monteleone, I., Sebkova, L., Doldo, P., Luzzza, F., and Pallone, F. (2000). Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *Journal of immunology* *165*, 7234-7239.
- Patkar, N.M., Teng, G.G., Curtis, J.R., and Saag, K.G. (2008). Association of infections and tuberculosis with antitumor necrosis factor alpha therapy. *Curr Opin Rheumatol* *20*, 320-326.
- Paul, G., Khare, V., and Gasche, C. (2012). Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *European journal of clinical investigation* *42*, 95-109.

- Petzold, C., Schallenberg, S., Stern, J.N., and Kretschmer, K. (2012). Targeted antigen delivery to DEC-205(+) dendritic cells for tolerogenic vaccination. The review of diabetic studies : RDS 9, 305-318.
- Podolsky, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med* 347, 417-429.
- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1994). Inhibition of Th1 Responses Prevents Inflammatory Bowel-Disease in Scid Mice Reconstituted with Cd45rb(Hi) Cd4(+) T-Cells. *Immunity* 1, 553-562.
- Pulendran, B., Tang, H., and Denning, T.L. (2008). Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Current opinion in immunology* 20, 61-67.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.
- Ring, S., Maas, M., Nettelbeck, D.M., Enk, A.H., and Mahnke, K. (2013). Targeting of autoantigens to DEC205(+) dendritic cells in vivo suppresses experimental allergic encephalomyelitis in mice. *Journal of immunology* 191, 2938-2947.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. (1993). Ulcerative Colitis-Like Disease in Mice with a Disrupted Interleukin-2 Gene. *Cell* 75, 253-261.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 155, 1151-1164.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class-II Compartment - down-Regulation by Cytokines and Bacterial Products. *Journal of Experimental Medicine* 182, 389-400.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Hanauer, S., Colombel, J.F., Sands, B.E., Lukas, M., Fedorak, R.N., Lee, S., Bressler, B., *et al.* (2013). Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine* 369, 711-721.

- Sartor, R.B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology* 3, 390-407.
- Sato, A., Hashiguchi, M., Toda, E., Iwasaki, A., Hachimura, S., and Kaminogawa, S. (2003). CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *Journal of immunology* 171, 3684-3690.
- Scaldaferri, F., and Fiocchi, C. (2007). Inflammatory bowel disease: Progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 8, 171-178.
- Schoeb, T.R., and Bullard, D.C. (2012). Microbial and histopathologic considerations in the use of mouse models of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 18, 1558-1565.
- Schuurhuis, D.H., Fu, N., Ossendorp, F., and Melief, C.J. (2006). Ins and outs of dendritic cells. *International archives of allergy and immunology* 140, 53-72.
- Schwartz, R.H., Mueller, D.L., Jenkins, M.K., and Quill, H. (1989). T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 2, 605-610.
- Seiderer, J., Elben, I., Diegelmann, J., Glas, J., Stallhofer, J., Tillack, C., Pfennig, S., Jurgens, M., Schmechel, S., Konrad, A., *et al.* (2008). Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 14, 437-445.
- Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity* 66, 5224-5231.
- Shen, C., Landers, C.J., Derkowski, C., Elson, C.O., and Targan, S.R. (2008). Enhanced CBir1-specific innate and adaptive immune responses in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1641-1651.
- Shevach, E.M. (2002). CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). Rag-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Singer, G.G., and Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365-371.

- Singh, U.P., Singh, S., Taub, D.D., and Lillard, J.W. (2003). Inhibition of IFN-gamma-inducible protein-10 abrogates colitis in IL-10(-/-) mice. *Journal of immunology* *171*, 1401-1406.
- Soares, H., Waechter, H., Glaichenhaus, N., Mougneau, E., Yagita, H., Mizenina, O., Dudziak, D., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2007). A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1095-1106.
- Soderholm, J.D., Olaison, G., Peterson, K.H., Franzen, L.E., Lindmark, T., Wiren, M., Tagesson, C., and Sjodahl, R. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* *50*, 307-313.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. *Journal of Experimental Medicine* *137*, 1142-1162.
- Stern, J.N.H., Keskin, D.B., Kato, Z., Waldner, H., Schallenberg, S., Anderson, A., von Boehmerd, H., Kretschmer, K., and Strominger, J.L. (2010). Promoting tolerance to proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis through targeting dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 17280-17285.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* *204*, 1775-1785.
- Swiggard, W.J., Mirza, A., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (1995). Dec-205, a 205-Kda Protein Abundant on Mouse Dendritic Cells and Thymic Epithelium That Is Detected by the Monoclonal-Antibody Nldc-145 - Purification, Characterization, and N-Terminal Amino-Acid-Sequence. *Cell Immunol* *165*, 302-311.
- Thery, C., and Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* *13*, 45-51.
- Traugott, U., and Lebon, P. (1988). Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Annals of neurology* *24*, 243-251.
- Uno, S., Imagawa, A., Saisho, K., Okita, K., Iwahashi, H., Hanafusa, T., and Shimomura, I. (2010). Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocrine journal* *57*, 991-996.
- Uyttenhove, C., and Van Snick, J. (2006). Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *European journal of immunology* *36*, 2868-2874.

- van der Linde, K., Boor, P.P., Sandkuijl, L.A., Meijssen, M.A., Savelkoul, H.F., Wilson, J.H., and de Rooij, F.W. (2003). A Gly15Arg mutation in the interleukin-10 gene reduces secretion of interleukin-10 in Crohn disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* *38*, 611-617.
- Vandullemen, H.M., Vandeventer, S.J.H., Hommes, D.W., Bijl, H.A., Jansen, J., Tytgat, G.N.J., and Woody, J. (1995). Treatment of Crohns-Disease with Antitumor Necrosis Factor Chimeric Monoclonal-Antibody (Ca2). *Gastroenterology* *109*, 129-135.
- Vautier, S., Sousa Mda, G., and Brown, G.D. (2010). C-type lectins, fungi and Th17 responses. *Cytokine & growth factor reviews* *21*, 405-412.
- Velde, A.A.T., de Kort, F., Sterrenburg, E., Pronk, I., ten Kate, F.J.W., Hommes, D.W., and van Deventer, S.J.H. (2007). Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* *13*, 325-330.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179-189.
- Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* *8*, 523-532.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs - Cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of immunology* *159*, 565-573.
- Wang, C., Kang, S.G., Lee, J., Sun, Z., and Kim, C.H. (2009). The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* *2*, 173-183.
- Westendorf, A.M., Fleissner, D., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Bruder, D., Hansen, W., Liblau, R., and Buer, J. (2006). Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. *Gastroenterology* *131*, 510-524.
- Westendorf, A.M., Fleissner, D., Groebe, L., Jung, S., Gruber, A.D., Hansen, W., and Buer, J. (2009a). CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. *Gut* *58*, 211-219.
- Westendorf, A.M., Fleissner, D., Groebe, L., Jung, S., Gruber, A.D., Hansen, W., and Buer, J. (2009b). CD4+Foxp3+ regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. *Gut* *58*, 211-219.
- Westendorf, A.M., Gunzer, F., Deppenmeier, S., Tapadar, D., Hunger, J.K., Schmidt, M.A., Buer, J., and Bruder, D. (2005a). Intestinal immunity of *Escherichia coli*

NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *Fems Immunol Med Mic* 43, 373-384.

Westendorf, A.M., Templin, M., Geffers, R., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Probst-Kepper, M., Hansen, W., Liblau, R.S., Gunzer, F., Bruder, D., *et al.* (2005b). CD4(+) T cell mediated intestinal immunity: chronic inflammation versus immune regulation. *Gut* 54, 60-69.

Winstanley, C., and Morgan, J.A. (1997). The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology* 143 (Pt 10), 3071-3084.

Witmerpack, M.D., Swiggard, W.J., Mirza, A., Inaba, K., and Steinman, R.M. (1995). Tissue Distribution of the Dec-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal-Antibody Nldc-145 .2. Expression in-Situ in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues. *Cell Immunol* 163, 157-162.

Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K.M., Menendez, A., Bergstrom, K.S., Gill, N., Russell, S.L., Vallance, B.A., and Finlay, B.B. (2011). Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infection and immunity* 79, 1536-1545.

Xu, X.R., Liu, C.Q., Feng, B.S., and Liu, Z.J. (2014). Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroentero* 20, 3255-3264.

Zenlea, T., and Peppercorn, M.A. (2014). Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World J Gastroentero* 20, 3146-3152.

Zhao, P., Xiao, X., Ghobrial, R.M., and Li, X.C. (2013). IL-9 and Th9 cells: progress and challenges. *Int Immunol* 25, 547-551.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.

Zhou, L., Ivanov, II, Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8, 967-974.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACK-Puffer	Ammonium-Chlorid-Kalium-Puffer (Erythrozytenlysepuffer)
APC	engl. <i>antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
BLN	engl. <i>bronchial lymph node</i> , bronchialer Lymphknoten
BZR	B-Zell-Rezeptor
CCR	Chemokinrezeptor
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
COPD	engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch-obstruktive Lungenerkrankung)
CTL	engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i>
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DSS	engl. <i>dextran sulfate sodium</i> , Natriumdextransulfat
eGFP	engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
Foxp3	engl. <i>forkhead box P3</i> (Treg-spezifischer Transkriptionsfaktor)
g	engl. <i>gravity</i> , Erdanziehungskraft
GALT	engl. <i>gut-associated lymphoid tissue</i> , Darm-assoziiertes lymphoides Gewebe
HA	Hemagglutinin
HEV	engl. <i>high endothelial venules</i>
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venös
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase

IEC	engl. <i>intestinal epithelial cell</i> , intestinale Epithelzelle
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IPEX-Syndrom	engl. <i>immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked</i> Syndrom
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
KU	Kolitis ulcerosa
LP	Lamina Propria
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	engl. <i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MC	Morbus Crohn
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Hautphistokompatibilitätskomplex
MLN	engl. <i>mesenteric lymph node</i> , mesenterischer Lymphknoten
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PAGE	engl. <i>polyacrylamid gelelectrophoresis</i> , Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> , periphere mononukleäre Blutzelle
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorobol 12-Myristat 13-Acetat
PP	Payer'sche Plaques

PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i> , Pathogen-Erkennungsrezeptor
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RAG2	engl. <i>recombination activating gene 2</i>
RALDH	Retinaldehyd Dehydrogenase
SCID	engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SPC	engl. <i>surfactant protein C</i> (Alveolarepithelzell-spezifischer Promotor)
SPF	engl. <i>specific pathogen free</i> , spezifisch pathogen-frei
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl 4-N-Maleimidomethyl)-Cyclohexane-1-Carboxylat
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
T _H 1-Zelle	Typ1-T-Helfer-Zelle
T _H 2-Zelle	Typ2-T-Helfer-Zelle
T _H 17-Zelle	Typ17-T-Helfer-Zelle
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i>
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzosulfonsäure
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tr1	engl. <i>T regulatory type-1</i> (regulatorische T-Zelle vom Typ I)
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Phänotyp unreifer und reifer DCs..	10
Abbildung 1-2. Subtypen von CD4 ⁺ T-Zellen..	12
Abbildung 1-3. Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen.....	15
Abbildung 1-4. Aufbau des GALT.....	21
Abbildung 1-5. Aufbau des DEC-205 Rezeptors.	24
Abbildung 1-6. Toleranzmechanismen durch DEC-205 vermitteltes <i>Antigen-Targeting</i>	26
Abbildung 1-7. Morphologische makroskopische und mikroskopische Merkmale von CED.....	29
Abbildung 1-8. Ursachen für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	30
Abbildung 1-9. CD8 ⁺ T-Zell vermitteltes Darmentzündungsmodell in VILLIN-HA transgenen Mäusen.....	36
Abbildung 3-1. Nachweis der erfolgreichen Kopplung der Antikörper-Antigen-Konjugate.	59
Abbildung 3-2. DEC-HA <i>Antigen-Targeting</i> führt zur Proliferation antigen-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	61
Abbildung 3-3. Zellsortierung HA-spezifischer CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ T-Zellen.	62
Abbildung 3-4. Der adoptive Transfer HA-spezifischer CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ T-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse führt zu einer starken Entzündung des Kolons.....	63
Abbildung 3-5. Charakterisierung der Darmentzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen.....	64
Abbildung 3-6. DEC-HA Behandlung schützt VILLIN-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme.....	65
Abbildung 3-7. DEC-HA Behandlung führt zu einer geringeren Histopathologie im Kolon.	66
Abbildung 3-8. Die Expression von IFN- γ und TNF- α in Kolonbiopsien ist nach DEC-HA Behandlung reduziert.....	67
Abbildung 3-9. DEC-HA Behandlung führt zur Induktion von Foxp3 ⁺ Treg.....	68
Abbildung 3-10. <i>In vitro</i> Differenzierung von HA-spezifischen T _H 1-Zellen.	69
Abbildung 3-11. Der adoptive Transfer von HA-spezifischen T _H 1-Zellen in VILLIN-HA transgene Mäuse führt zur Entzündung des Dünndarms und des Kolons.....	70

Abbildung 3-12. Charakterisierung der Darmentzündung in VILLIN-HA transgenen Mäusen nach T _H 1-Zelltransfer.	71
Abbildung 3-13. DEC-HA Behandlung schützt VILLIN-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme.....	72
Abbildung 3-14. DEC-HA Behandlung führt zu geringerer Histopathologie im Dünndarm und Kolon.....	73
Abbildung 3-15. Die Expression von IFN- γ und IL1- β in Dünndarm- und Kolonbiopsien ist nach DEC-HA Behandlung reduziert.	74
Abbildung 3-16. DEC-HA Behandlung führt nicht zur Konversion von T _H 1-Zellen zu Foxp3 ⁺ Treg.	75
Abbildung 3-17. Der Anteil HA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen im Darm von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist nach DEC-HA Behandlung reduziert.	76
Abbildung 3-18. DNA Microarray Analyse von HA-spezifischen T _H 1-Zellen aus DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen.	77
Abbildung 3-19. Die Expression von CXCL9 und CXCL10 im Dünndarm und Kolon von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist T _H 1-vermittelten Entzündungsmodell stark erhöht.	78
Abbildung 3-20. Die CXCR3 Expression ist in HA-spezifischen T _H 1-Zellen nach DEC-HA Behandlung reduziert.....	79
Abbildung 3-21. Die Migration HA-spezifischer T _H 1-Zellen ist nach DEC-HA Behandlung <i>in vitro</i> reduziert.	80
Abbildung 3-22. Der Anteil der CXCR3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im Blut von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten ist reduziert.	81
Abbildung 3-23. CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ T-Zellen akkumulieren in der entzündeten Darmmukosa von Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa Patienten.....	82
Abbildung 3-24. Die Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten schützt VILLIN-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme.	83
Abbildung 3-25. Die Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten führt zu geringerer Histopathologie im Dünndarm und Kolon von VILLIN-HA transgenen Mäusen.	84
Abbildung 3-26. Die Expression von IFN- γ und IL1- β in Dünndarm- und Kolonbiopsien ist nach Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten reduziert.	85
Abbildung 3-27. Der Anteil HA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen im Darm von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist nach Behandlung mit einem CXCR3 Antagonisten reduziert.....	86

Abbildung 3-28. Die IL-10 Expression ist in DCs nach DEC-HA Behandlung erhöht.....	87
Abbildung 3-29. Die DEC-HA vermittelte Reduzierung der Migration wird durch Neutralisierung von IL-10 aufgehoben.....	88
Abbildung 3-30. Die Neutralisierung von IL-10 führt in DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen zur Umkehrung des DEC-HA vermittelten Schutzes vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme.....	89
Abbildung 3-31. Die Neutralisierung von IL-10 führt in DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen zu einer erhöhten Histopathologie.	90
Abbildung 3-32. Die Neutralisierung von IL-10 führt in DEC-HA behandelten VILLIN-HA transgenen Mäusen zu erhöhter IFN- γ Expression in Dünndarm- und Kolonbiopsien.....	91
Abbildung 3-33. Der Anteil HA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen im Darm von VILLIN-HA transgenen Mäusen ist nach DEC-HA und α -IL-10 Behandlung erhöht..	92
Abbildung 3-34. Der adoptive Transfer von HA-spezifischen T _H 1-Zellen in SPC-HA transgene Mäuse führt zur Entzündung der Lunge.....	93
Abbildung 3-35. Die Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten schützt SPC-HA transgene Mäuse vor entzündungsbedingter Gewichtsabnahme. .	94
Abbildung 3-36. Die Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten führt zu keiner verbesserten Histopathologie in den Lungen von SPC-HA transgenen Mäusen.....	95
Abbildung 3-37. Die IFN- γ und TNF- α Expression in der Lunge ist nach Behandlung mit DEC-HA bzw. einem CXCR3 Antagonisten leicht reduziert.....	96
Abbildung 3-38. Die CXCL9 und CXCL10 Expression in der Lunge von SPC-HA transgenen Mäusen ist nach T _H 1-Zelltransfer stark erhöht.....	96
Abbildung 3-39. Der Anteil HA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in der Lunge von SPC-HA transgenen Mäusen ist nach Behandlung mit DEC-HA oder einem CXCR3 Antagonisten reduziert.....	97
Abbildung 4-1. Mechanismen der Toleranzinduktion gegenüber antigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen durch DEC-205 vermitteltes <i>Antigen-Targeting</i>	114

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1. Subtypen muriner DCs.	11
Tabelle 2-1. Sequenzen verwendeter Primerpaare.	40
Tabelle 2-2. Verwendete Antikörper.	41
Tabelle 2-3 Primerpaare zur Genotypisierung transgener Mausstämme.	43
Tabelle 2-4 PCR-Programm zur Genotypisierung transgener Mausstämme.....	43
Tabelle 2-5 PCR-Programm für die semi-quantitative PCR.....	46
Tabelle 2-6 PCR-Programm für die quantitative Real-Time PCR.	47
Tabelle 2-7 Beurteilung von Entzündungsparametern im Darm und Lunge	57

8.4 Anlagen

Die Daten der Transkriptomanalyse von HA-spezifischen T_H1-Zellen aus DEC-HA, ISO-HA und PBS behandelten, VILLIN-HA transgenen Mäusen (siehe Kapitel 2.5.4 und Kapitel 3.3.5) sind dieser Arbeit in elektronischer Form auf einer CD-ROM beigelegt.

Publikationen und Tagungsbeiträge

In der Online-Version nicht enthalten.

Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Modulation intestinaler Entzündungsreaktionen durch die Antigenbeladung dendritischer Zellen über den Oberflächenrezeptor DEC-205“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Munisch-Kumar Wadwa befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Astrid Westendorf

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Munisch-Kumar Wadwa

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Munisch-Kumar Wadwa