

Aus der Medizinischen Klinik I
Gastroenterologie/ Infektiologie/ Rheumatologie
Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. Martin Zeitz

Die Rolle von CD44v7 bei der tolerisierenden und immunisierenden Immunantwort im Darm

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biologie

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

Vorgelegt von
MSc Pamela Holzlöhner
aus Plauen

Juli 2009

1. Gutachter: PD Dr. Bianca M. Wittig
2. Gutachter: Prof. Dr. Kürsad Turgay

Disputation am: 08. Oktober 2009

„You must be the change you want to see in the world“

Mahatma Gandhi

Gewidmet meiner großartigen Mama, die mich soviel gelehrt und auf ihre wundervolle Art geprägt hat, und meiner besten Freundin Jule, die immer für mich da war und ist.

Zusammenfassung/Abstract

Bei einem gesunden Menschen herrscht im Darm eine homöostatische Balance, die dafür sorgt, dass bakterielle und Nahrungsmittelantigene toleriert werden. Dieser Mechanismus ist bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) unterbrochen. Die resultierende Entzündung scheint T-Zell-abhängig zu sein und wird durch ein Ungleichgewicht der pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort hervorgerufen. CD44v7 ist ein kostimulatorisches, transmembranes Oberflächenmolekül. Es konnte bisher gezeigt werden, dass die Deletion von CD44v7 bzw. der Einsatz von antagonistischen Antikörpern vor der Ausbildung einer chemisch induzierten Kolitis im Mausmodell schützen. Das Problem der meisten Tiermodelle ist aber, dass ein spezifisches Antigen nicht definiert ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein neues antigen-spezifisches Kolitismodell zu entwickeln, in dem die immunogenen bzw. tolerogenen Mechanismen des Darmes untersucht werden können. Dafür wurden DO11.10 (OVA-TCR positive) T_H1 -Zellen in kongene Balb/c Wildtyp Mäuse transferiert und 24 h später intrarektal, im Abstand von zwei Stunden, 50% Ethanol und OVA Protein in den distalen Dickdarm appliziert. Diese Behandlung wurde 4 Tage später wiederholt. Tiere, die so behandelt wurden, entwickelten eine OVA-spezifische Kolitis, die histologisch den pathologischen Befunden bei Morbus Crohn entsprach. Daneben konnte eine signifikant erhöhte Anzahl OVA-TCR positiver T-Zellen innerhalb der Lamina propria (LP), sowie eine erhöhte Produktion von $INF-\gamma$ durch reisolierte Lamina propria mononukleäre Zellen in Kultur festgestellt werden. Wurde zwischen den intrarektalen Behandlungen täglich OVA Protein gefüttert, kam es zu einer Ausheilung der OVA-spezifischen Kolitis. Dies war begleitet durch die Induktion von Apoptose in Effektor-T-Zellen und durch eine erhöhte Anzahl an OVA-TCR⁻ FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen innerhalb der LP.

CD44v7-deletierte Mäuse waren vor der Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis geschützt, wenn sie reine Wildtyp T_H1 -Zellen transferiert bekamen. Wurden zusätzlich dazu Wildtyp Makrophagen transferiert, kam es zur Ausbildung der Kolitis. Keine Unterschiede konnten bei der Verwendung von CD44v7^{-/-} OVA-TCR pos. T_H1 -Zellen im Vergleich zu DO11.10 T_H1 -Zellen festgestellt werden. Nach Transfer beider Zelltypen konnte in Balb/c Wildtyp Mäusen sowohl eine OVA-spezifische Kolitis ausgebildet werden als auch diese durch zusätzliche Fütterung mit OVA Protein unterbunden werden. Es ist daher zu vermuten, dass die Expression von CD44v7 auf Makrophagen aber nicht auf T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Induktion einer antigen-spezifischen Kolitis etabliert, die schnell reproduzierbar und einfach zu handhaben ist. Sie bietet damit eine neue Möglichkeit, die tolerogenen und immunogenen Mechanismen innerhalb des Darmes zu untersuchen. Dabei kann auch die Verwendung von knock-out Tieren und der Einsatz therapeutischer Mittel berücksichtigt werden.

The healthy human organism shows a homeostatic balance within the gut which tolerates bacterial antigens or antigens derived from dietary sources. In inflammatory bowel disease (IBD) this mechanism is disrupted. The resulting inflammation seems to be T cell dependent and is caused by a disbalance of the pro- and anti-inflammatory immune response. CD44v7 is a costimulatory transmembrane surface molecule. So far it could be shown, that the deletion of CD44v7 or the use of an antagonistic antibody protects from the development of a chemical induced colitis in mouse. The problem with most animal models is that the antigen is not defined. Aim of this thesis was to establish a new antigen-specific colitis model to investigate the immunogenic and tolerogenic mechanism within the colon. Therefore, DO11.10 (OVA-TCR positive) T_H1 cells were transferred into congenic BALB/c wildtype mice. 24 h later, 50% ethanol and, 2 hours later, OVA protein was intrarectally applied in the distal colon. This was repeated at day 4. The mice developed an OVA-specific colitis that showed the same histological features as patients with Morbus Crohn. Additionally, a higher percentage of OVA-TCR positive cells could be detected in the lamina propria (LP). Isolated Lamina propria mononuclear cells show a higher production of INF- γ when restimulated in culture. Feeding OVA-protein between the intraluminal treatment leads to an abrogation of the OVA-specific colitis. This was accompanied with the induction of apoptosis in effector-T cells and the higher percentage of OVA-TCR⁺ FoxP3⁺ CD4⁺ T cells in the LP.

CD44v7^{-/-} mice were protected from the development of an OVA-specific colitis if they only received wildtype T_H1 cells. If wildtype macrophages were additionally transferred, mice developed a severe colitis. No differences could be observed in the application of CD44v7^{-/-} OVA-TCR pos. T_H1 cells or DO11.10 T_H1 cells, respectively. Balb/c mice developed an OVA-specific colitis which also was abrogated after feeding OVA protein independent of the T_H1 cell type transferred. This result leads to the assumption that the expression of CD44v7 on macrophages but not on T cells plays an important role during the development of an OVA-specific colitis.

This thesis explores a new approach to establish an antigen-specific colitis. This new method is easy in handling and fast to reproduce. It provides an animal model to investigate antigen-specific immunization versus tolerance in the gut mucosa. Furthermore it provides the opportunity to investigate the usage of knock-out mice and therapeutic substances.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| I. Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| II. Abbildungsverzeichnis | 12 |
| III. Tabellenverzeichnis | 15 |
| 1. Einleitung | 16 |
| 1.1. Das Immunsystem | 16 |
| 1.1.1. Mechanismen des adaptiven Immunsystems | 17 |
| 1.1.2. T-Lymphozyten | 18 |
| 1.1.2.1. Naive T-Lymphozyten | 18 |
| 1.1.2.2. Helfer T-Lymphozyten | 18 |
| 1.1.2.3. Zytotoxische T-Lymphozyten | 20 |
| 1.1.2.4. Gedächtnis T-Lymphozyten | 21 |
| 1.1.2.5. Regulatorische T-Lymphozyten | 21 |
| 1.1.3. Antigenpräsentation, kostimulatorische Moleküle und der Ovalbumin (OVA)- spezifische T-Zellrezeptor | 22 |
| 1.1.4. CD44v7 | 24 |
| 1.2. Das Darmimmunsystem | 25 |
| 1.2.1. Das Spezielle an der Antigenaufnahme und -präsentation im Darm | 25 |
| 1.2.2. Intestinale Makrophagen | 27 |
| 1.2.3. Orale Toleranz | 28 |
| 1.3. Die pathologische Immunantwort im Darm | 30 |
| 1.3.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen | 31 |
| 1.3.2. Morbus Crohn | 33 |
| 1.3.3. Tiermodelle für experimentelle Kolitis | 33 |
| 1.3.4. CD44v7 und chronisch entzündliche Darmerkrankungen | 35 |
| 2. Zielstellung | 36 |
| 3. Materialien | 38 |
| 3.1. Geräte und Materialien | 38 |
| 3.2. Allgemeine Reagenzien und Chemikalien | 38 |
| 3.3. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien | 40 |
| 3.4. Spezifische Reagenzien und Chemikalien | 42 |
| 3.4.1. Genomische DNA-Isolierung- und PCR-Reagenzien | 42 |
| 3.4.2. Antikörper, Nachweis- und Färbereagenzien | 42 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4.3. | Zytokine und ELISAs | 44 |
| 3.4.4. | Proteine und Peptide | 44 |
| 3.5. | Versuchstiere | 44 |
| 4. | Methoden | 46 |
| 4.1. | Genotypische Bestimmung der Versuchstiere | 46 |
| 4.2. | Zellisolation | 47 |
| 4.2.1. | Organentnahme | 47 |
| 4.2.2. | Isolation von Lymphozyten aus Lymphknoten | 47 |
| 4.2.3. | Isolation von Splenozyten | 48 |
| 4.2.4. | Isolation von Lamina propria mononukleären Zellen | 48 |
| 4.3. | Zellzählung | 49 |
| 4.4. | Zellkultur und Sortierung | 49 |
| 4.4.1. | Zellkultur und T _H 1-Zellpriming | 49 |
| 4.4.2. | CD4 ⁺ Zellsortierung | 50 |
| 4.4.3. | CFSE Markierung | 50 |
| 4.5. | Tierbiologische Arbeiten | 51 |
| 4.5.1. | Ovalbumin Präsentation im Darm | 51 |
| 4.5.2. | Induktion von oraler Toleranz | 51 |
| 4.5.3. | Induktion einer DTH und Ohrschwellmessung | 52 |
| 4.5.4. | Induktion der OVA-spezifischen Kolitis | 52 |
| 4.5.4.1. | OVA-spezifische Kolitis im Langzeitversuch | 53 |
| 4.5.4.2. | OVA-spezifische Kolitis in CD44v7 ^{-/-} Tieren | 53 |
| 4.5.4.3. | OVA-spezifische Kolitis und orale Toleranz | 53 |
| 4.5.4.4. | OVA-spezifische Kolitis und Injektion von M1.1 und Gal-2 | 54 |
| 4.6. | Immuntechnologische Arbeiten | 54 |
| 4.6.1. | Durchflusszytometrie | 54 |
| 4.6.2. | Nachweis sezernierter Zytokine durch enzymgekoppelten Immunadsorbtionstests (ELISA) | 55 |
| 4.6.3. | Haematoxylin & Eosin Färbung und Bestimmung des Entzündungsgrades (Scoring) | 56 |
| 4.6.4. | Immunhistochemische Färbung | 57 |
| 4.6.5. | Immunfluoreszenz-Färbung | 58 |
| 4.7. | Statistische Analyse | 58 |

| | |
|---|------------|
| 5. Ergebnisse | 59 |
| 5.1. Ovalbumin (OVA) wird von mukosalen antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen | 59 |
| 5.2. Induktion von oraler Toleranz in Wildtyp und CD44v7 ^{-/-} Mäusen | 61 |
| 5.3. Charakterisierung der OVA-spezifischen Kolitis | 66 |
| 5.4. Spezifischer Nachweis der OVA-TCR positiven T-Zellen im Kolon | 69 |
| 5.5. Die OVA-spezifische Kolitis kann über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden | 70 |
| 5.6. Die Induktion von oraler Toleranz unterbricht die Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis | 73 |
| 5.7. FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen werden nach oraler Toleranz Induktion im Darm detektiert | 77 |
| 5.8. OVA-spezifische Kolitis Induktion in CD44v7 ^{-/-} Mäusen | 80 |
| 5.9. Beeinflussung der CD44v7-Deletion in T-Zellen bei der Toleranzinduktion bei der OVA-spezifische Kolitis | 83 |
| 5.10. OVA-spezifische Kolitis und M1.1. und Gal-2 | 89 |
| 6. Diskussion | 92 |
| 6.1. Ovalbumin wird im Darm präsentiert | 92 |
| 6.2. CD44v7 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung der oralen Toleranz | 93 |
| 6.3. Ausbildung der Ovalbumin-spezifischen Kolitis | 94 |
| 6.4. Induktion von oraler Toleranz unterdrückt die Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis | 97 |
| 6.5. CD44v7-Deletion auf Makrophagen, aber nicht auf T-Zellen unterbindet die Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis | 99 |
| 6.6. Therapeutische Beeinflussung der OVA-spezifischen Kolitis | 100 |
| 6.7. Zusammenfassung und Ausblick | 101 |
| 7. Danksagung | 103 |
| 8. Literaturverzeichnis | 105 |
| 9. Anhang | 120 |

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| µg | – Mikrogramm |
| µl | – Mikroliter |
| µm | – Mikrometer |
| APC | – Allophycocyanin |
| APZ | – antigen-präsentierende Zellen |
| BSA | – Bovines Serum Albumin |
| CARD15 | – Gen für Caspase Recruitment Domain 15 |
| CD | – Differenzierungsmarker auf Zelloberflächen, engl.: cluster of differentiation |
| CED | – chronisch entzündliche Darmerkrankungen |
| CFSE | – 5-(und 6-) Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidylester |
| CTL | – Zytotoxische T-Lymphozyten, engl.: cytotoxic T-lymphocytes |
| d | – Tag |
| DAPI | – 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DC | – Dendritische Zellen, engl.:dendritic cells |
| DSS | – Dextran Sodium Sulphate |
| DNA | – Desoxyribonukleinsäure, engl.: deoxyribonucleic acid |
| DTH | – engl.: delayed type hypersensitivity |
| DTT | – DL-Dithiothreitol |
| <i>E.coli</i> | – <i>Escherichia coli</i> |
| <i>EcOVA</i> | – OVA-produzierende <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | – Ethylendiamintetraazetat |
| ELISA | – Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, engl.: enzyme-linked immunosorbent assay |
| EtOH | – Ethanol |
| FACS | – Durchflußzytometrie, engl.: Fluorescence activated cell sorting |
| FCS | – fötales Kälberserum, engl.: fetal calf serum |
| FITC | – Fluorescein-5-isothiocyanat |
| FoxP3 | – Transkriptionsfaktor von regulatorischen T-Zellen, engl.: forkhead box P3 |
| FSC | – Vorwärtsstreulicht (engl.: forward scatter) |
| g | – Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) |
| Gal-2 | – Galektin-2 |

| | |
|-------------------|---|
| GALT | – Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe, engl.: gut associated lymphoid tissue |
| GAPDH | – Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GATA-3 | – GATA bindendes Protein 3 |
| HBSS | – Zellkulturmedium für Säugetierzellen (engl.: Hank´s Balanced Salt Solution) |
| HEPES | – 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure |
| HLA | – humanes Leukozytenantigen |
| HPF | – engl.: high power field |
| IFA | – engl.: incomplete Freud´s adjuvant |
| IFN | – Interferon |
| Ig | – Immunglobulin |
| IL | – Interleukin |
| IPEX | – engl.: immune dysfunction/ polyendocrinopathy/ enteropathy/ X-linked syndrom |
| iT _{reg} | – induzierte regulatorische T-Zelle |
| kg | – Kilogramm |
| LN | – Lymphknoten, engl.: lymph nodes |
| LP | – Lamina propria |
| LPMC | – Lamina propria mononukleäre Zellen, engl.: lamina propria mononuclear cells |
| LPS | – Lypopolysaccharid |
| LT | – Lymphotoxin |
| MACS | – engl.: magnetic-activated cell sorting |
| MAdCAM-1 | – engl.: mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 |
| MAMP | – engl.: microbe-associated molecular patterns |
| MC | – Morbus Crohn |
| M-Zelle | – microfold Zelle |
| mg | – Milligramm |
| MHC | – Haupthistokompatibilitätskomplex, engl.: major histocompatibility complex |
| ml | – Milliliter |
| mLN | – mesenterialer Lymphknoten, engl.: mesenterial lymph node |
| ng | – Nanogramm |
| NOD2 | – Nucleotid Oligodimerisation Domaine 2 |
| nT _{reg} | – natürliche regulatorische T-Zelle |
| OVA | – Ovalbumin |

| | |
|------------------|--|
| OVA-TCR | – Ovalbumin-T-Zell-Rezeptor (DO11.10 α - β - T-Zell-Rezeptor) |
| OVA-FITC | – Fluorescein-5-isothiocyanat gekoppeltes OVA |
| PCR | – Polymerasekettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction |
| PBS | – phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate buffered saline |
| PE | – Phycoerythrin |
| pg | – Picogramm |
| PP | – Peyer'sche Plaques |
| PerCP | – Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex |
| pos. | – positiv |
| RAG | – engl.: recombination-activating gene |
| RNA | – Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid |
| ROR γ t | – Retinoid-Related Orphan Rezeptor Gamma |
| RPMI 1640 | – Zellkulturmedium für Säugetierzellen (= Roswell Park Memorial Institute) |
| RT | – Raumtemperatur |
| SCID | – engl.: severe combined immunodeficiency |
| SSC | – Seitwärtsstreulicht (engl.: side scatter) |
| STAT | – Signal Transducers and Activators of Transcription |
| T-bet | – T-Zell-spezifischer T-Box Transkriptionsfaktor |
| TBS | – Tris-gepufferte Salzlösung, engl.: tris buffered saline |
| T _{CM} | – zentrale Gedächtnis T-Zellen, engl.: central memory T cell |
| TCR | – T-Zell Rezeptor, engl.: T cell receptor |
| T _{EM} | – Effektor Gedächtnis T-Zellen, engl.: effector memory T cell |
| tg | – transgen |
| TGF | – Transformierender Wachstumsfaktor, engl.: transforming (tumor) growth factor |
| T _H | – T-Helferzelle |
| TNB | – Tris Natrium Puffer |
| TNBS | – Trinitrobenzolsulfonsäure |
| TNF | – Tumornekrosefaktor |
| Tris | – tris (Hydroxymethyl-) aminomethan |
| T _{reg} | – Regulatorische T-Zelle |
| T _R 1 | – Regulatorische T-Zelle Typ 1 |
| Tween 20 | – Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat |
| UV-Licht | – ultraviolettes Licht |

II. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1.1. | Interaktion zwischen einer T-Zelle und einer antigen-präsentierenden Zelle (APZ) | 23 |
| 1.2. | Genomische Struktur von CD44 | 24 |
| 1.3. | Antigenaufnahme im Darm | 26 |
| 1.4. | Mechanismen der Toleranzinduktion | 29 |
| 4.1. | Übersichtzeichnung der entnommenen Lymphknoten (LN) und der Milz | 48 |
| 4.2. | Versuchsaufbau zur Induktion oraler Toleranz in Balb/c Wildtyp und CD44v7 ^{-/-} -Mäusen | 52 |
| 5.1.1. | Analyse der LPMC nach intrarektaler OVA-FITC Behandlung zu verschiedenen Isolationszeitpunkten | 59 |
| 5.1.2. | Analyse von LPMC nach intrarektaler OVA-FITC Behandlung in verschiedenen Konzentrationen | 60 |
| 5.1.3. | Analyse von LPMC nach Applikation von OVA-FITC in verschiedenen Versuchstieren | 60 |
| 5.1.4. | Mukosale Aufnahme von OVA-FITC | 61 |
| 5.2.1. | Vergleich der prozentualen Anzahl reisolierter OVA-TCR pos. T-Zellen aus Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7 ^{-/-} Mäusen nach Transfer von DO11.10 CD4 ⁺ bzw. CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. CD4 ⁺ Zellen, Induktion von oraler Toleranz und anschließender Immunisierung mit OVA | 62 |
| 5.2.2. | Vergleich der Proliferation von OVA-TCR pos. T Zellen nach Immunisierung mit OVA zwischen OVA/PBS gefütterten Mäusen (A) und Kontrollen (B) | 63 |
| 5.2.3. | IFN- γ Produktion reisolierter Zellen von OVA/PBS gefütterten Mäusen und Kontrollen nach Immunisierung mit OVA | 64 |
| 5.2.4. | IL-10 Produktion reisolierter Zellen von OVA/PBS gefütterten Mäusen und Kontrollen nach Immunisierung mit OVA | 65 |
| 5.2.5. | Vergleich der Ohrschwellung nach Induktion einer DTH zwischen OVA/PBS gefütterten Balb/c bzw. CD44v7 ^{-/-} -Mäusen und Kontrollen | 65 |
| 5.3.1. | Gewichtsverläufe nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis im Vergleich zu Kontrollen | 66 |
| 5.3.2. | Dickdarm bei ausgebildeter OVA spezifischer Kolitis und Kontrolle | 67 |
| 5.3.3. | Länge des Dickdarmes nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis bzw. Kontrollen | 67 |
| 5.3.4. | Haematoxylin & Eosin Färbung von Darmquerschnitten isoliert aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis bzw. aus Kontrollen | 68 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.3.5. | Vergleich des Histologischen Scores der Kolons zwischen ausgebildeter OVA-spezifischer Kolitis und Kontrolle | 68 |
| 5.3.6. | Vergleich der IFN- γ Produktion reisolierter Zellen aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis bzw. Kontrollen | 69 |
| 5.4.1. | Analyse von reisolierten OVA-TCR pos. T-Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis bzw. Kontrollen | 70 |
| 5.4.2. | Vergleich der Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis und Kontrollen | 71 |
| 5.5.1. | Histologischer Score nach Standard-Induktion der OVA-spezifischen Kolitis am Tag 1 und 4 mit unterschiedlichen Isolationszeitpunkten | 71 |
| 5.5.2. | Histologischer Score der OVA-spezifischen Kolitis nach wiederholtem Transfer von OVA-TCR pos. T-Zellen (d0, 6, 12) und mehrmaliger Stimulation mit OVA (d1, 4, 7, 10, 13 16) nach 19 Tagen Versuchsdauer im Vergleich zu Kontrollen | 72 |
| 5.6.1. | Haematoxylin & Eosin Färbung von Dickdarmquerschnitten nach einer OVA-spezifischen Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung im Vergleich zur Kontrolle | 73 |
| 5.6.2. | Histologischer Score der OVA-spezifischen Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 74 |
| 5.6.3. | Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 74 |
| 5.6.4. | Immunhistochemische Färbung von OVA-TCR pos. T-Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 75 |
| 5.6.5. | Vergleich der IFN- γ Produktion reisolierter LPMC nach OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 76 |
| 5.6.6. | Vergleich der IL-17 Produktion reisolierter LPMC nach OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 76 |
| 5.6.7. | Vergleich der IL-10 Produktion reisolierter LPMC nach OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 77 |
| 5.7.1. | Vergleich der FoxP3 pos. T-Zellen nach immunhistochemischer Färbung des Darmes zwischen OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 78 |
| 5.7.2. | Vergleich der prozentualen Anzahl FoxP3 pos. T-Zellen zwischen OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen nach immunhistochemischer Färbung des Darmes | 79 |
| 5.7.3. | Durchflusszytometrisch bestimmte prozentuale Anzahl FoxP3 pos. T-Zellen in der LP bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen | 79 |
| 5.7.4. | Durchflusszytometrische Analyse von isolierten LPMC aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher OVA Fütterung und Kontrollen | 80 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.8.1. | Haematoxylin & Eosin gefärbte Dickdarmquerschnitte aus CD44v7 ^{-/-} Mäusen nach Transfer von DO11.10 T _H 1 CD4 ⁺ Zellen mit und ohne wt Makrophagen (M ϕ) und nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis | 81 |
| 5.8.2. | Histologischer Score der Kolons von CD44v7 ^{-/-} Mäusen nach Transfer von DO11.10 T _H 1 CD4 ⁺ Zellen mit und ohne wt Makrophagen (M ϕ) und nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis | 82 |
| 5.8.3. | Vergleich der Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen isoliert aus LP und mLN von CD44v7 ^{-/-} nach Transfer DO11.10 T _H 1 CD4 ⁺ Zellen mit und ohne wt Makrophagen (M ϕ) und nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis | 83 |
| 5.9.1. | Haematoxylin & Eosin Färbung von Darmquerschnitten aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 84 |
| 5.9.2. | Histologischer Score der Kolons von Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 84 |
| 5.9.3. | Durchflusszytometrisch bestimmte Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen isoliert aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 85 |
| 5.9.4. | Immunhistochemisch bestimmte Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen von Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 86 |
| 5.9.5. | Vergleich der IFN- γ Produktion reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 87 |
| 5.9.6. | Vergleich der IL-10 Produktion reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 87 |
| 5.9.7. | Durchflusszytometrische Analyse von FoxP3 pos. Zellen reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 88 |
| 5.9.8. | Vergleich der Anzahl von FoxP3 pos. Zellen reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7 ^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen | 89 |
| 5.10.1. | Haematoxylin & Eosin gefärbte Dickdarmquerschnitte isoliert aus Balb/c nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis mit und ohne Injektion von M1.1. bzw. Gal-2 | 90 |
| 5.10.2. | Histologischer Score bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne Injektion von M1.1 bzw. Gal-2 im Vergleich zu Kontrollen | 90 |
| 5.10.3. | Vergleich der Anzahl OVA-TCR positiver Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne Injektion von M1.1 bzw. Gal-2 und Kontrollen | 91 |

III. Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|--|-----|
| 1.1. | Übersicht der verschiedenen Subpopulationen von Helfer-T-Lymphozyten | 20 |
| 1.2. | Klinische und pathologische Merkmale von Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa | 32 |
| 4.1. | Fluoreszenzparameter des FACSCalibur mit entsprechenden Fluorochromen und deren Absorptions- und Emissionsmaxima | 55 |
| 4.2. | Scoring Schema zur Bestimmung des Entzündungsgrads | 57 |
| 9.1. | Standardisierte Mittelwerte und Standardabweichung der OVA-TCR-positiven Zellen aus kaudalen Lymphknoten mit und ohne Induktion oraler Toleranz in Balb/c und CD44v7 ^{-/-} Mäusen | 120 |

1. Einleitung

Der menschliche Darm umfasst zwei für den Organismus lebensnotwendige Systeme, das Verdauungs- und das Immunsystem. Hier werden nicht nur Nährstoffe gespalten und dem Organismus zugeführt, der Darm hat außerdem eine herausragende immunologische Bedeutung: das Darmimmunsystem muss in der Lage sein, pathogene Substanzen und Organismen zu eliminieren. Dabei muss es zwischen körpereigenen und fremden Zellen/Substanzen bzw. zwischen schädlich und unschädlich unterscheiden. Eine erste „Verteidigungslinie“ sind physiologische Barrieren wie das Schleimhautepithel, bestimmte pH-Bedingungen oder Temperaturen, die das Eindringen und Überleben von Pathogenen im Organismus inhibieren. Unter normalen Bedingungen ist die Darmmukosa von einer Vielzahl von mononuklearen Immunzellen bevölkert, was durch die anhaltende Stimulation mit luminalen Antigenen hervorgerufen wird. Dieser Zustand von „physiologischer“ Inflammation ist streng kontrolliert, und eine angemessene lokale Immunantwort wird durch die Interaktion verschiedener mukosaler Immunzellen aufrechterhalten. Des Weiteren muss das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT, engl.: gut associated lymphoid tissue) fortwährend zwischen pathogenen Mikroorganismen und harmlosen Antigenen, die durch die Nahrung und nützliche Bakterien präsentiert werden, unterscheiden. Im Folgenden sollen die Mechanismen und Zellen des Immunsystems, insbesondere des intestinalen Immunsystems, näher vorgestellt werden. Dabei soll vor allem auf Mechanismen der oralen Toleranz und Vorgänge bei der Immunsisierung, wie bei chronisch entzündliche Darmerkrankungen, eingegangen werden.

1.1. Das Immunsystem

Eine erste Einteilung des Immunsystems kann in angeborenes und in adaptives bzw. erworbenes Immunsystem erfolgen. Beim angeborenen Immunsystem wird die Immunantwort durch Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und das Komplementsystems vermittelt. Dabei werden hoch konservierte, mikrobielle Kohlenhydrate und Lipide, so genannte MAMP (engl.: microbe-associated molecular patterns), von einer limitierten Anzahl keimbahnkodierter, mustererkennender Rezeptoren erkannt (Janeway und Medzhitov, 2002). Das angeborene Immunsystem ist der erste Schritt zur Bekämpfung von gefährlichen Substanzen und Keimen, der innerhalb kürzester Zeit stattfindet, jedoch limitiert ist durch die enorme Vielfalt von Liganden und die Bildung neuer Moleküle.

Das adaptive Immunsystem generiert seine Immunantworten durch spezialisierte Antikörper und aktivierte Lymphozyten. Diese können auf spezifische und neuartige Antigene reagieren.

1.1.1. Mechanismen des adaptiven Immunsystems

Das adaptive Immunsystem kann in zwei weitere Gruppen eingeteilt werden, die humorale und die zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort ist benannt nach dem lateinischen Wort für Plasma, „humores“. Hierbei vermitteln Antikörper die Immunantwort auf drei verschiedene Arten:

- (I) Neutralisation von kleinen Antigenen (z.B. bakterielle Toxine oder Viren) durch Antikörper (Immunglobuline, Ig) mit anschließender Phagozytose durch Makrophagen.
- (II) Opsonisierung, ein Mechanismus bei dem IgG₁-, IgE- Antikörper und verschiedene Komplementmoleküle an ein Antigen binden, was in einer erhöhten Phagozytose resultiert.
- (III) Aktivierung des Komplementsystems durch IgM-, IgG- und IgA- Antikörper. Diese erkennen verschiedene Antigene mit geringer Affinität, binden dadurch an Bakterien oder fremde Proteine und formen einen Antigen-Antikörper-Immunkomplex (Übersicht in Nielsen, 2005). Dieser Bindung von Antikörpern auf der Bakterienoberfläche folgt eine Akkumulation von Komponenten des Komplementsystems. Dadurch wird ein Poly-C9-Membran-Attack-Komplex gebildet, der die Bakterienwand perforiert, was die Lyse des Bakteriums zur Folge hat. Überreste des zerstörten Bakteriums werden durch Makrophagen phagozytiert.

Die zelluläre Immunantwort basiert auf der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und antigen-präsentierenden Zellen (APZ). APZ sind spezialisierte Zellen, die ein Antigen phagozytieren, prozessieren und danach den T-Lymphozyten präsentieren. Solch eine Präsentation erfolgt nur, wenn das präsentierte Peptid einen Komplex mit MHC-(Haupthistokompatibilitätskomplex; engl.: Major Histocompatibility Complex) Molekülen bildet. MHC Klasse I-Moleküle können auf allen kernhaltigen Zellen gefunden werden, was Erythrozyten ausschließt. Diese Moleküle präsentieren hauptsächlich endogene Proteine, z.B. nach Virenbefall. MHC Klasse I-Moleküle interagieren dann mit zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten, was in der Zerstörung der infizierten Zelle resultiert.

CD4⁺ T-Zellen, können nur durch APZ aktiviert werden, die MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zusammen mit den entsprechenden Antigenfragmenten exprimieren. Zu den APZ gehören B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC, engl.: dendritic cells). DC spielen eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation, was auf ihre Fähigkeit zurückzuführen ist, in den Paracortex der Lymphknoten einzuwandern und dort naive T-Zellen zu stimulieren. DC haben spezielle fingerähnliche Strukturen, die es ihnen ermöglichen, fremde Antigene aufzunehmen und diese zusammen mit MHC Klasse II-Molekülen zu präsentieren. APZ können CD4⁺ Zellen allerdings nur dann aktivieren, wenn auch gleichzeitig verschiedene kostimulatorische Moleküle auf ihrer Zelloberfläche präsentiert werden. Solche Moleküle sind z.B. CD40 oder CD80/86 die mit dem CD40-Liganden oder CD28/CTLA-4 auf den T-Lymphozyten interagieren, aber auch CD44 variante Isoformen mit immer noch unbekanntem Liganden (Wittig, 1999 oder Übersicht in Wittig, 2002).

Das adaptive Immunsystem muss stets die schwierige Aufgabe bewältigen, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden. Diese Entscheidung kann darin resultieren, dass das adaptive

Immunsystem in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen involviert ist. Zu solchen Krankheiten gehören chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Multiple Sklerose und rheumatische Arthritis.

1.1.2. T-Lymphozyten

Es gibt verschiedene Subpopulationen von T-Zellen, die in naive T-Lymphozyten, Helfer-T-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten, Gedächtnis-T-Lymphozyten und regulatorische T-Lymphozyten eingeteilt werden können. Alle unterscheiden sich in ihrer Funktion und in der Expression von spezifischen Rezeptoren und Zytokinen.

1.1.2.1. Naive T-Lymphozyten

Naive T-Zellen produzieren keine Zytokine und hatten noch keinen Kontakt mit einem Antigen. Sie sind in der Lage durch den Blutstrom und lymphatische Gewebe zu wandern, um in Kontakt mit APZ zu treten. Nachdem sie Kontakt mit einem für ihren T-Zell-Rezeptor spezifischen Antigen hatten, beginnen sie zu proliferieren und differenzieren zu Effektor-T-Lymphozyten. Bis jetzt ist noch unklar, ob naive T-Zellen in der Lage sind, parallel sowohl zu Effektor- als auch Gedächtniszellen zu proliferieren oder ob sich Gedächtnis-T-Lymphozyten aus Effektor-T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln.

1.1.2.2. Helfer-T-Lymphozyten

Helfer-T-Lymphozyten (T_H -Lymphozyten) haben die Aufgabe, andere Lymphozyten, Zellen des angeborenen Immunsystems und Nicht-Immunzellen wie Epithelzellen zu aktivieren und/oder zu rekrutieren um eine schnelle Beseitigung von Pathogenen zu ermöglichen (Reiner, 2007). Alle T_H -Zellen exprimieren das Oberflächenmolekül CD4 und werden unter anderem durch Interaktion mit dem MHC Klasse II-Molekül auf APZ aktiviert (siehe auch 1.1.3.). Helfer-T-Zellen können ebenfalls in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. Dies geschieht anhand ihres Zytokinsekretionsmusters (Tab. 1.1.). Anfänglich wurden zwei Typen von Helfer-T-Zellen definiert, die Helfer-T-Zellen Typ 1 (T_H1) und Helfer-T-Zelle Typ 2 (T_H2) (Mosmann et al., 1986).

T_H1 -Effektor T-Lymphozyten exprimieren vornehmlich Interleukin (IL)-2, Interferon gamma ($IFN-\gamma$) und Lymphotoxin (LT)- α (Zhu and Paul, 2008). Die Bildung von T_H1 -Zellen wird induziert durch IL-12, ein Zytokin das von aktivierten Dendritischen Zellen, aber auch von Makrophagen gebildet wird. Die Bildung von IL-12 durch die APZ wird angeregt durch bakterielle Liganden, z.B. unmethyliertes CpG und LPS (Lipopolysaccharid) (Reiner, 2007). T_H1 -Lymphozyten sind von großer Bedeutung bei der Verteidigung gegen Viren, kanzerogene Zellen und intrazelluläre Bakterien, im

Besonderen Mykobakterien. Sie rekrutieren vornehmlich Makrophagen und sind beteiligt an verschiedenen akuten und chronischen Inflammationsprozessen, spielen aber auch eine Rolle bei der DTH (engl.: delayed-type-hypersensitivity), einer inflammatorischen „Überempfindlichkeits“-Reaktion nach erneutem Kontakt mit dem Antigen und vorausgegangener Sensibilisierung (Kobayashi et al., 2001). Obwohl bei einer Vielzahl von Autoimmunkrankheiten die neu entdeckten T_H17 Lymphozyten verantwortlich zu sein scheinen, wird T_H1 -Zellen immer noch die Beteiligung an der Induktion einiger Autoimmunkrankheiten zugeschrieben (Zhu and Paul, 2008). So zeigten verschiedene Experimente, dass $IFN-\gamma$ eine „pathogene“ Funktion bei diversen Tiermodellen von Autoimmunkrankheiten einnimmt, wie z.B. die experimentelle Uveitis und Diabetis.

T_H2 -Zellen produzieren, neben anderen Zytokinen, vor allem IL-4, IL-10, IL-13 und IL-5. IL-4 ist zudem das T_H2 polarisierende Zytokin, weshalb man auch von einem positiven Feedback-Mechanismus spricht. Da APZ kein IL-4 exprimieren, ist noch unklar, welcher Zelltyp die Polarisierung von T_H2 -Lymphozyten initiiert. Es wird jedoch vermutet, dass Zellen des angeborenen Immunsystems dabei eine bedeutende Rolle spielen (Corthey, 2006). T_H2 -Zellen vermitteln die Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten und Würmer und regen B-Zellen an IgM und IgG - Antikörper zu produzieren. Durch ihre Fähigkeit, einen IgE-Klassen-Switch in B-Zellen zu induzieren und Zytokine freizusetzen, die allergie-assoziierte Zellen wie Eosinophile rekrutieren, haben T_H2 -Lymphozyten einen großen Einfluss bei der Entwicklung von Allergien (Coffman et al., 1989; Mattes und Foster, 2003).

Obwohl schon länger bekannt ist, dass einige aktivierte $CD4^+$ Zellen IL-17 produzieren, wurde erst in jüngster Zeit ein neuer Subtyp von Helfer-T-Zellen entdeckt, die so genannten T_H17 -Zellen. Diese produzieren neben IL-17 auch IL-17F, IL-6, $TNF-\alpha$ und Osteopontin. Die Entdeckung dieser Population von Helfer-T-Lymphozyten erfolgte in murinen Modellen verschiedener Autoimmunerkrankungen (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005). Neben organspezifischen Autoimmunerkrankungen spielt dieser Helfer-T-Zell-Typ auch eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Prozessen gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze. Untersuchungen zur Induktion von IL-17 produzierenden Zellen im humanen bzw. murinen Organismus führten bisher zu konträren Ergebnissen (Romagnani, 2008). Im menschlichen Organismus sind IL-1 und IL-23, ein Mitglied der IL-12 Familie, wahrscheinlich verantwortlich für die Bildung von T_H17 -Zellen. Im murinen Organismus wird vermutet, dass $TGF-\beta$ (Transformierender Wachstumsfaktor β , engl.: transforming growth factor) und IL-6 notwendig sind um T_H17 -Lymphozyten zu induzieren. IL-23 dient dabei eher der Stabilisierung und verstärkten Ausbildung dieser Subpopulation (Bi et al., 2007; Stritesky et al., 2008).

Helfer-T-Zellen sind nicht nur in der Lage durch Zytokine positive Feedback-Mechanismen zu induzieren, die Produktion solcher Mediatoren inhibiert außerdem die Differenzierung der anderen Helfer-T-Zell-Subtypen (Paul und Seder, 1994).

Tabelle 1.1.: Übersicht der verschiedenen Subpopulationen von Helfer-T-Lymphozyten

GATA bindendes Protein 3 – GATA-3; Interleukin – IL; Interferon – IFN; Lymphotoxin – LT; Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: transforming [tumor] growth factor) – TGF; Helfer-T-Lymphozyt - T_H; Tumornekrosefaktor – TNF; T-Zell-spezifischer T-Box Transkriptionsfaktor – T-bet; Retinoid-Related Orphan Rezeptor Gamma – ROR γ t; Signal Transducers and Activators of Transcription – STAT; adaptiert von Zhu und Paul [2008]

| T_H-Typ | Induziert durch | Regulierender Transkriptionsfaktor | Produzierte Zytokine | Protektive Rolle | Schädliche Einwirkungen | Suppression von |
|--------------------------|---|---|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| T _H 1 | IL-12, IFN- γ | T-bet, STAT4 | IL-2, IFN- γ , LT- α | Intrazelluläre Pathogene | Systemische Erkrankungen, organische Autoimmunerkrankungen | T _H 2, T _H 17 |
| T _H 2 | IL-4, IL-2 | GATA-3, STAT5 | IL-4, IL-10, IL-13, IL-5 | Extrazelluläre Parasiten und Würmer | Allergien und Asthma | T _H 1, T _H 17 |
| T _H 17 | <u>murin:</u> IL-6, TGF- β <u>human:</u> IL-23, IL-1 | ROR γ t, STAT6 | IL-17, IL-6 IL-17F, TNF- α , IL-22 | Extrazelluläre Bakterien und Pilze | Autoimmunerkrankungen, Krebs | T _H 1, T _H 2 |

1.1.2.3. Zytotoxische T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, engl.: cytotoxic T-Lymphocyte) erkennen infizierte Körperzellen und zerstören diese. Dieser Mechanismus ist vor allem bedeutend, wenn Zellen von Viren befallen oder maligne transformiert sind. Die Interaktion zwischen CTL und infizierten Zellen ist sehr spezifisch und geprägt durch engen Kontakt. Dies ist besonders wichtig, um eine Zerstörung von nicht infizierten Nachbarzellen oder des CTL zu verhindern. Um eine infizierte Zelle zu zerstören, setzen zytotoxische T-Zellen lösliche Proteine wie Perforin und Granulozym frei, die Poren in der Zelloberfläche der betroffenen Zellen bilden, oder induzieren den programmierten Zelltod (Apoptose) (Stinchcombe und Griffiths, 2003). CTL sind meist CD8 positive Zellen. Es gibt zwei Arten von Immunantworten, die durch CD8⁺ T-Lymphozyten generiert werden: die Helfer-T-Zellen abhängige und unabhängige CTL-Antwort. Dies hängt vermutlich von der entzündlichen Natur des Antigens ab, könnte aber auch auf die Häufigkeit von Vorläufern zurückzuführen sein. Generell wird angenommen, dass Hilfe notwendig ist, wenn das Antigen keine inflammatorische Antwort auslöst, während bei einer entzündlichen Reaktion keine zusätzliche Hilfe benötigt wird (Behrens et al., 2004).

1.1.2.4. Gedächtnis T-Lymphozyten

Gedächtnis T-Lymphozyten sind Teil des immunologischen Gedächtnisses. Sie sind in der Lage, bei einer wiederholten Infektion eine Immunantwort zu generieren, die schneller und effektiver ist als die Primärantwort. Dies ist zurückzuführen auf spezifische Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, die den Zellen erlauben in entzündete Gewebe und sekundäre Lymphorgane einzuwandern. Man unterscheidet zwei Arten von Gedächtnis-T-Zellen: Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM} engl.: central memory T-lymphocytes) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM} engl.: effector memory T-lymphocytes). T_{EM} wandern in die entzündete Region, in der sie eine Effektor-Funktion erfüllen und gehören auch deshalb zum protektiven Teil des immunologischen Gedächtnisses. Sie exprimieren hauptsächlich Chemokin-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die für das Einwandern, das so genannte „Homing“, zum Ort der Entzündung notwendig sind (Sallusto et al., 2004).

T_{CM} gehören zum reaktiven Gedächtnis. Sie wandern in die sekundären Lymphorgane und proliferieren und differenzieren dort. Weitere Merkmale der T_{CM} sind die Hochregulierung des CD40-Liganden. Dieser Ligand ermöglicht eine positive stimulierende Rückkopplung für B-Zellen und DC, und induziert die Produktion von IL-2 sowie, nach Proliferation, von IL-4 und IFN- γ . T_{EM} sind überwiegend $CD8^+$ Zellen, während T_{CM} vor allem zu $CD4^+$ Zellen proliferieren (Sallusto et al., 2004).

1.1.2.5. Regulatorische T-Lymphozyten

Regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}) erfüllen regulierende Funktionen im Immunsystem und können verschiedene Immunantworten inhibieren um immunologische und Selbst-Toleranz aufrecht zu erhalten (Sakaguchi, 2000). Sie erfüllen ihre supprimierende Funktion sowohl durch Zell-Zell-Kontakte als auch durch die Freisetzung regulierender Zytokine wie TGF- β oder IL-10.

Die am besten untersuchten Typen von T_{reg} -Zellen sind die natürlichen und induzierten $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -Zellen (nT_{reg} bzw. iT_{reg}) (Übersicht in Sakaguchi, 2004 und Shevach, 2002). Etwa 10% der $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie sind $CD4^+CD25^+$ T_{reg} (Sakaguchi et al., 1995). Neben der IL-2 Rezeptor α -Kette CD25, sind sie vor allem durch die Expression von CTLA-4 (engl.: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), einem hoch-affinen Rezeptor für CD28, gekennzeichnet (Read et al., 2000). Während nT_{reg} im Thymus entstehen, erfolgt die Bildung von iT_{reg} *de novo* in Abhängigkeit von TGF- β in der Peripherie (Yamagiwa et al., 2001; Chen et al., 2003). $CD4^+CD25^+$ T_{reg} werden durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (engl.: forkhead box P3) charakterisiert (Fontenot et al., 2003). Ein Fehlen dieses Transkriptionsfaktors resultiert in Autoimmunkrankheiten, allergischen Fehlfunktionen und anderen lymphoproliferativen Krankheiten, die sich in dem sogenannten „Scurfy“ Mausmodell manifestieren (Godfrey et al., 1991; Brunkow et al., 2001). Im humanen Organismus liegt eine Mutation im FOXP3 Gen bei 60% der Patienten mit dem IPEX (engl.: immune dysfunction/

polyendocrinopathy/ enteropathy/ X-linked) Syndrom, einer homologen autoimmunen lymphoproliferativen Erkrankung, zugrunde (Bennett et al., 2001).

Wie schon erwähnt, können regulatorische T-Zellen aus peripheren CD4⁺ T-Lymphozyten, aber auch CD8⁺ T-Lymphozyten entstehen, abhängig von den qualitativen und quantitativen Unterschieden im Antigenkontakt und dem Zytokinmilieu. Dies führt zur Entstehung von regulatorischen T-Zellen, die nicht den klassischen CD4⁺CD25⁺ T-Zell-Phänotyp besitzen, wie zum Beispiel T_H3-, T_R1- und FoxP3⁺CD8⁺ suppressive T-Zellen. T_H3-Zellen produzieren TGF-β, ein anti-inflammatorisches Zytokin, das das Zellwachstum inhibiert (Weiner, 2001), während T_R1-Zellen die Proliferation von anderen T-Lymphozyten über einen IL-10 abhängigen Mechanismus hemmen (Groux et al., 1997). FoxP3⁺CD8⁺ suppressive T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Toleranz von Transplantaten, indem sie mit APZ interagieren (Manavalan et al., 2004).

Vielen Studien über regulatorische T-Lymphozyten beschäftigen sich derzeit mit der Frage, wann und wo regulatorische T-Zellen bei entzündlichen Krankheiten eingesetzt werden können.

1.1.3. Antigenpräsentation, kostimulatorische Moleküle und der Ovalbumin (OVA)-spezifische T-Zellrezeptor

Zur Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten durch APZ sind 2 Signale notwendig: (I) die Interaktion zwischen MHC Klasse II-Molekülen und dem T-Zellrezeptor (TCR, engl.: T-cell-receptor) und (II) die Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen. Die Bindung von Zytokinen, welches auch als drittes Signal bei der Aktivierung von T-Lymphozyten gewertet werden kann, legt die Ausbildung des CD4⁺ T-Zell-Subtypen fest (Corthey, 2006).

Der Kontakt zwischen dem spezifischen TCR und dem MHC Klasse II-Molekül mit darin eingebundenen Peptidfragmenten setzt eine Tyrosin-Phosphorylierungs-Kaskade in Gang, die verschiedene Folgereaktionen in der Zelle auslöst und somit eine Immunantwort generiert. Während der Interaktion zwischen TCR und MHC-Komplex wird eine spezifische Verbindung geformt, die sogenannte immunologische Synapse (Grakoui et al., 1999). Funktion dieser immunologischen Synapse ist es, den TCR und MHC-Komplex innerhalb der Kontaktstelle zu fixieren und anzureichern, um eine zu geringe Affinität des TCR gegenüber des MHC oder eine zu geringe Anzahl von MHC auf der APZ zu überwinden (Lee et al., 2003). Hierfür formen der T-Zellrezeptor und der MHC eine ringförmige Struktur, genauer gesagt ein zentrales Cluster, innerhalb der Membran der T-Zelle bzw. der APZ, die von einem Ring aus Proteinen wie z.B. CD4 und CD28 auf der T-Zelle umgeben ist. CD4 interagiert dabei mit dem MHC Klasse II-Molekül und CD28 mit B7 (CD80/CD86) auf der APZ (Abb. 1.1.). Diese Proteine sind essentiell für die Zell-Aktivierung und gelten somit als kostimulatorische Signale (Lee et al., 2003; Stinchcombe und Griffiths, 2003). Neben der Interaktion von TCR mit MHC Klasse II-Molekülen sind kostimulatorische Moleküle das zweite Signal, dass von der APZ induziert wird und

die Produktion von Zytokinen und die Proliferation stimuliert. Sie sind notwendig um eine anhaltende Aktivierung der T-Zelle auszulösen.

Meistens bestehen $CD4^+$ TCR aus zwei Glykoprotein-Ketten, einer TCR α - und einer TCR β -Kette. Diese beiden Ketten formen ein Heterodimer, das über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Das Heterodimer erkennt Peptide, die von MHC Klasse II präsentiert werden. TCR sind des weiteren nicht-kovalent mit 4 verschiedenen Polypeptiden assoziiert (CD3 γ , δ , ϵ , und ζ) (Call und Wucherpfennig, 2005). Die Interaktion des TCR/CD3 Komplexes mit dem MHC/Antigen Komplex aktiviert die assoziierten Tyrosinkinase-Kaskaden. Dies führt zur Expression von Zytokin-Rezeptoren, Sekretion von Zytokinen und weiteren Differenzierungsprozessen.

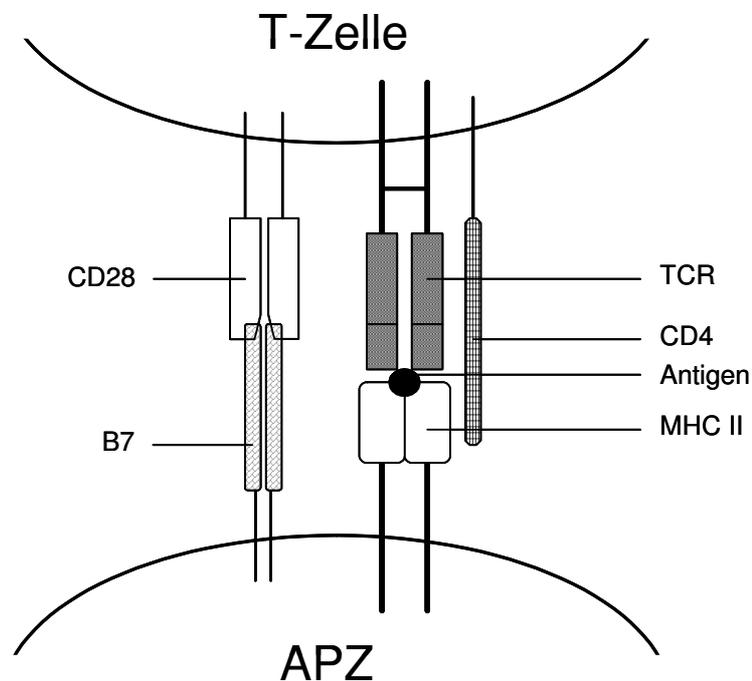


Abbildung 1.1.: Interaktion zwischen einer T-Zelle und einer antigen-präsentierenden Zelle (APZ)

Der spezifische T-Zell-Rezeptor (TCR) interagiert mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) und darin integrierten Antigenfragment. Für die Zell-Zell-Erkennung und die Aktivierung der Zellen sind spezielle Signale notwendig, wie z.B. die Interaktion von CD4 mit MHC II oder die Interaktion von B7 auf der APZ mit CD28 auf der T-Zelle. Adaptiert von Murphy et al. [2008]

Ovalbumin (OVA) ist ein häufig genutztes Protein um die antigen-spezifische Immunantwort in der Maus zu beobachten. Es ist dafür besonders gut geeignet, da es ein Neo-Antigen für die Maus ist. In OVA-TCR transgenen Mäusen exprimieren bis zu 97% der T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche, der spezifisch das OVA Peptid 323-339 erkennen kann, wenn es durch das MHCII I-A^d Protein präsentiert wird (McFarland et al., 1999). Dieser spezielle TCR kann mit Hilfe des spezifischen Antikörpers KJ1-26 nachgewiesen werden (Murphy et al, 1990).

1.1.4. CD44v7

CD44 fungiert als kostimulatorisches Molekül zwischen APZ und T-Lymphozyten und wird nach der Interaktion von CD40 und dessen Liganden CD40-L hochreguliert (Guo et al., 1996). Dies geschieht unabhängig von der Expression von CD28. CD44 gehört zu den transmembranen Glykoproteinen und ist involviert in eine Vielzahl von Zellfunktionen. Dazu gehören Zell-Matrix-Interaktion, Apoptose, Zellmigration und Zellaktivierung. In seiner Funktion als Adhäsionsmolekül bindet es Bestandteile der extrazellulären Matrix, vor allem Hyaluronsäure, Kollagen, Fibronektin oder Laminin.

Die CD44 prä-mRNA besteht aus 20 Exons, wobei mindestens 10 davon posttranslational durch alternatives Spleißen herausgeschnitten werden können (Abbildung 1.2.) (Günthert, 1993).

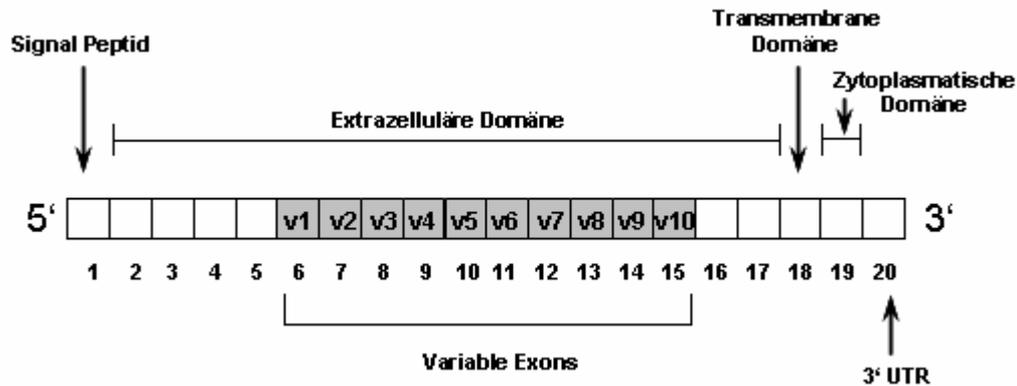


Abbildung 1.2.: Genomische Struktur von CD44
Adaptiert von Gee et al. [2004]

Die kleinste Isoform ist bekannt als CD44 Standard (CD44s), bestehend aus einem zytoplasmatischen Schwanz, einer Transmembran-Region, einem Stamm und der amino-terminalen Domäne. Bei dieser Isoform werden alle varianten Regionen v1–v10 bzw. Exon 6 bis 15 herausgeschnitten. Bei den varianten Isoformen werden nur einzelne Exons herausgeschnitten, so dass unterschiedlich lange Isoformen exprimiert werden. Diese Prozessierung und die Expression verschiedener Isoformen erfolgen im Rahmen der Zelldifferenzierung und -transformation und sind spezifisch reguliert (König et al., 1998).

CD44s wird auf einer Vielzahl von Zellen epithelialen und hämatologischen Ursprungs exprimiert, während die Expression der varianten Isoformen auf bestimmte Stadien der Zellaktivierung beschränkt ist. Über die genaue Funktion und eventuelle Liganden der varianten Isoformen ist bisher nur wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass viele Funktionen von CD44 und seinen varianten

Isoformen durch die Bindung und Präsentation von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren an ihre verwandten Oberflächenrezeptoren bzw. Substrate erfüllt werden (Ponta et al., 2003).

Auf die Funktion von CD44v7 während entzündlicher Erkrankungen, im Speziellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wird in Abschnitt 1.3.4. genauer eingegangen.

1.2. Das Darmimmunsystem

Der Säugetierdarm setzt sich zusammen aus dem Dünndarm und dem Dickdarm. Zu den Aufgaben des Darmes gehört die Aufbereitung des Speisebreis durch Nahrungsenzyme, die Aufnahme der gespalteten Nahrungsbestandteile und die Ausscheidung von Exkrementen. Des Weiteren ist der Darm ein Ort andauernder Antigenpräsentation, und Lymphozyten, die dort aktiviert werden, können systemisch zirkulieren und an anderen mukosalen Oberflächen wirken. Neben der Bekämpfung von pathogenen Organismen, ist es vor allem die Aufgabe des intestinalen adaptiven Immunsystems, schädliche entzündliche Immunantworten zu unterdrücken und immunregulierend zu wirken. Dies erfordert eine strenge Kontrolle der Immunantwort im Darm und geschieht unter anderem durch die vermehrte Bildung von IgA₂ Antikörpern, die eine Aktivierung des Komplementsystems unterbinden. Des Weiteren sind vermehrt regulatorische T-Zellen innerhalb des Darmimmunsystems zu finden, die vor allem die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β produzieren (Groux und Powrie, 1999) sowie weitere spezialisierte T-Zellen mit immunregulatorischen Funktionen (Poussier und Julius, 1994).

1.2.1. Das Spezielle an der Antigenaufnahme und -präsentation im Darm

Obwohl oft angenommen wird, dass die Haut den häufigsten Kontakt mit dem externen Milieu hat, wird dies von der mukosalen Oberfläche um ein Vielfaches übertroffen. Täglich kommt das mukosale Immunsystem mit einer Vielzahl von Proteinen und Mikroorganismen in Kontakt. Das intestinale Immunsystem und das damit assoziierte Gewebe GALT kann in ein organisiertes Gewebe, das einem Aktivierungsort für die Immunantwort ähnelt, und einem Effektorort, mit einzeln verstreuten lymphoiden Zellen innerhalb des Epitheliums und der Lamina propria, unterteilt werden (Mowat, 2003).

Aktuell werden verschiedene Mechanismen für die Antigenaufnahme in den Darm beschrieben (Abbildung 1.3.). Zum einen wird angenommen, dass Antigene über spezifische Enterozyten des Follikel-assoziierten Epithels, so genannte „microfold“ Zellen (M-Zellen), in die Peyer'schen Plaques (PP) gelangen, wo sie von professionellen APZ phagozytiert werden (Newberry und Lorenz, 2005). Antigene werden dabei mit Hilfe von zytoplasmatischen Vesikeln durch die M-Zellen transportiert und an der Basalmembran an die APZ abgegeben (Abbildung 1.3.A). Nach Antigenaufnahme wandern die APZ innerhalb der PP in Richtung der T-Zell-Zone, wo sie mit naiven T-Zellen in Kontakt treten

und diese zu Effektor-T-Lymphozyten aktivieren. Nachdem die naiven T-Zellen aktiviert wurden, wandern diese in die mesenterialen Lymphknoten (mLN, engl.: mesenteric lymph nodes), wo sie weitere Differenzierungsschritte durchlaufen. Abschließend wandern sie über den Ductus Thoracicus durch den Blutstrom in die Mukosa, genauer gesagt in die Lamina propria (LP), wo sie akkumulieren (Salmi und Jalkanen, 2005).

Eine weitere angenommene Methode zur Aufnahme von luminalen Antigenen verläuft über die transepithelialen Dendriten (Abbildung 1.3.B). Dabei exprimieren Dendritische Zellen Tight-junction-Proteine, die es ermöglichen ihre Dendriten zwischen epithelialen Zellen zu inserieren, ohne das Epithelium dabei zu zerstören (Rescigno et al., 2001). Diese Methode ist M-Zell-unabhängig und scheint ein effektiver Weg zu sein, Antigene aus dem Darmlumen aufzunehmen und die Immunantwort gegen Bakterien zu erhöhen (Niess et al., 2005). Es wird angenommen, dass die Ausbildung von transepithelialen Dendriten auf das terminale Ileum beschränkt ist. Scheinbar spielen die durch diesen Mechanismus antigen-beladenen intestinalen Dendriten eine wichtige Rolle bei dem Transport von bakteriellen Antigenen in die mLN (Milling et al., 2005). So wird vermutet, dass diese DC, unabhängig von den PP, direkt in die mLN wandern.

Des Weiteren wird angenommen, dass lösliche Antigene über parazelluläre bzw. transzelluläre Wege durch die Epithelzellen gelangen können und dann innerhalb der Lamina propria mit T-Zellen und Makrophagen interagieren (Chehade und Mayer, 2005) (Abbildung 1.3.C).

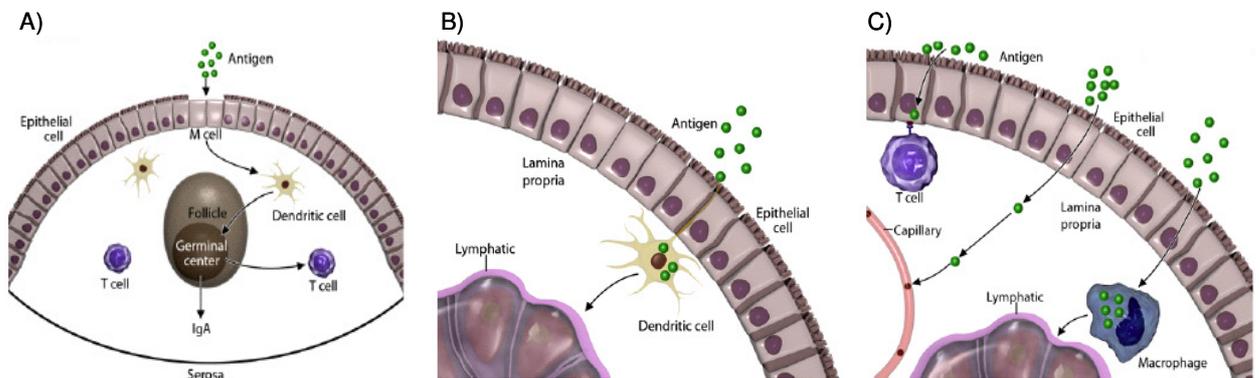


Abbildung 1.3.: Antigenaufnahme im Darm

Es wird angenommen, dass Antigene aus dem Lumen durch spezifische Enterozyten, sogenannten M-Zellen, in die Peyer'schen Plaques gelangen, wo sie von Dendritischen Zellen aufgenommen werden (A), bzw. dass sie von transepithelialen Dendriten direkt aus dem Lumen aufgenommen werden (B). Es wird außerdem vermutet, dass lösliche Antigen mittels zellulärem Transport direkt durch Enterozyten in die Lamina propria gelangen, wo sie in Kontakt mit T-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen treten (C). Adaptiert von Burks et al. [2008]

Während die T-Lymphozyten innerhalb des GALT aktiviert werden, ändert sich ihr Expressionsmuster, so dass sie spezifisch in die Mukosa einwandern können. Diese Rezirkulation an ihren Effektorort wird durch die Interaktion von Selektinen auf der T-Zelle mit mukosalen Adressinen ermöglicht. Einige T-Lymphozyten zeigen zum Beispiel eine gesteigerte Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf der Zelloberfläche. $\alpha_4\beta_7$ interagiert direkt mit MAdCAM-1 (engl.: mucosal addressin cell-adhesion molecule 1), einem Adhäsionsmolekül auf den hochendothelialen Venulen des Darmes (Berlin et al., 1993; Hamann et al., 1994). Diese Interaktion ermöglicht die spezifische und selektive Einwanderung von T-Lymphozyten in die Lamina propria und andere mukosale Gewebe (De Keyser et al., 1996). T-Zellen, die innerhalb des GALT aktiviert wurden und dann in die Mukosa einwandern, unterscheiden sich in der Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen. Allerdings scheinen nicht alle Lamina propria und intraepithelialen Lymphozyten den Zellen zu entsprechen, die nach Induktion in den Peyer'schen Plaques in die Effektorkompartimente des intestinalen Immunsystems einwandern. Darauf weisen Untersuchungen an Mäusen hin, die nach genetischer Mutation keine Peyer'schen Plaques oder Lymphknoten ausbilden, aber dennoch Lamina propria Lymphozyten und intraepitheliale Lymphozyten besitzen (Nanno et al., 1994).

1.2.2. Intestinale Makrophagen

Die am häufigsten vorkommenden Phagozyten innerhalb von Geweben sind die Makrophagen, auch „Fresszellen“ genannt. Makrophagen werden je nach Lokalisation verschieden benannt, d.h. verschiedene Gewebsmakrophagen haben eine unterschiedliche Bezeichnung mit entsprechender Funktion (z.B. Kupffer-Zellen in der Leber oder Mikroglia-Zellen im zentralen Nervensystem) (Kumar und Jack, 2006). Mit Hilfe spezifischer Rezeptoren sind sie in der Lage, vom Komplementsystem opsonierte Pathogene zu erkennen, diese zu phagozytieren und eine Immunantwort zu induzieren. Durch die Expression des MHC Klasse II-Moleküls zählen sie zu den APZ und sind in der Lage $CD4^+$ T-Lymphozyten zu aktivieren (s. 1.1.3). Während der Entzündungsreaktion setzen aktivierte Makrophagen Mediatoren frei, die eine Schwellung des Gewebes, eine erhöhte Durchblutung und den Einstrom weiterer Effektorzellen in das Gewebe bewirken. Des Weiteren sind sie für die Beseitigung von gealterten, zerstörten und/oder apoptotischen Zellen verantwortlich. Vorläufer aller Gewebsmakrophagen sind die Monozyten, die sich aus myeloiden Vorläuferzellen innerhalb des Knochenmarks entwickeln. Myeloide Vorläuferzellen wiederum gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor (Schenk und Mueller, 2007).

Das Darmsystem weist die größte Anzahl an Makrophagen im humanen Organismus auf (Lee et al., 1985). 10-20% aller mononukleären Zellen in der Lamina propria sind Makrophagen (Bull und Bookman, 1977). Dabei findet man sie vor allem an Orten mit hoher Antigenaufnahme, wie die subepitheliale Region der LP oder das Domepithel der Peyer'schen Plaques (Schenk und Mueller,

2007). Das Besondere an intestinalen Makrophagen ist, dass sie nicht in der Lage sind zu proliferieren. Aus diesem Grund ist ein kontinuierlicher Nachschub von Monozyten aus dem Blut notwendig (Gendelman et al., 1988), die dann zu intestinalen Makrophagen mit den spezifischen Eigenschaften differenzieren. Beim Gesunden weist der intestinale Makrophagen-Phänotyp unter Einfluss von IL-10 und TGF- β eine reduzierte bzw. keine Expression von verschiedenen Rezeptoren bzw. Oberflächenmolekülen, wie z.B. CD14, CD89, CD80 und CD40 auf (Rugtveit et al., 1997; Smith et al., 2001). Dadurch können sie zwar MAMP wie z.B. LPS erkennen, aber keine kostimulatorischen Signale generieren und keine pro-inflammatorischen Antworten induzieren. Dennoch sind intestinale Makrophagen in der Lage, effiziente phagozytotische Aktivität vorzuweisen und bakterizid zu wirken. Dies alles unterstreicht die Bedeutung der Funktion der intestinalen Makrophagen bei der Erhaltung der Gewebshomöostase (Smith et al., 2005).

Kommt es jedoch zu einer Entzündung der intestinalen Mukosa, wie z.B. bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, ändern sich der Phänotyp und das Expressionsmuster von intestinalen Makrophagen. Es kommt zu einer Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, die in intestinale Makrophagen differenzieren, die dann aber eine erhöhte Expression von CD40, CD80, CD89 und CD14 (Rogler et al., 1997; Rugtveit et al., 1997) aufweisen. Diese aktivierten intestinalen Makrophagen sind in der Lage, als APZ zu fungieren und eine Immunantwort durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen zu generieren (Hausmann et al., 2002).

1.2.3. Orale Toleranz

Immunologische Toleranz wird definiert als ein Mechanismus durch den das Immunsystem pathologische Autoreaktionen, d.h. Reaktionen gegen den eigenen Körper verhindert. Durch den Mechanismus der somatischen Rekombination ist der humane Organismus theoretisch in der Lage eine Vielzahl von T-Zellrezeptoren zu bilden, die wiederum jedes mögliche Antigen erkennen könnten. Dabei kommt es auch zur Entstehung von TCR, die Antigene des eigenen Körpers erkennen. Diese autoreaktiven T-Zellen müssen zerstört bzw. inaktiviert werden, um Schäden des eigenen Organismus bis hin zu Autoimmunkrankheiten abzuwehren. Dies wird verhindert durch verschiedene Toleranzmechanismen, wovon die orale Toleranz eine spezielle Form ist.

Das Besondere der oralen Toleranz ist, dass sie kontinuierlich durch exogene Antigene gefördert und aufrechterhalten wird. Sie wird klassisch definiert als spezifische Suppression von zellulärer und/oder humoraler Immunantwort auf ein Antigen, nachdem es oral verabreicht wurde (Faria und Weiner, 2005). Diese Unempfindlichkeit/Nichtreaktivität ist systemisch, und die Immunreaktion unterbleibt auch wenn nachfolgend das Antigen auf einer nicht oralen Route verabreicht wird (z.B. subkutane Injektion). Orale Toleranz ist ein aktiver immunologischer Prozess bei dem mehrere Mechanismen involviert sind. Wie wir auf ein Antigen reagieren, das oral verabreicht wird, ist abhängig von der Art und Dosis des Antigens, vom Immunsystem des Individuums, von mukosalen Adjuvantien und vom

Zytokinmilieu, in dem das Antigen präsentiert wird (Weiner, 2001). Der Mechanismus der oralen Toleranz ermöglicht es dem Immunsystem, sich auf die Abwehr von Antigenen, die eine Bedrohung darstellen, zu beschränken (Hyun and Barrett, 2006). Dadurch wird eine Immunreaktion gegen Nahrungsantigene und die im Darm vorherrschenden nützlichen Organismen verhindert.

Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass eine niedrige Dosis eines verabreichten Antigens eine aktive zelluläre Regulation zur Folge hat. Dies wird durch antigen-spezifische und -unspezifische regulatorische T-Lymphozyten realisiert, die regulatorische Zytokine wie TGF- β , IL-10 und IL-4 sezernieren (Miller et al., 1992).

Hoch-Dosis-Gaben eines Antigens fördern eher Anergie (Melamed und Friedman, 1993) und/oder Deletion von Effektorzellen. Verabreicht man ein Antigen in hohen Dosen, kann es leichter die Darmwand passieren und ein geringer Teil direkt der systemischen Zirkulation zugeführt werden, wo es eine systemische T-Zell-Anergie induziert. Dies wird realisiert durch die Ligation des TCR in Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals (Appleman und Boussiotis, 2003). Der Zustand der Toleranz durch anerge, d.h. nicht-reaktive, Zellen konnte jedoch *in vitro* aufgehoben werden durch die Zugabe von rekombinantem IL-2 (Melamed und Friedman, 1994). Klonale Deletion von Effektorzellen wird erreicht durch FAS-vermittelte Apoptose (Chen et al., 1995).

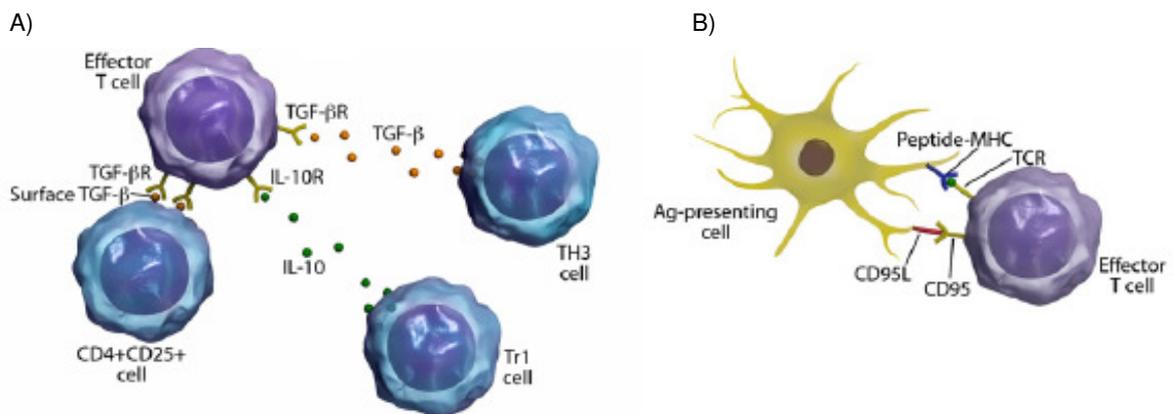


Abbildung 1.4.: Mechanismen der Toleranzinduktion

(A) Niedrig-Dosis-Gabe eines Antigens induziert Toleranz durch aktive zelluläre Reaktionen von regulatorischen T-Zellen mittels Sekretion von Zytokinen wie TGF- β , IL-10 und IL-4. (B) Hoch-Dosis-Gabe fördert die Anergie/klonale Deletion von Lymphozyten durch Ligation des T-Zellrezeptors in Abwesenheit des kostimulatorischen Signals bzw. durch FAS-vermittelte Deletion. Adaptiert von Burks et al. [2008].

Es gibt jedoch Hinweise, dass eine solch strikte Unterteilung nicht vorgenommen werden kann und dass beide Mechanismen sich überschneiden (Garside und Mowat, 2001).

Den Mechanismus der oralen Toleranz machten sich verschiedene Forschergruppen schon zunutze. So konnte in diversen Mausmodellen von Autoimmunkrankheiten durch Gabe von spezifischen Antigenen die Krankheit geheilt beziehungsweise deren Symptome stark vermindert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer von antigen-spezifischen regulatorische T-Lymphozyten, sowie der Transfer von Serum aus antigen-gefütterten Mäusen, in unbehandelte Mäuse die Ausbildung einer DTH bzw. von experimentellen Autoimmunkrankheiten verhindern kann (Chehade and Mayer, 2005).

Obwohl orale Toleranz auch im Menschen zu finden ist, zeigten erste klinische Vorversuche kaum Erfolge im humanen Organismus. Dabei wurden z.B. Multiple Sklerose-Patienten bovines Myelin-Basis-Protein bzw. Rheuma-Patienten Kollagenase II verabreicht (Greenberg und Calabresi, 2008; Barnett et al., 1998). Zwar konnte eine Zytokinregulation sowie eine Suppression am Anfang der Krankheit gezeigt werden, dennoch war keine effektive Unterdrückung oder gar Heilung der Krankheit nachweisbar (Faria und Weiner, 2006).

Vorteile einer Toleranzinduktion als Therapiestrategie wären die einfache Verabreichung der Antigene und das reduzierte Risiko einer Toxizität im Vergleich zu andere Behandlungsmethoden.

1.3. Die pathologische Immunantwort im Darmimmunsystem

Wie schon erwähnt, erfüllt der Gastrointestinaltrakt nicht nur die Aufgaben der Resorption, sondern nimmt mit 70% auch den größten Teil des Immunsystems ein. Trotz der strengen Kontrolle des Immunsystems im Darm, kann es in einigen Fällen zu einer Unterbrechung der homöostatischen Balance und somit zu pathologischen Immunantworten kommen. Dazu gehören die Nahrungsmittelallergie, die Zöliakie und die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Als Nahrungsmittelallergie wird eine adverse Immunreaktion gegen Nahrungs-Allergene bezeichnet, die ungefähr 6-8% der Kinder und ca. 2% der Erwachsenen betrifft (Sampson, 1999). Sie muss unterschieden werden von der Nahrungsmittelintoleranz, einer abnormalen, physiologischen Reaktion ohne immunologische Ursache (Johansson et al., 2004). Nahrungsmittelallergien können in IgE-vermittelte und nicht-IgE-vermittelte Immunreaktionen unterteilt werden (Ferreira und Seidmann, 2007). IgE-Antikörper-vermittelte Nahrungsmittelallergien zeigen einen sofortigen Ausbruch der Symptome. Es werden Mastzellen und basophile Granulozyten aktiviert. Die Bindung von IgE-Antikörpern an das Allergen sorgt für eine Freisetzung von Mediatoren, die für Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Durchfall verantwortlich sind. Im schlimmsten Fall könnten Patienten einen lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock erleiden, eine schnelle Reaktion mit Versagen des Herz-Kreislauf-Systemes. Nicht-IgE-vermittelte, auch zellvermittelte Nahrungsmittelallergien genannt, werden durch T-Lymphozyten ausgelöst und zeichnen sich durch chronische Symptome wie Durchfall aus. Eine Nahrungsmittelallergie könnte aber auch aus einer vermischten Reaktion von IgE- und zellvermittelter Allergie hervorgehen (Ferreira und Seidmann,

2007). In den meisten Fällen sind Nahrungsmittelallergene wasserlösliche Glykoproteine. Kinder reagieren am häufigsten auf Kuhmilch, Hühnereiweiß, Nüsse und Sesamsamen. Häufig verschwinden die Allergien gegen Kuhmilch und Hühnereiweiß mit zunehmendem Alter. Allergischen Reaktionen gegen Nüsse und Sesamsamen bleiben hingegen meistens fortbestehen. Bei erwachsenen Menschen entwickeln sich vor allem Allergien gegen Fisch, Schalentiere und Nüsse, welche in den häufigsten Fällen persistent bleiben (Lack, 2008).

Bei der Zöliakie, auch Sprue genannt, handelt es sich um eine chronische Entzündung des Dünndarms, die durch in Nahrungsmitteln enthaltenes Gluten ausgelöst wird (Kagnoff, 2007). Gluten ist der wissenschaftliche Name für die in Weizen vorkommenden Proteine Glutenin und Gliadin. Die verwandten Proteine Hordein aus der Gerste bzw. Secalin aus Roggen können ebenfalls krankheitsauslösend sein. Patienten mit Zöliakie weisen spezifische Allele innerhalb des HLA (humanes Leukozytenantigen) Klasse II-DQ Genlokus auf. HLA Klasse II Gene kodieren die humanen MHC Klasse II-Moleküle. Zöliakie ist dabei eng mit dem Vorhandensein von DQ2- und DQ8-Heterodimeren assoziiert (Margaritte-Jeannin et al., 2004). Gluten hat einen hohen Prolin-Anteil der dafür sorgt, dass es schlechter durch proteolytische Enzyme gespalten wird und lange Peptidketten entstehen. Gleichzeitig werden Glutamine von Gewebs-Glutaminasen zu negativ geladenen Glutaminsäuren umgewandelt, welche aufgrund ihrer Ladung an DQ2 und DQ8 der MHC Klasse II-Moleküle binden, intestinale T-Zellen übermäßig stark aktivieren und so die Krankheit auslösen (Arentz-Hansen et al., 2000). Des Weiteren kann Zöliakie auch durch eine Reaktion gegen die körpereigenen Gewebs-Glutaminasen ausgelöst werden, die Komplexe mit desamidierten Gliadinen bilden und somit T-Lymphozyten aktivieren. Pathologische Veränderungen bei Zöliakie-Patienten sind der Verlust von Darmzotten, der Anstieg von intraepithelialen Lymphozyten und eine Krypten-Hyperplasie (Kagnoff, 2007). Daraus resultiert eine gestörte Resorption von Nähr- und Mineralstoffen, was zu chronischem Durchfall und Gedeihstörungen führen kann. Die einzige wirkungsvolle Therapie dieser Krankheit ist im Regelfall eine glutenfreie Diät.

Den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird im Folgenden ein eigener Abschnitt gewidmet (siehe 1.3.1).

1.3.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) handelt es sich, wie der Name schon nahelegt, um chronische, wiederkehrende entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts. CED betreffen mehr als 300.000 Menschen in Deutschland und mehrere Millionen Menschen weltweit. Die Ersterkrankung erfolgt häufig zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr, wobei auch jüngere Bevölkerungsgruppen betroffen sein können.

Obwohl die Forschung bis zum jetzigen Zeitpunkt viel zum Verständnis von CED beigetragen hat, bleiben viele Fragen vor allem im Hinblick auf die Immunpathologie noch unbeantwortet. Es wird

angenommen, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen von einer nicht ausreichenden oder übersteigerten mukosalen Immunantwort gegenüber Antigenen der intestinalen Flora und harmlosen Nahrungsantigenen herrührt. Bei einem Teil der Patienten konnte eine genetische Prädisposition festgestellt werden. Die am häufigsten auftretenden Formen von CED sind Kolitis ulzerosa und Morbus Crohn (MC) (Tabelle 1.2.). Bei beiden Krankheiten kommt es vor allem zu einer fehlgeleiteten CD4⁺ T-Zell-Aktivierung und Proliferation innerhalb der Mukosa (Übersicht in: Bouma und Strober, 2003). Die klinischen Charakteristika weisen viele Gemeinsamkeiten bei Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa auf. Diese sind Durchfall, starke abdominale Schmerzen, Darmblutungen, Fieber, Müdigkeit und Gewichtsverlust. Dennoch ist die zugrunde liegende Pathogenese bei beiden Krankheiten verschieden. Eine genaue Zuordnung der beteiligten T-Zell-Gruppen ist vor allem im menschlichen Organismus schwierig. Das Zytokinsekretionsmuster der Effektorzellen lassen im Menschen darauf schließen, dass bei MC eine T_H1/T_H17 ähnliche Immunantwort vorliegt, bei der Zellen eine gesteigerte Produktion von T_H1/ T_H17 typischen Zytokinen wie IL-2, IL-23, IL-17 und IFN γ aufweisen, während T_H2-Zytokine wie IL-13 vermehrt bei der Kolitis ulzerosa produziert werden (Fuss et al., 1996; Heller et al., 2005).

Tabelle 1.2.: Klinische und pathologische Merkmale von Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa
adaptiert von Jensen-Jarolim [2006]

| Morbus Crohn | Kolitis ulzerosa |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Läsionen im gesamten Magen-Darm-Trakt möglich • am häufigsten letzter Abschnitt des Dünndarms und der anschließende Dickdarm betroffen • Diskontinuierliche Entzündung der Darmwand („Pflastersteinrelief“) • Fissuren und Fisteln • Lymphoide Ansammlungen und Granuloma-Formung • verdickte Darmwand durch transmurale Entzündungen • Verdickung des mesenterialen Fettgewebes | <ul style="list-style-type: none"> • Chronische Entzündung der Kolon-schleimhaut • kontinuierliche Ausbreitung vom Rektum in tiefer gelegene Darmabschnitte • Pseudopolypen (zurückbleibende Schleimhaut-Darmwand zwischen zersetztem, entzündeten Gewebe) • mukosale und submukosale Ulzeration (Geschwürbildung) • erhöhtes Karzinomrisiko |

1.3.2. Morbus Crohn

Verschiedene Daten aus Mausmodellen deuten darauf hin, dass bei Morbus Crohn eine komplexe Pathologie aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und einem Defekt in der intestinalen Immuntoleranz vorliegt (Sands, 2007). Ursachen hierfür können eine Invasion von Mikroorganismen, eine Störung der angeborenen Immunität und/oder eine Störung der adaptiven Immunität sein. Eine Immunantwort gegen gewöhnliche mukosale Antigene wird generiert. Welche Ursache(n) genau dieses Ungleichgewicht der homöostatischen Bedingungen auslöst, ist jedoch noch unklar. Umwelteinflüsse wie Stress, Rauchen oder eine extreme Nahrungsumstellung können dabei eine auslösende Rolle spielen.

Wie schon erwähnt, spielen Bakterien eine besondere Rolle beim MC. Dies zeigt sich unter anderem in einer gewissen Wirksamkeit von Antibiotika bei der Behandlung von Patienten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Entzündungen des Darms verhindert werden, wenn transgene Mäuse unter keimfreien Bedingungen gehalten werden (Farrell und LaMont, 2002). Duchmann et al. (1995, 1996) zeigten, dass sowohl Mensch als auch Maus eine Toleranz gegenüber der eigenen Darmflora, nicht jedoch gegen Sonikate fremder Flora aufweisen und ein Verlust dieser Toleranz mit der Entwicklung von chronisch intestinalen Entzündungen im Zusammenhang steht.

Neben einer fehlgeleiteten Immunreaktion zeigten verschiedene Untersuchungen, dass auch eine genetische Prädisposition bei MC eine Rolle spielen könnte (Bonon und Cho, 2003; Barrett et al., 2008). Mannick et al. (2004) zeigten, dass eine Mutation im *CARD15* Gen, das NOD2 (Nucleotid Oligodimerisation Domain 2) kodiert, zur Pathogenese von MC bei einem Teil der Patienten beiträgt. Patienten die eine oder mehrere Mutationen innerhalb bestimmter Loci des Gens tragen, haben ein 3- bis 40-fach erhöhtes Risiko an MC zu erkranken. NOD2 ist ein zytosolischer Toxinrezeptor der auf peripheren Monozyten und Dendritischen Zellen exprimiert wird und an der Erkennung von bakteriellen Infektionen beteiligt ist. Ein Teil der Patienten mit einer *CARD15* Mutation weist eine verminderte Expression von α -Defensin, einem wichtigen Bestandteil der mukosalen antibakteriellen Barriere, durch Paneth-Zellen (Wehkamp et al., 2004) bzw. eine Metaplasie der Paneth-Zellen auf (Wong et al., 2000). Dennoch entwickeln NOD2 defiziente Mäuse keine spontane Kolitis (Strober et al., 2007).

Trotz der Tatsache, dass einige Mechanismen der Pathologie von Morbus Crohn identifiziert wurden, ist bzw. sind die genaue(n) Ursache(n) noch unbekannt.

1.3.3. Tiermodelle für experimentelle Kolitis

Verschiedene Tiermodelle wurden entwickelt um die Immunpathologie von CED zu klären. Dazu gehören (1) antigen-induzierte Kolitismodelle, (2) genetisch induzierte Modelle (Gen-Knock-out und transgene Tiermodelle) (3) chemisch- oder physikalisch-induzierte Tiermodelle, (4) der adoptive

Transfer von T-Zellen und (5) spontane Kolitismodelle (Hoffmann et al., 2002; Jurjus et al., 2004). Im Folgenden soll nur auf einige gut definierte Tiermodelle eingegangen werden.

Ein Tiermodell ist der adoptive Transfer von CD4⁺CD45RB^{high} Zellen in Mäuse mit severe combined immunodeficiency (SCID) oder Deletion im RAG 1 oder 2 Gen (Powrie et al., 1993; Ostanin et al., 2006). CD45RB^{high} ist ein Expressionsmarker für naive T-Lymphozyten. Im Gegensatz dazu exprimieren antigen-erfahrene Effektor-/Gedächtnis-T-Lymphozyten CD45RB^{low} (Mason und Powrie, 1990). Nach adoptiven Transfer von CD4⁺CD45RB^{high} Zellen entwickelten die Mäuse eine Kolitis mit Hyperplasie des Epitheliums, Zellinfiltraten in der LP und hohen Mengen an Zytokinen, die von T_H1 Lymphozyten produziert werden (Aranda et al., 1997). CD4⁺CD45RB^{high} naive T-Zellen reagieren dabei anscheinend ungehemmt auf Bakterienantigene und werden in der SCID bzw. RAG^{-/-} Maus, ohne eigene T- und B-Zellen, nicht von regulatorischen Zellen gehemmt (Powrie et al., 1994a). Diese Form der Kolitis kann durch Ko-Transfer von CD4⁺CD45RB^{low} Zellen verhindert werden (Morrissey et al., 1993; Powrie et al., 1994b).

In einem weiteren Modell konnte gezeigt werden, dass IL-10^{-/-} Mäuse eine schwere spontane Enterokolitis entwickeln (Kühn et al., 1993). Dies unterstreicht deutlich die bedeutende Rolle dieses regulierenden Zytokins während der intestinalen Immunantwort (Lindsay and Hodgson, 2001).

Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Induktion einer Kolitis unter Verwendung von Chemikalien ist der Gebrauch von Dextran Sodium Sulfat (DSS) und Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) (Okayasu et al., 1990). Neueste Ergebnisse zeigen, dass bei einer chronischen TNBS-Kolitis eine T_H1/T_H17 Antwort zugrunde liegt, während es bei einer DSS-Kolitis zu einem Übergang von einer T_H1/T_H17 Antwort im akuten Zustand zu einer T_H2 vermittelten Antwort im chronischen Verlauf kommt (Alex et al., 2009).

Einige Forscher haben sich schon mit der Entwicklung von antigen-spezifischen Kolitismodellen beschäftigt. Dafür benutzten sie sowohl SCID als auch RAG^{-/-} Mäuse, transferierten OVA-TCR positive T-Zellen und verabreichten ihnen OVA direkt oder OVA-produzierende *Escherichia coli* (*EcOVA*) um die Kolitis zu induzieren. Yoshida und seine Arbeitsgruppe (2001) transferierten OVA-exprimierende *E. coli* in Balb/c und SCID Mäuse, und waren dadurch in der Lage eine subakute Kolitis auszulösen. Dieses Kolitismodell zeigt alle typischen Zeichen einer Entzündung im Darm, unter anderem der Verlust von Becherzellen und die Zerstörung der Kryptenstruktur. Des Weiteren kommt es zu einem vermehrten Einstrom von mononukleären Zellen in die LP und die Submukosa, die vermehrt pro-inflammatorische Zytokine exprimieren, wie auch im Modell der Transferkolitis von CD4⁺CD45RB^{high} in immundefizienten Mäusen oder im Modell der IL-10^{-/-} Maus.

In einer anderen Studie wurden *EcOVA* in den Darm von RAG^{-/-} Mäusen verabreicht, nachdem diese OVA-TCR positive T-Zellen von DO11.10 Mäusen transferiert bekamen (Iqbal et al., 2002). Auch hier waren die Forscher in der Lage, eine schwere Kolitis mit den schon erwähnten Symptomen zu etablieren.

1.3.4. CD44v7 und chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Wie schon in 1.1.4. erwähnt, wird die kleinste CD44-Isoform (CD44s) auf einer Vielzahl von Zellen hämatopoetischen und epithelialen Ursprung exprimiert, während die Expression der varianten Isoformen meist auf bestimmte Stadien der Embryonalentwicklung bzw. Zellaktivierung beschränkt ist. So konnte z.B. die Bedeutung von varianten Isoformen bei der Tumorentstehung und Metastasierung im Rattenmodell gezeigt werden. Durch die Transfektion einer nicht-metastasierenden Zelllinie mit CD44v4-7 und CD44v6-7 bildeten sich Metastasen in syngenen Ratten (Günthert et al., 1991). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass T-Zellen und Makrophagen, die an Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind, Isoformen exprimieren, die CD44v3, v6 und v7 enthalten (Wittig et al., 2002). Es gibt Hinweise dafür, dass CD44v6 und v7 zu einer gesteigerten Immunantwort bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten beitragen (Günthert et al., 1998).

Im Gegensatz zu CD44s, das ubiquitär im gesundem Darm exprimiert wird, konnten Wittig et al. (1997) zeigen, dass CD44v7 hauptsächlich auf aktivierten Leukozyten innerhalb entzündeter Darmmukosa exprimiert wird. Die zentrale Rolle von CD44v7 in experimenteller Kolitis konnte durch den Einsatz von anti-CD44v7 Antikörpern unterstrichen werden, der zu einer kompletten Ausheilung von TNBS- und DSS-induzierter Kolitis führte (Wittig et al., 1998; Farkas et al., 2005). Keine Remission erfolgte durch die Verwendung von anti-CD44v6- und anti-CD44v4-Antikörpern. Überdies konnte gezeigt werden, dass die Deletion von CD44v7 die Ausbildung einer TNBS-induzierten Kolitis (Wittig et al., 2000) und die Entwicklung einer spontanen Enterokolitis bei Kreuzung von CD44v7^{-/-}-Mäusen mit IL-10^{-/-} Mäusen verhindert.

In allen experimentellen Kolutismodellen konnte durch den Einsatz von anti-CD44v7-Antikörpern bzw. durch die Deletion von CD44v7 eine erhöhte Apoptoserate in der entzündeten Darmmukosa nachgewiesen werden (Wittig et al., 2000). Hoffmann et al. (2007) konnten zeigen, dass Apoptose in aktivierten Lamina propria T-Lymphozyten und Makrophagen aus Morbus Crohn Patienten *in vitro* durch den Einsatz von anti-CD44v7-Antikörpern induziert werden kann. Die Fähigkeit Apoptose zu induzieren, war dabei hoch-spezifisch für CD44v7, da der Einsatz von anti-CD44v6- und anti-CD44v4-Antikörper keine Wirkung zeigte. Keine Apoptose konnte induziert werden in mononukleären Lamina propria Zellen von gesunden Individuen, isoliert aus nicht-entzündeter Mukosa von Morbus Crohn Patienten bzw. aus entzündeter Mukosa von Kolitis ulzerosa Patienten. Dies deutet darauf hin, dass CD44v7 eine entscheidende Rolle bei der Suppression der Apoptose während entzündlicher Darmerkrankungen spielt.

2. Zielstellung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind wiederkehrende, chronische Entzündungen des Gastrointestinaltraktes und betreffen mehrer Millionen Menschen weltweit, besonders innerhalb des westlichen Kulturkreises. Die zwei am häufigsten vorkommenden Erscheinungsformen sind Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa.

Da bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist, welche Faktoren genau und in welchem Umfang eine Rolle in der Immunpathologie bei CED spielen, wurde eine Vielzahl von Tiermodellen entwickelt, die alle einen bestimmten Aspekt dieser Krankheit beleuchten und viel zur Klärung offener Fragen beigetragen haben. Dennoch konnte bis heute kein universelles Modell entwickelt werden, das vollständig den Krankheitsverlauf von CED - im speziellen Fall Morbus Crohn - nachempfendet. Neben einer genetischen Prädisposition und Umwelteinflüssen wird vor allem davon ausgegangen, dass das Vorhandensein einer mukosalen Mikroflora eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von CED spielt, da Mäuse, die unter keimfreien Bedingungen gehalten werden, keine Entzündung entwickeln. Es wird daher vermutet, dass die Effektorzellen, die diese Krankheit hervorrufen, stimuliert werden durch mikrobielle Antigene, durch Nahrungsmittelantigene und/oder durch körpereigene Antigene, die mit der Mukosa kreuz-reagieren. Wahrscheinlich weisen regulatorische T-Zellen, die im Normalfall eine Entzündung verhindern, dieselbe Spezifität wie die Effektorzellen auf. Leider ist bisher unbekannt, welche Antigene genau diese Reaktionen hervorrufen.

CD44v7 gehört zu der CD44 Protein Familie und ist eine von vielen Isoformen, die durch post-translationales Spleißen der CD44 prä-mRNA entsteht. CD44v7 bindet als Adhäsionsmolekül Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie z.B. Hyaluronsäure und Osteopontin. Wittig und Kollegen (2002) konnten zeigen, dass CD44v7 auf Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert wird, die an Entzündungsprozessen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. CD44v7 wird zum Beispiel auf aktivierten T-Lymphozyten innerhalb entzündeter Darmmukosa exprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, welche Auswirkung das Vorhandensein von CD44v7 auf die Ausbildung einer experimentellen Kolitis hat, und ob dieses Molekül eine Rolle spielt bei der Ausheilung dieser Krankheit.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, in dem mit einem einzigen Modellantigen sowohl Immunisierung als auch Toleranz induziert werden kann. Somit wäre es möglich, die Bedeutung von CD44v7, als offensichtliches „Entzündungsmolekül“, bei der Entstehung oder Unterdrückung einer Entzündung und im gleichen System bei der Förderung einer regulierenden Immunantwort zu klären.

Als geeignetes Modell wurde das Ovalbumin (OVA)-spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) transgene Modell DO11.10 zugrunde gelegt. Für die Untersuchung des Einflusses von CD44v7 mittels knock-out Mäusen während einer solchen antigen-spezifischen Kolitis, sollte auf immundefiziente Mäuse bzw. genveränderte Bakterien verzichtet werden. Daher sollte ein neues Modell entwickelt werden, bei

dem eine Inflammation innerhalb der Mukosa von immunkompetenten Balb/c-Mäusen nach Transfer von OVA-TCR positive T-Zellen und intrarektaler Applikation von OVA induziert wird. Neben DO11.10 Mäusen als Zellspender und Balb/c Wildtyp Mäusen als Zellempfänger wurden auch CD44v7^{-/-} OVA-TCR positive Mäuse als Zellspender und CD44v7^{-/-} Mäuse als Zellempfänger eingesetzt.

3. Materialien

3.1. Geräte und Materialien

- BZ-8000K Mikroskop Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
- Einmalkanülen Braun-Melsungen, Melsungen, Deutschland
- ELISA Platten NUNC MaxiSorp™ NUNC, Wiesbaden, Deutschland
- ELISA Reader Spectra Mini AP TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
- FACS Röhrchen Falcon, Gräfelfing-Locham, Deutschland
- Gewebekulturflaschen versch. Größen Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Gewebekulturplatten 96-Napf NUNC, Wiesbaden, Deutschland
- MACS® Sorter Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- MACS®-Separationssäulen, Größe: LS Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Kolbenhubpipetten versch. Größen; 1,5 ml Tubes Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Nabelgefäßkatheter (2.5 F Polyvinylchlorid [end-hole] Katheter) Vycon, Ecoen, Frankreich
- Neubauer Zählkammer, 0,0025 mm² la fontaine, Waghäusel, Deutschland
- Oditest Längenmessgerät Kroeplin, Schlüchtern, Deutschland
- Praktika Luxmedia 5203 Digitalkamera Pentacon GmbH, Dresden, Deutschland
- Vier-Farben Laser Durchflusszytometer (FACS Calibur) BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Zellsiebe (40 und 70 µm Maschenweite) BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Zeiss Imager Z1 Axio Mikroskop Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Berlin, Deutschland

3.2. Allgemeine Reagenzien und Chemikalien

- Agarose Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Amphotericin B Biochrom Ag, Berlin, Deutschland

- β - Mercaptoethanol Merck, Darmstadt, Deutschland
- Blocking Reagenz PerkinElmer Lief Science, Waltham, USA
- Bicoll seperating solution (Ficoll) Biochrom Ag, Berlin, Deutschland
- Calciumchlorid (CaCl_2) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- DL-Dithiothreitol (DTT) Sigma, München, Deutschland
- DNase I Roche, Mannheim, Deutschland
- EDTA Sigma, München, Deutschland
- Ethanol (EtOH) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethidiumbromid Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- FCS (engl.: fetal calf serum) Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
- Fluoromount-G Southern Biotech, Birmingham, USA
- Formalin Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Gentamycin Biochrom Ag, Berlin, Deutschland
- Glyceringelatine Merck, Darmstadt, Deutschland
- HEPES Puffer PAA, Cölbe, Deutschland
- Incomplete Freud's Adjuvant (IFA) Sigma, München, Deutschland
- Isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) Fresenius Kabi, Bad Homburg v. d. Höhe , Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) Fluka, Buchs, Schweiz
- Kollagenase Typ VIII Sigma, München, Deutschland
- L-Glutamin PAA, Cölbe, Deutschland
- Natriumcarbonat (NaCO_2) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Paraffin Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Paraformaldehyd Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin PAA, Cölbe, Deutschland
- Percoll GE Healthcare, München, Deutschland
- Schwefelsäure (H_2SO_4) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tris Base Sigma, München, Deutschland
- Tris-HCl Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

- Trypanblau Fluka, Seelze, Deutschland
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.3. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

- PBS (engl.: Phosphate Buffered Saline) (pH~6,8)

| | |
|--|--------|
| Aqua dest. | |
| Kaliumchlorid (KCl) | 2,7 mM |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | 1,8 mM |
| Natriumchlorid (NaCl) | 137 mM |
| di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O) | 8,0 mM |
- Erythrozyten Lyse Puffer (pH 7,3)

| | |
|---|--------|
| Aqua dest. | |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | 166 mM |
| EDTA | 90 µM |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) | 10 mM |
- CFSE-Lösung

| | |
|-------------------------|-------|
| RPMI 1640 ¹⁾ | |
| CFSE | 10 µM |
- Kulturmedium

| | |
|---|------------|
| RPMI 1640 ¹⁾ | |
| FCS (30 min bei 56 ⁰ C hitzeinaktiviert) | 10 % (w/v) |
| L- Glutamin | 4 mM |
| Penicillin/Streptomycin | 1 % (v/v) |
| β- Mercaptoethanol | 50 µM |
| HEPES Puffer | 20 mM |
- HBSS Medium + Zusätze

| | |
|---|------------|
| HBSS (magnesium- und calciumfrei) ²⁾ | |
| Penicillin/Streptomycin | 1 % (v/v) |
| Gentamycin | 0,25 µg/ml |
| Amphotericin B | 27 nM |
| HEPES Puffer | 20 mM |
| EDTA | 2 mM |
| DTT | 1 mM |

| | | |
|----------------------------------|--|--------------|
| • Kollagenasemedium | RPMI 1640 ¹⁾ | |
| | FCS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert) | 5 % (v/v) |
| | Kollagenase Typ VIII | 100 U/ml |
| | DNaseI | 20 µg/ml |
| • FACS-Puffer | PBS | |
| | BSA | 0,5 % (w/v) |
| | NaN ₃ | 0,01 % (w/v) |
| • MACS-Puffer | PBS | |
| | BSA | 0,5 % (w/v) |
| | EDTA | 2 mM |
| • 0,5% TNB (pH 7,5) | Aqua dest. | |
| | Natriumchlorid (NaCl) | 0,2 M |
| | Tris-HCl | 0,1 M |
| | Blocking Reagenz | 0,5 % (v/v) |
| • TBS (Waschpuffer; pH 7,4 -7,6) | Aqua dest. | |
| | Tris-HCl | 43,5 mM |
| | Tris-Base | 7,5 mM |
| | NaCl | 0,15 M |
| | Tween 20 | 0,5 % (v/v) |
| • Waschpuffer für ELISA | PBS | |
| | Tween 20 | 0,05 % (v/v) |
| • Beschichtungspuffer für ELISA | Aqua dest. | |
| | Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | 85 mM |
| | Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) | 15 mM |
| • Assay Diluent | PBS | |
| | FCS | 10 % (v/v) |

1) basierend auf RPMI Medium (benannt nach Roswell Park Memorial Institute) von PAA, Cölbe, Deutschland

2) HBSS (engl.: Hank's balanced salt solution) magnesium- und calciumfrei von PAA, Cölbe, Deutschland

3.4. Spezifische Reagenzien und Chemikalien

3.4.1. Genomische DNA-Isolierung- und PCR-Reagenzien

- DNA Purification Kit Promega, Mannheim, Deutschland
- 25 mM Magnesiumchlorid Solution Promega, Mannheim, Deutschland
- 5x Green Go Taq ® Reaction Buffer Promega, Mannheim, Deutschland
- Proteinase K gelöst in: Promega, Mannheim, Deutschland
 - 50 mM Tris-HCL
 - 10 mM Calciumchlorid (CaCl₂)
- 10 mM dNTPs Mix Promega, Mannheim, Deutschland
- GoTaq ® Flexi DNA Polymerase Promega, Mannheim, Deutschland
- 50 mM OVA-TCR Strang (sense)- Tip Molbiol, Berlin, Deutschland
Oligonukleotidprimer:
CAA GCA CAT CGC AAC CA
- 50 mM OVA-TCR Gegenstrang (antisense)- Tip Molbiol, Berlin, Deutschland
Oligonukleotidprimer:
GCA ATT GCC TTG TCA GCA T
- Mouse/Rat GAPDH PCR Primer Pair R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

3.4.2. Antikörper, Nachweis- und Färbereagenzien

- Maus-anti-Maus-Ovalbumin-T-Zell-
Rezeptor (OVA-TCR)-Biotin-Konjugat,
(Klon KJ1-26; spezifisch gegen DO11.10 α - β -
T-Zell-Rezeptor) Verdünnung: 1:1000
Dankenswerterweise bereitgestellt von Ag Prof.
A. Hamann, Deutsches
Rheumaforschungszentrum (DRFZ), Berlin,
Deutschland
- Maus-anti-Maus **Ovalbumin-T-Zell**
Rezeptor (OVA-TCR)-PE-Konjugat (Klon
KJ1-26) 1 μ g / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Ratte-anti-Maus **CD4-PerCP-Konjugat** (Klon
L3T4) 1 μ g / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Ratte-anti-Maus **CD4-FITC-Konjugat** (Klon
L3T4) 1 μ g / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

- Ratte-anti-Maus **CD11b-PE**-Konjugat (Klon M1/70) 1 µg / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Ratte-anti-Maus **CD11c-APC**-Konjugat (Klon HL3) 1 µg / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Ratte-anti-Maus **CD14**-Konjugat (Klon Sa2-8) 1 µg / 10⁶ Zellen
eBioscience, San Diego, USA
- Ratte-anti-Maus **CD25-APC**-Konjugat (Klon PC61) 1 µg / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Ratte-anti-Maus **CD25-Biotin**-Konjugat (Klon PC61) 1 µg / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- **Streptavidin-PE**-Konjugat 1 µg / 10⁶ Zellen
DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
- **Streptavidin-APC**-Konjugat 1 µg / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- **Streptavidin-PerCP**-Konjugat 1 µg / 10⁶ Zellen
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- **FoxP3 staining Kit** (Ratte-anti-Maus **FoxP3-PE**-Konjugat [Klon FJK-16s]) 1 µg / 10⁶ Zellen
eBioscience, San Diego, USA
- Ratte-anti-Maus **F4/80-Antigen** unmarkiert (Klone BM8) Verdünnung: 1:50
eBioscience, San Diego, USA
- Ziege-anti-**Ratte-Ig**-Antikörper **Alexa555**-Konjugat Verdünnung 1:100
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Hase-anti-**Ratte-Ig**-Antikörper **Biotin**-Konjugat Verdünnung: 1:200
Dako, Hamburg, Deutschland
- Ratte-anti-Maus **FoxP3** unmarkiert (Klon FJK-16s) Verdünnung: 1:100
eBioscience, San Diego, USA
- **DAPI** (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Verdünnung: 1:1500
Roche, Mannheim, Deutschland
- **CFSE** (5-(und 6-) Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidylester) MoBiTech, Göttingen, Deutschland
- **Ovalbumin (OVA)-FITC**-markiertes Protein Dankenswerterweise bereitgestellt von AG Prof. B. Micheel, Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, Potsdam, Deutschland
- **anti-CD4** Microbeads Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

- Dako REAL™ Detection System K5005 Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- Dako REAL™ Antibody Diluent S2022 Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- DakoCytomation EnVision + System-HRP K4003 Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
- Dako REAL™ Detection System K5001 Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

3.4.3. Zytokine und ELISAs

- Murines Interleukin (IL)-12 PeproTech EC, London, England
- Maus Interferon (IFN)- γ -ELISA Kit BD OptEIA™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Maus IL-10-ELISA Kit BD OptEIA™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Maus IL-17-ELISA Kit eBioscience, San Diego, USA
- Substrat Reagenz A und B BD OptEIA™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

3.4.4. Proteine und Peptide

- Ovalbumin (OVA) Protein Sigma, München, Deutschland
- Bovines Serum Albumin (BSA) Protein Serva, Heidelberg, Deutschland
- OVA Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Aminosäuresequenz im IUPAC³⁾ – Einbuchstabencode: I S Q A V H A A H A E I N E A G R) Dankenswerterweise bereitgestellt von Dr. Peter Henklein, Institut für Biochemie, Charité Berlin, Deutschland

3) IUPAC = The International Union of Pure and Applied Chemistry

3.5. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden spezifisch keimfreie Balb/c Wildtyp, DO11.10 (OVA transgene [tg]), sowie CD44v7^{-/-} und CD44v7^{-/-} OVA tg Mäuse verwendet. DO11.10 Mäuse sind Tiere deren Großteil an T-Lymphozyten einen T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, der spezifisch das OVA Peptid 323-329 erkennen kann (Murphy et al., 1990). Diese Tiere wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Ursula Günther (Universität Basel) zur Verfügung gestellt und in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM, Berlin, Deutschland) gezüchtet oder stammten vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin, Deutschland). Die Haltung erfolgte innerhalb der FEM

unter standardisierten Bedingungen (12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus, Fütterung mit autoklaviertem Futter, Wasser ad libitum).

Alle Versuche wurden mit weiblichen 8-12 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch CO₂-Begasung und anschließender cervikaler Dislokation. Alle Tierversuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSO) genehmigt (G 0219/02 vom 22.10.2002). Die Durchführung der Experimente erfolgte durch qualifiziertes Personal.

4. Methoden

4.1. Genotypische Bestimmung der Versuchstiere

Zur genotypischen Bestimmung der Versuchstiere erfolgte das Abschneiden der Schwanzspitze 3 bis 4 Wochen nach der Geburt. Untersucht wurde, ob die Tiere spezifische T-Zellrezeptoren auf der Oberfläche ihrer T-Zellen tragen, die in der Lage sind, das spezifische OVA Peptid 323-339 zu erkennen. Dazu wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze isoliert, die gewünschte Sequenz mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, engl.: polymerase chain reaction) vervielfältigt und danach elektrophoretisch ausgewertet.

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des DNA Purification Kits von Promega. Der Verdau des Gewebes und der RNA, die Fällung von Proteinen sowie die abschließende Fällung der DNA wurden nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Erhaltene DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Jeweils 170 ng DNA in 20 µl Rehydration Solution wurden für die PCR verwendet.

Mit Hilfe der PCR wurde das Vorhandensein des OVA-TCR Transgens in den verwendeten Mäusen nachgewiesen. Dazu wurden genspezifische Primer (Sequenz siehe 3.4.1.) verwendet. Als Kontrolle erfolgte der Nachweis des sogenannten „housekeeping“ Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die Amplifikation der Sequenzen erfolgte in mehreren Zyklen. Ein solcher Zyklus wurde wie folgt durchgeführt:

| | | |
|------|---------------------|-----------------|
| 95°C | 1 Minute | (Denaturierung) |
| 55°C | 1 Minute | (Annealing) |
| 72°C | 1 Minute 3 Sekunden | (Extension) |

Solch ein Zyklus wurde 30-mal wiederholt und garantierte eine ausreichende Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz zur elektrophoretischen Auswertung. Die abschließende Extension dauerte 10 Minuten bei 72°C.

Ein PCR Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

| | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| 170 ng DNA in 20 µl | 1 µl Sense-Primer |
| 0,25 µl hitzestabile Taq Polymerase | 1 µl Antisense-Primer |
| 8 µl Green Go Taq® Reaction Buffer | 8 µl Magnesiumchlorid |
| 1 µl Desoxynukleosidtriphosphate | 20,75 µl Aqua dest. |

Die Überprüfung der vervielfältigten DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese. Hierbei laufen die DNA-Fragmente durch ein 1,5 %-iges Agarose-Gel, das sich in

einem elektrischen Feld befindet. Die negativ geladenen DNA-Fragmente bewegen sich dabei in Richtung Positiv-Pol und trennen sich aufgrund unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten auf. Kleinere Fragmente bewegen sich durch ihre geringere Größe und des daraus resultierenden geringeren Widerstandes schneller innerhalb des elektrischen Feldes als größere Fragmente. Eine Überprüfung der Fragmentgröße erfolgt mittels DNA-Leiter, die als Größenmarker mit definierten Fragmentgrößen mitläuft. Die durch die PCR erhaltenen DNA-Proben wurden in kleine Taschen innerhalb des 1,5 %igen Agarose-Gels pipettiert, das mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt war. Ein Versetzen der Proben mit zusätzlichem Laufpuffer konnte vernachlässigt werden, da der PCR-Puffer diesen schon beinhaltet. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt bei 120 Volt Gleichstrom für ca. 60 Minuten. Abschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und analysiert.

4.2. Zellisolation

4.2.1. Organentnahme

Zur Gewinnung von Zellen wurden die Tiere mittels CO₂-Begasung betäubt, durch zervikale Dislokation getötet und sezirt. Dazu wurde das Fell der Mäuse mit Alkohol desinfiziert und der Bauch-Brust Bereich bis zum Kinnansatz mit einer sterilen Schere longitudinal geöffnet. Zervikale, axiliäre, mesenteriale, inguinale und kaudale Lymphknoten und die Milz (s. Abbildung 4.1.) wurden je nach Versuchsablauf sorgfältig mittels steriler Schere und Pinzette herauspräpariert und in Kulturmedium bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.

Nach Beendigung der verschiedenen OVA-spezifischen Kolitis Modelle erfolgte zusätzlich die sterile Entnahme des Kolons. Der komplette Dickdarm wurde vom Anus bis zum Ceacum entfernt, der Länge nach vermessen und mit Hilfe einer Praktica Luxmedia 5203 Digitalkamera fotografiert. Danach wurde der Darm gesäubert und anschließend sowohl distal als auch proximal je ein ca. 2-3 mm langes Stück herausgeschnitten und in 4 % Paraformaldehyd für spätere histologische Untersuchungen fixiert. Je nach Versuchsablauf wurden zusätzlich oder alternativ Stücke des Dickdarmes in flüssigem Stickstoff eingefroren und für immunhistologische und Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet. Der Rest des Kolons wurde in gekühltem Kulturmedium bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

4.2.2. Isolation von Lymphozyten aus Lymphknoten

Isolierte Lymphknoten wurden einzeln durch ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite mittels eines Spritzenstempels gepresst und in Kulturmedium gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 450 x g wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Es erfolgte ein Einstellen der Zellen auf eine Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen pro ml Kulturmedium.

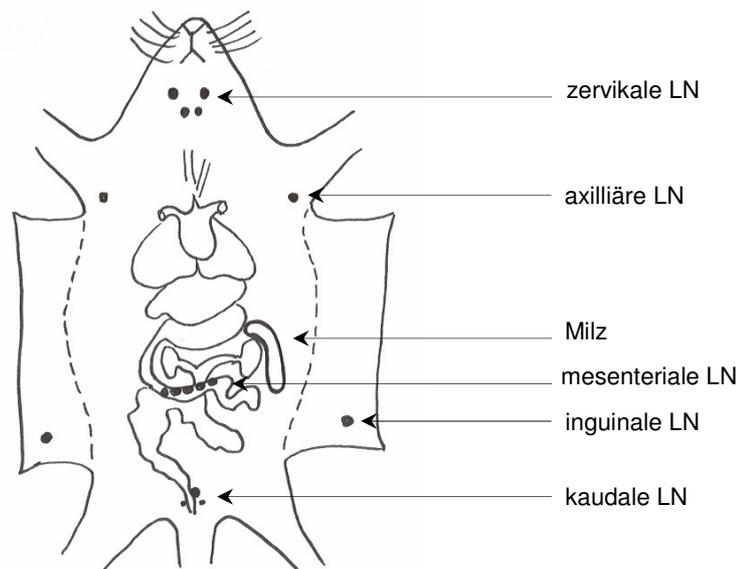


Abbildung 4.1.: Übersichtzeichnung der entnommenen Lymphknoten (LN) und der Milz

4.2.3. Isolation von Splenozyten

Mit einer Schere zerkleinerte Milzstücke wurden mittels eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (40 μm Maschenweite) gepresst. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium gewaschen und 5 Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Milzzellen wurden 3 Minuten in einer adäquaten Menge (5 ml je Milz) Erythrozyten Lysis Puffer (Raumtemperatur) inkubiert, gewaschen, 5 Minuten bei 450 x g zentrifugiert, in 20 ml Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Nach der Zählung erfolgte die Einstellung der Zellkonzentration auf 2×10^6 Zellen pro ml Kulturmedium.

4.2.4. Isolation von Lamina propria mononukleären Zellen

Die verbliebene Darmstücke wurden der Länge nach aufgeschnitten, von Fäzes gereinigt, in einer Petrischale mittels Skalpell zerkleinert und in 20 ml PBS aufgenommen. Nach einminütiger Zentrifugation bei 200 x g erfolgte das vorsichtige Abgießen des verbleibenden Fettes. Die restlichen Darmstücke wurden für 30 Minuten in 20 ml HBSS Medium + Zusätze bei 37°C geschüttelt. Das Medium wurde nach der Hälfte der Zeit gewechselt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 450 x g wurde der Überstand verworfen und die Darmstücken in 10 ml Kollagenasemedium aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 90 Minuten auf dem Schüttler. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Glaspipette über ein Zellsieb (70 μm Maschenweiten) in ein neues Tube überführt und mit 10 ml Kulturmedium gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 450 x g wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und mit 5 ml Percoll (100 %) unterschichtet. Es erfolgte eine Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation bei 1200 x g für 20 Minuten. Der Fettring über der Interphase

wurde vorsichtig entfernt und die Interphase (ca. 1 ml) in ein neues Tube überführt und mit 12 ml Kulturmedium aufgefüllt. Nach 8-minütiger Zentrifugation bei 650 x g wurden die Zellen erneut gewaschen und in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und auf 2×10^6 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt.

4.3. Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen 1:2 mit Trypanblau vermischt. Tote Zellen konnten durch Aufnahme dieses Farbstoffes identifiziert werden und wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

4.4. Zellkultur und Sortierung

4.4.1. Zellkultur und T_H1-Zellpriming

1×10^7 OVA-TCR positive Lymphknotenzellen wurden mit 2×10^7 Milzzellen in 15 ml Medium gemischt. Dadurch entstand ein Verhältnis von 1:3 zwischen antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und T-Zellen. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Zugabe von 75 µg OVA Peptid (Endkonzentration=5 µg/mL) und 150 ng Interleukin (IL)-12 (Endkonzentration=10 ng/mL). Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen inkubiert (37°C, 5 % CO₂-Gehalt, 95 % relative Luftfeuchtigkeit). Ein Splitting der Zellen und Auffüllen mit neuem Kulturmedium erfolgte nach 3 Tagen.

Nach 6 Tagen wurden die Zellen in Kulturmedium gewaschen und 10 Minuten bei 450 x g zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 20 ml Kulturmedium aufgenommen und mit 20 ml Ficoll unterschichtet. Da die Dichte von Ficoll identisch ist mit der von Lymphozyten und Monozyten kann mittels Dichtegradienten-Zentrifugation diese Zellpopulation gewonnen werden. Sie werden während der 25-minütigen Zentrifugation bei 1200 x g in der Interphase angereichert und als weiß-gelblicher Ring sichtbar. Erhaltene Leukozyten wurden vorsichtig abgenommen, mit Medium aufgefüllt und erneut bei 650 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in einer adäquaten Menge Kulturmedium (ca. 30 ml) aufgenommen und gezählt.

Eine Kontrolle der Antigen-Spezifität (OVA-TCR positiv) erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers (siehe 4.6.1.) und zeigte, dass die nach der Kultur erhaltenen T-Zellen zu 85-90 % OVA-TCR positiv waren. Der Nachweis, dass die Zellen Lymphozyten des Helferzell-Typs 1 waren, erfolgte mittels Interferon (INF)-γ ELISA (siehe 4.6.2.) mit einem durchschnittlichen Wert von $2081,4 \pm 350,7$ pg/ml IFN-γ in der Zellkultur am Ende der Kultivierungszeit.

Nach 6 Tagen Stimulation hatte innerhalb der Zellkultur nur ein geringer Teil der APZ Population überlebt. Durchflusszytometrische Analysen (siehe 4.6.1.) zeigten, dass der Anteil an Makrophagen

(CD14 positiv) ca. 2 % betrug. Der Transfer von antigen-präsentierenden Zellen ist auch zu vernachlässigen, wenn mit Tieren gearbeitet wurde, die den gleichen genetischen Hintergrund haben, wie z.B. bei DO11.10 und Balb/c Wildtyp Mäusen. Der Unterschied zwischen diesen Stämmen besteht nur im prozentualen Anteil an OVA-spezifischen TCR. Wurden jedoch als Zellspender oder Empfänger CD44v7^{-/-} Mäuse verwendet, dann erfolgte, je nach Versuchsansatz, die zusätzliche Sortierung der erhaltenen T_H1 Zellkulturen zu einer reinen CD4⁺ Population (siehe 4.4.2.).

4.4.2. CD4⁺ Zellsortierung

CD4⁺ T-Zellen können relativ schnell und einfach mit Hilfe von magnetischen Wechselwirkungen, dem sogenannten magnetic-activated cell sorting (MACS[®]), aufgereinigt werden. Dabei werden antikörper-konjugierte Magnetpartikel, so genannte Microbeads, verwendet, die sich an die spezifischen Zellen binden. So markierte Zellen werden dann über eine Trennsäule gegeben, die sich im Magnetfeld eines Hochleistungsmagneten befindet. Dadurch entsteht ein magnetisches Feld, das die Zellen mit haftenden Microbeads beim Hindurchlaufen zurückhält. Unmarkierte Zellen durchlaufen ungehindert die Säule (Negativfraktion). Die spezifisch markierten Zellen können außerhalb des Magnetfeldes durch Elution gewonnen werden. Aufbereitete Lymphknoten- und Milzzellen bzw. Zellen der T_H1-Kultur wurden gewaschen und 1×10^8 Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Diese wurden mit 100 µl CD4⁺ Microbeads pro ml Zellsuspension vermischt und 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und maximal 4×10^7 Zellen in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Jede MACS-Separationssäule (Größe: LS) wurde mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert bevor die 3 ml Zellsuspension zugeführt wurde. Danach wurden 5 ml reiner MACS-Puffer durch die Säule geführt um die Negativfraktion herauszuwaschen. Nach Entfernen der Trennsäule aus dem Magnetfeld wurde die CD4⁺ T-Zellfraktion mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Diese Suspension wurde für 5 Minuten bei 450 x g zentrifugiert, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und gezählt.

4.4.3. CFSE-Markierung

5-(6-) Carboxy-Fluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff mit dem Aussagen über die Proliferation gesunder Zellen getroffen werden können. Das Fluorescein-Derivat kann passiv die Zellmembran passieren und fluoresziert nicht. Nachdem es in eine Zelle diffundiert ist, werden die Azetat-Gruppen des CFSE innerhalb des Zytoplasmas durch zelluläre Esterasen abgespalten. CFSE kann nun nicht mehr durch die Zellmembran diffundieren und fluoresziert. Bei jeder Teilung der Zelle wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich erkennen, wie oft und wie stark sich eine Zellpopulation geteilt hat. Dies wird anhand verschiedener Banden im FACS-Histogramm sichtbar.

Erhaltene CD4⁺ Zellen wurden zweimal in reinem RPMI 1640 Medium gewaschen. Je 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml CFSE-Lösung für 10 Minuten in Dunkelheit inkubiert (RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal in 10 ml Kulturmedium gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation bei $450 \times g$ für 5 Minuten in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und gezählt.

4.5. Tierbiologische Arbeiten

4.5.1. Ovalbumin Präsentation im Darm

Um den Darm zu reinigen, wurden 300 µl PBS intrarektal mit Hilfe eines Gefäßkatheters für die Umbilikalvene des Embryos in den Darm von Balb/c Wildtyp, DO11.10 und CD44v7^{-/-} Mäuse verabreicht.

Ovalbumin (OVA)- FITC wurde anschließend in verschiedenen Konzentrationen (50 µg und 100 µg) in 200 µl PBS mit Hilfe eines weiteren Katheters intraluminal appliziert. Die Tötung der Mäuse und Entnahme des Dickdarmes erfolgte 10 min, 30 min bzw. 18 Stunden nach OVA- FITC Gabe.

4.5.2. Induktion von oraler Toleranz

5×10^6 DO11.10 CD4⁺ Zellen bzw. 5×10^6 CD44v7-deletierte OVA-TCR positive CD4⁺ Zellen wurden in 200 µl PBS aufgenommen und in Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert (intraperitoneale Injektion; d0). Daraus ergaben sich vier Untersuchungsgruppen mit mindestens vier Tieren je Versuch. Ein Schema des experimentellen Ansatzes ist in Abbildung 4.2. dargestellt. Die Hälfte der Tiere jeder Untersuchungsgruppe wurden von Tag 1 bis Tag 5 mit jeweils 20 mg OVA in 200 µl PBS gefüttert. Dies erfolgte mit Hilfe einer sterilen metallischen Schlundsonde, die vorsichtig in den Rachenraum der Mäuse eingeführt wurde, um das Schlucken der vollständigen Menge des OVA Proteins zu garantieren. Der anderen Hälfte der jeweiligen Versuchstiergruppe wurden 200 µl PBS mittels Schlundsonde oral appliziert (Kontrollen). Am Tag 6 wurden alle Mäuse mit 400 µg OVA Peptid immunisiert. Dieses wurde in 100 µl einer 1:1 Emulsion von PBS:IFA aufgelöst und subkutan in die Schwanzwurzel injiziert. IFA ist eine Emulsion aus Mineralölen und Wasser ohne Mykobakterien-Bestandteile, die die zellvermittelte Immunantwort stimuliert. Sieben Tage nach erfolgter Immunisierung wurden die Versuchstiere getötet und mesenteriale, inguinale und kaudale Lymphknoten entnommen. Diese wurden in Kulturmedium auf Eis bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

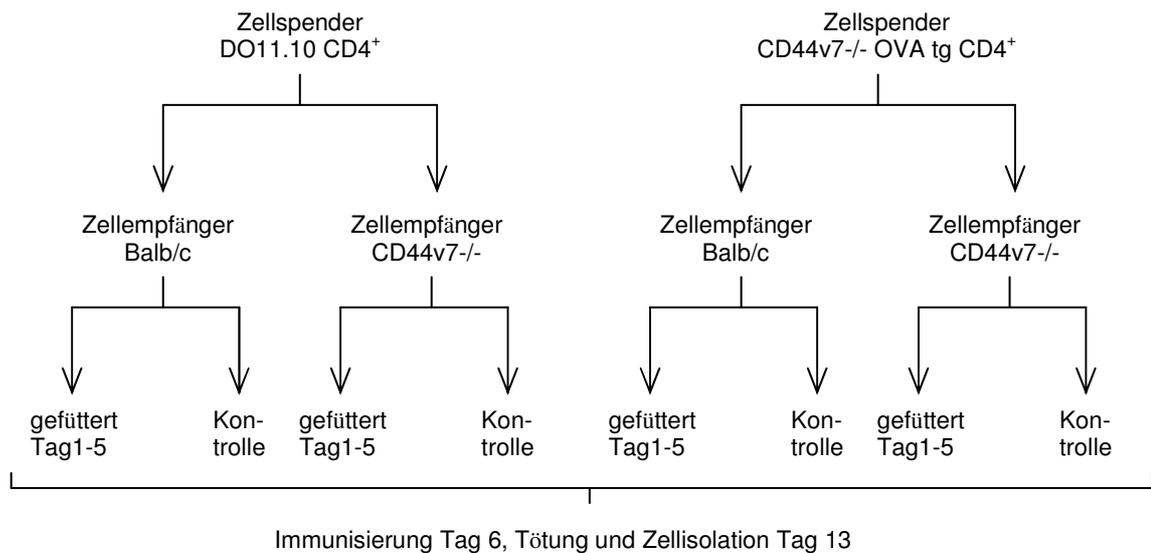


Abbildung 4.2.: Versuchsaufbau zur Induktion oraler Toleranz in Balb/c Wildtyp und CD44v7-/- Mäusen

T-Lymphozyten wurden aus DO11.10 bzw. CD44v7-/- OVA tg Mäusen isoliert, zu einer reinen CD4⁺ Population sortiert und in Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7-/- Mäuse transferiert. Die Hälfte der Mäuse wurde am Tag 1 und 5 mit 20 mg OVA in 200 µl PBS gefüttert, während die andere Hälfte nur 200 µl PBS erhielt. Alle Tiere wurden am Tag 6 mit 400 µg OVA Peptid immunisiert und am Tag 13 getötet.

4.5.3. Induktion einer DTH und Ohrschwellmessung

Zur Überprüfung der Induktion von oraler Toleranz wurde eine DTH (engl.: delayed type hypersensitivity) induziert. Dazu wurden 200 µg OVA in die linke Ohrmuschel injiziert. Das Protein war gelöst in 50 µl einer 1:1 Emulsion von PBS:IFA. Als Kontrolle diente die Injektion von 50 µl PBS:IFA in die rechte Ohrmuschel. Sowohl vor der Applikation des Proteins als auch 24 Stunden danach, wurde die Ohrdicke mit Hilfe eines Oditest Längenmessgerätes der Firma Kroepelin (Schlüchtern, Deutschland) bestimmt. Der Messbereich dieses Gerätes liegt bei 0-10 mm, die Skalenunterteilung bei 0,01 mm.

4.5.4. Induktion der OVA-spezifischen Kolitis

Zur Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis wurden je 1×10^7 DO11.10 T_{H1} Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und in Balb/c Wildtyp Mäuse transferiert (intraperitoneale Injektion; d0). Am Tag 1 wurden 100 µl Ethanol (50 % in sterilem Wasser) mit Hilfe eines Gefäßkatheters intrarektal in den Darm verabreicht. 2 Stunden nach der Ethanol-Behandlung erhielten die Mäuse ebenfalls intrarektal mittels eines neuen Katheters 40 mg OVA, das in 200 µl PBS aufgelöst war. Kontrollgruppen erhielten 40 mg BSA gelöst in 200 µl PBS. Diese Prozedur wurde am Tag 4 wiederholt. Um den

Krankheitsverlauf der Tiere zu untersuchen, wurde das Gewicht der Tiere während des gesamten Versuchsverlaufs mit einer Standardwaage gemessen. Die Versuchstiere wurden am Tag 6 getötet.

4.5.4.1. OVA-spezifische Kolitis im Langzeitversuch

Um zu untersuchen wie lange eine OVA-spezifische Kolitis aufrechterhalten werden kann, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. In einem ersten Ansatz wurde eine OVA-spezifische Kolitis wie in 4.5.4. beschrieben induziert und weitere Versuchstiere zusätzlich zu Tag 6 an den Tagen 8, 10, 13 und 16 getötet. In einem zweiten Ansatz wurden 1×10^7 DO11.10 T_H1 Zellen in 200 µl PBS am Tag 0, 6 und 12 intraperitoneal in Balb/c Wildtyp Mäuse injiziert. Die Induktion der Kolitis erfolgte am Tag 1, 4, 7, 10, 13, 16 und 18. Dazu wurden 100 µl EtOH (50 % in sterilem Wasser) mit Hilfe eines Nabelgefäßkatheters intraluminal in den Darm appliziert. Zwei Stunden später erfolgte die Gabe von 40 mg OVA in 200 µl PBS. Kontrolltiere erhielten 100 µl 50 % EtOH und 40 mg BSA gelöst in 200 µl PBS. Die Tiere wurden am Tag 19 getötet.

4.5.4.2. OVA-spezifische Kolitis in CD44v7^{-/-} Tieren

Um die Rolle von CD44v7 während der OVA-spezifischen Kolitis zu untersuchen, wurden sowohl CD44v7-deletierte OVA-TCR positive T_H1 Zellen in Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7^{-/-} Mäuse oder DO11.10 T_H1 Zellen in CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert. Dabei wurden 1×10^7 Zellen in 200 µl PBS pro Empfängertier intraperitoneal am Tag 0 injiziert. Die Zellen wurden entweder direkt nach der Zellkultur (siehe 4.4.1.) transferiert oder wie in 4.4.2. beschrieben über Mikro-Beads zusätzlich zu einer reinen CD4⁺ Population sortiert und dann injiziert.

Die Induktion der OVA-spezifischen Kolitis erfolgte wie zuvor beschrieben (s. 4.5.4.) durch intrarektale Gabe von 100 µl EtOH (50 % in sterilem Wasser) und 2 Stunden später 40 mg OVA gelöst in 200 µl PBS am Tag 1 und 4. Kontrollgruppen erhielten EtOH und BSA. Die Tötung der Tiere erfolgte am Tag 6.

4.5.4.3. OVA-spezifische Kolitis und orale Toleranz

1×10^7 DO11.10 T_H1 Zellen bzw. 1×10^7 CD44v7-deletierte OVA-TCR positive T_H1 Zellen wurden am Tag 0 mittels intraperitonealer Injektion in Balb/c Wildtyp Mäuse transferiert. Kolitis wurde am Tag 1 und 5, wie zuvor beschrieben (siehe 4.5.4.), mittels intrarektaler Gabe von EtOH und OVA induziert. Kontrollgruppen erhielten äquivalente Mengen EtOH und BSA. Die Induktion von oraler Toleranz erfolgte durch tägliche Fütterung von 20 mg OVA aufgelöst in 100 µl PBS. Die orale Gabe von OVA erfolgte zwischen Tag 2 und 4. Die Proteinlösungen wurden mittels einer sterilen

metallischen Schlundsonde oral appliziert. Die Tötung der Tiere erfolgte jeweils einen Tag nach der zweiten Kolitis-Induktion (Tag 6).

4.5.4.4. OVA-spezifische Kolitis und Modulation durch M1.1 und Galektin-2

M1.1 ist ein Fusionsprotein aus humanem IgM und den murinen CD44 Varianten v1-v10. Galektin-2 (Gal-2) gehört zur Familie der β -Galaktosidase-bindenden Tierlektine. Es wird angenommen, dass Galektine bedeutende Regulatoren der Immunzell-Homöostase sind und unter anderem auf die Zellproliferation, Zelladhäsion und den Zelltod regulierend einwirken (Paclik et al., 2008).

Nach Transfer von 1×10^7 DO11.10 T_H1 Zellen erfolgte die Induktion der OVA-spezifischen Kolitis in Balb/c Wildtyp Mäusen wie in 4.5.3. beschrieben am Tag 1 und 5 durch intraluminale Applikation von EtOH und OVA. BSA fungierte als Kontrolle. 200 μ g M1.1 gelöst in 100 μ l PBS wurden 2x täglich alle 12 Stunden intraperitoneal injiziert. Die intraperitoneale Injektion von Gal-2 (1 mg/kg Körpergewicht) gelöst in 100 μ l isotonischer Kochsalzlösung erfolgte ebenfalls alle 12 Stunden. Als zusätzliche Kontrolle diente die Injektion von 100 μ l PBS bzw. isotonischer Kochsalzlösung. Die Behandlung der Tiere erfolgte von Tag 2 bis 4. Die Mäuse wurden am Tag 6 getötet.

4.6. Immuntechnologische Arbeiten

4.6.1. Durchflusszytometrie

Zellen unterscheiden sich unter anderem aufgrund der Expression verschiedener Oberflächenantigene sowie von Antigenen innerhalb der Zelle. Diese können mit Hilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern in einem fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (fluorescence-activated cell sorter, FACS) aufgetrennt und analysiert werden.

Die Auftrennung der Zellen erfolgte innerhalb des 4 Farben Laser Durchflusszytometers FACSCalibur, die Analyse mit Hilfe von CellQuest™ Software der Firma BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland). Das Durchflusszytometer verfügt über einen 630 nm Dioden Laser und einen 488 nm Argonlaser, der Aussagen über bis zu sechs verschiedene Parameter erlaubt, dazu gehören Zellgröße und Granularität (FSC und SSC) und vier Fluoreszenzparameter (Tabelle 4.1.).

4×10^5 Zellen in 100 μ l PBS wurden pro Napf in eine 96 Napf Platte pipettiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Monoklonale Antikörper gegen CD4, CD11b, CD11c, CD14, CD25 und/oder OVA-TCR (KJ1-26) wurden je nach Untersuchungsansatz nach den Angaben des Herstellers verdünnt, 100 μ l appliziert und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 100 μ l FACS Puffer. Wurden biotinylierte Antikörper verwendet, musste in einem zweiten Schritt mit einer fluoreszenz-markierten Nachweis-Reagenz gegengefärbt werden. Dazu wurden 100 μ l Streptavidin-APC, -PE oder

-PerCP in entsprechender Konzentration für weitere 15 Minuten bei 4 °C zusammen mit den Zellen inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift, wurden die Zellen in 300 µl FACS Puffer resuspendiert und im FACSCalibur analysiert.

Tabelle 4.1.: Fluoreszenzparameter des FACSCalibur mit entsprechenden Fluorochromen und deren Absorptions- und Emissionsmaxima

| Fluoreszenz | Verwendete Fluorochrome | Absorptions-Maximum | Emissions-Maximum |
|-------------|--|---------------------|-------------------|
| 1 | FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) | 495 | 518 |
| 1 | CFSE (5-(und 6-) Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidylester) | 495 | 518 |
| 2 | PE (Phycoerythrin) | 488 | 575 |
| 3 | PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex) | 490 | 675 |
| 4 | APC (Allophycocyanin) | 640 | 660 |

Die Bestimmung des Transkriptionsfaktors FoxP3 erfolgte mit Hilfe des FoxP3 staining Kits der Firma eBioscience (San Diego, USA). Alle benötigten Reagenzien waren in dem Kit enthalten, und die Verdünnung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Gegen die Oberflächenantigene CD4 bzw. CD25 und OVA-TCR vorgefärbte Zellen wurden über Nacht (max.18 Stunden) mit Fixations-Permeabilisations-Puffer fixiert. Zweimaliges Waschen mit Permeabilisations-Puffer machte die Zellen durchlässig für den fluoreszenz-markierten Antikörper. Ein monoklonaler PE-markierter Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben verdünnt, auf die Zellen pipettiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 200 µl Permeabilisations-Puffer wurden die Zellen in 300 µl FACS Puffer aufgenommen und analysiert.

4.6.2. Nachweis sezernierter Zytokine durch enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (ELISA)

Enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (enzym-linked immunosorbent assay, ELISA) werden eingesetzt, um sezernierte Antikörper und Antigene mit hoher Genauigkeit und Spezifität nachzuweisen. Um zu untersuchen, welche Zytokine sezerniert wurden, erfolgte die Inkubation von isolierten Lymphozyten (2×10^6 Zellen pro ml) aus Lymphknoten bzw. Kolon oder von zerkleinerten Darmstücken als Organkultur über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit. Dazu wurde jeweils 1 ml Zellsuspension bzw. Organkultur mit 5 µg OVA Peptid versetzt. Überstände wurden nach erfolgter Zentrifugation (2000 x g, 5 Minuten) abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Zum Nachweis von sezernierten Zytokinen wurden so genannte Sandwich - ELISAs verwendet. Die Detektion von IFN- γ , IL-10 und IL-17 erfolgte mit Hilfe von Kits der Firma BD (Heidelberg, Deutschland) oder eBioscience (San Diego, USA). Der Ablauf und die verwendeten Konzentrationen erfolgten nach Angaben des Hersteller-Protokolls. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden 100 μ l des gereinigten Antikörpers gegen das entsprechende Zytokin in Beschichtungspuffer (Verdünnung: 1:250) pro Napf in eine 96 Napf NUNC MaxiSorp™ Platte pipettiert. Diese wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden in fünf Waschschrritten mit jeweils 200 μ l Waschpuffer entfernt. Eine Absättigung der freien Bindungsstellen auf dem Kunststoffträger erfolgte durch 200 μ l/Napf Assay-Diluent für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es folgten weitere fünf Waschschrritte mit 200 μ l Waschpuffer pro Napf. Jeweils 100 μ l Standard bzw. 100 μ l Probe wurden pro Napf pipettiert und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde fünfmal mit Waschpuffer (100 μ l/Napf) gewaschen und mit 100 μ l/Napf biotinylierten Detektions-Antikörper (Verdünnung in Assay-Diluent: 1:250) befüllt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei RT. Um eine hohe Spezifität zu garantieren, richtete sich der zweite anti-Zytokin-Antikörper gegen ein anderes Epitop als der erstgebundene. Es erfolgte ein fünfmaliges Waschen mit 200 μ l Waschpuffer pro Napf. 100 μ l Peroxidase-markiertes-Avidin (Verdünnung in Assay-Diluent: 1:250) wurden pro Napf pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Näpfe wurden zehnmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 100 μ l/Napf Substratlösung (1:1 Mischung der Substratreagenzien A und B von BD OptEIA™ [BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland]) appliziert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 μ l/Napf 1M H₂SO₄ gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte mit Hilfe des ELISA-Reader Spectra Mini AP (TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm mit einer Referenz von 620 nm.

4.6.3. Haematoxylin & Eosin Färbung und Bestimmung des Entzündungsgrades (Scoring)

Die 2-3 mm langen in Paraformaldehyd fixierten Darmstücke wurden in Paraffin eingelegt und geschnitten. Nach Überführung der ca. 2 μ m dicken Schnitte auf einen Objektträger erfolgte die Färbung mit Haematoxylin & Eosin. Dazu wurden die Schnitte in saurem Haematoxylin gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit Aqua dest. gespült. Es folgte die Färbung mit 1 %-iger Eosinlösung und ein weiterer Waschschrtritt mit Aqua dest.. Nach Entwässerung der Schnitte erfolgte das Eindeckeln. Mit Hilfe dieser Färbetechnik werden Zellkerne dunkelblau bis violett und zytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot gefärbt. Die Bildaufnahme der gefärbten Darmquerschnitte erfolgte mit Hilfe des BZ-8000K Mikroskops der Firma Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland).

Der Grad der Entzündung wurde unter Verwendung eines modifizierten Scoring-Schemas nach Asseman et al. [2003] bestimmt (Tabelle 4.2.).

Tabelle 4.2.: Scoring Schema zur Bestimmung des Entzündungsgrads
Modifiziert nach Asseman et al. [2003].

| Score (Grad der Entzündung) | Merkmale des Darmes |
|-----------------------------|--|
| 0 | Keine Entzündung, keine Veränderungen des Darmes |
| 1 | Vereinzelte Zellinfiltrate innerhalb der Mukosa; keine epitheliale Hyperplasie |
| 2 | Leicht zerstreute bis diffuse Zellinfiltrate innerhalb der Mukosa und Submukosa; beginnender Verlust von Becherzellen |
| 3 | Zellinfiltrate innerhalb der Mukosa, Submukosa und manchmal transmural; epitheliale Hyperplasie, Verlust von Becherzellen |
| 4 | Zellinfiltrate innerhalb der Mukosa, Submukosa und transmural; schwere Entzündungen des Darmes; Verlust von Becherzellen; Verlust von Krypten; Ulzeration; schwere epitheliale Hyperplasie |

4.6.4. Immunhistochemische Färbung

Die in Stickstoff eingefrorenen Darmstücke wurden in 3-4 µm dicke Stücke geschnitten und auf einen Objektträger überführt. Zur Überprüfung antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen wurde ein biotinylierter Maus-Anti-Maus OVA-TCR Antikörper 1:1000 mit RPMI 1640 verdünnt, 100 µl auf die Objektträger appliziert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit TBS. Zur Detektion des Antikörpers wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Streptavidin-Alkaline-Phosphatase (Dako REAL™ Detection System K5005) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit TBS gespült. Es folgte eine 4-minütige Inkubation mit dem ABC-Entwickler desselben Dako Kits.

Die Schnitte wurden nun für eine Stunde in 4 %-igem Formalin inkubiert, danach durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und eine Stunde bei 65°C im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger 2 Minuten lang im Schnellkochtopf (mit Druck) in Citratpuffer (pH 6) gekocht. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit 3 % H₂O₂ zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Ein unmarkierter Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper wurde 1:100 mit Verdünnungsmedium (Dako REAL™ Antibody Diluent S2022) verdünnt, auf die Objektträger gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit TBS, wurden 100 µl des biotinylierten Hase-anti-Ratte-Ig-Antikörper (1:200 in Verdünnungsmedium) auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion des

Antikörpers erfolgte anschließend durch eine 1-stündige Inkubation mit einem peroxidase-markierten Polymer, das an einen Ziege-anti-Hase-Antikörper gebunden ist (DakoCytomation EnVision + System-HRP K4003). Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit dem Dako REAL™ DAB + Chromogen Entwickler (Dako REAL™ Detection System K5001). Abschließend wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült, 1 Minute mit Haematoxylin gegengefärbt, in Leitungswasser gebläut und mit Glyceringelatine und Deckglas eingedeckt. Bilder solch gefärbter Schnitte wurden mit Hilfe eines „Zeiss Imager Z1 Axio“- Mikroskops aufgenommen und anschließend mittels AxioVision-Software der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Berlin, Deutschland) analysiert. Einfach- und doppelpositive Zellen wurden je HPF (engl.: high power field) gezählt. Als HPF wurde das Gesichtsfeld im Mikroskop definiert, das bei größter Vergrößerung (x 400) zu erkennen war.

4.6.5. Immunfluoreszenz-Färbung

Für die Untersuchungen zur Immunfluoreszenz wurden in Stickstoff eingefrorene Darmstücke geschnitten (4 µm Dicke) und auf Objektträger überführt. Ein unmarkierter Antikörper gegen F4/80 wurde 1:50 mit RPMI 1640 verdünnt, auf die Schnitte appliziert und 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit TBS und eine Inkubation mit 100 µl eines mit Alexa555-konjugierten Ziege-anti-Ratte-Antikörpers (1:100 in 0,5 % TNB). Anschließend wurden die Schnitte mit TBS gewaschen, dann 3 Minuten mit DAPI (1:1500 in TBS ohne Tween) inkubiert. So gefärbte Schnitte wurden in Fluoromount-G eingedeckt. Die Bilder wurden mit einem „Zeiss Imager Z1 Axio“- Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe der AxioVision-Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Berlin, Deutschland) analysiert.

4.7. Statistische Analyse

Erhaltene Daten sind grundsätzlich als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Zur Vereinheitlichung einzelner Experimente werden die Prozentzahlen erhaltener OVA-TCR positiver Zellen als standardisierte Ratio der negativen Kontrollgruppen wiedergegeben. Um standardisierte Werte zu erhalten und einzelne Experimente zu vergleichen, wurde die (geringste) prozentuale Anzahl dieser Kontrollgruppe bzw. der Negativgruppe auf 1 und alle anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt.

Die statistische Signifikanz zwischen behandelten und Kontrollgruppen wurde mittels Varianzanalyse bestimmt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn $p \leq 0,05$ ergab.

5. Ergebnisse

5.1. Ovalbumin (OVA) wird von mukosalen antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen

Um die Präsentation von Ovalbumin (OVA) zu untersuchen, wurde mit FITC gekoppeltes OVA (OVA-FITC) intrarektal verabreicht, der Dickdarm zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und aufgearbeitete Lamina propria mononukleäre Zellen (LPMC, engl.: lamina propria mononuclear cells) durchflusszytometrisch analysiert. Eine zusätzliche Färbung mit Hilfe eines Ratte-anti-Maus CD11b-Antikörpers zeigte, dass schon 10 Minuten nach Verabreichung von OVA-FITC intrarektal eine Anlagerung des Antigens an die antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und Dendritischen Zellen, stattfindet (Abbildung 5.1.1.). Dies konnte auch noch 18 Stunden nach Verabreichung des markierten Proteins beobachtet werden. Bei verschiedenen Konzentrationen des Antigens (50 bzw. 100 µg je 200 µl PBS; Abbildung 5.1.2.) bzw. zwischen den einzelnen Versuchstieren konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Balb/c Wildtyp, DO11.10 und CD44v7-/- Mäuse zeigten geringfügige, nicht signifikante Unterschiede in den Prozentzahlen der doppel-positiven CD11b/OVA-FITC markierten Zellen (Abbildung 5.1.3.). Weitere Analysen zeigten, dass 8-30% der OVA-FITC markierten Zellen CD11c positiv waren (Daten nicht gezeigt). Eine unspezifische Anlagerung des fluoreszenz-markierten Antigens an die Zellen konnte durch die aufwendige mehrstündige Isolationsprozedur und die vielfachen Waschschrte weitgehend ausgeschlossen werden.

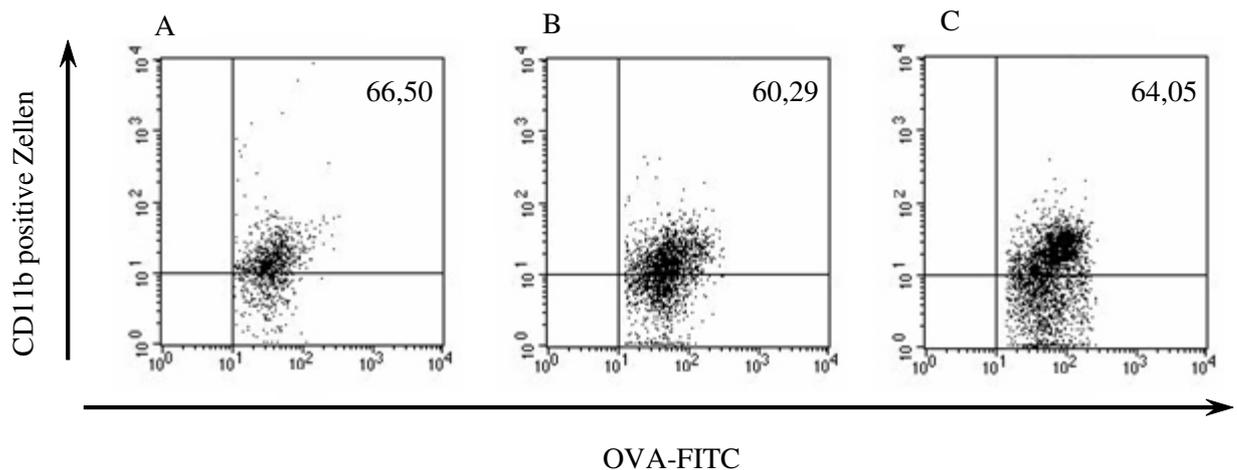


Abbildung 5.1.1.: Analyse der LPMC nach intrarektaler OVA-FITC Behandlung zu verschiedenen Isolationszeitpunkten

50 µg OVA-FITC in PBS wurde intrarektal in Balb/c Wildtyp appliziert und der Darm nach 10 min (A), 30 min (B) und 18 Stunden (C) isoliert. Die LPMC-Färbung erfolgte mit einem Ratte-anti-Maus CD11b-PE-Konjugat. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und CellQuest™ Software (BD Bioscience) (Gate auf OVA-FITC pos. Zellen). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei.

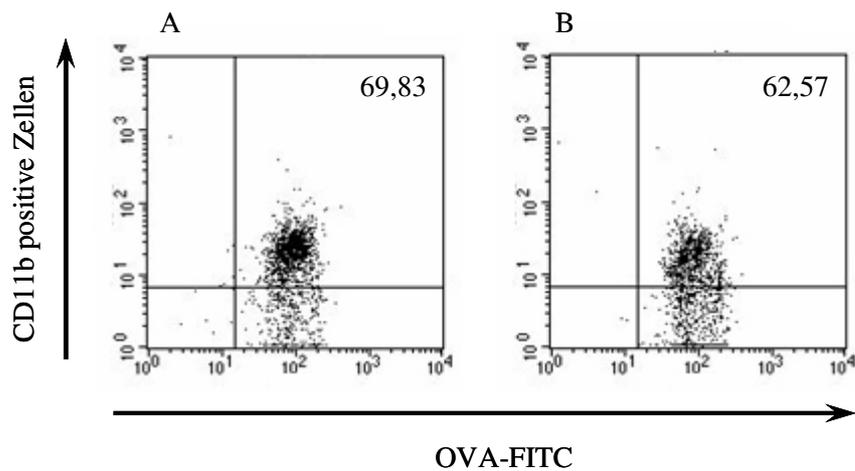


Abbildung 5.1.2.: Analyse von LPMC nach intrarektaler OVA-FITC Behandlung in verschiedenen Konzentrationen

50 µg (A) bzw. 100 µg (B) OVA-FITC in PBS wurde intrarektal in Balb/c Wildtyp appliziert und der Darm nach 30 min isoliert. Die LPMC-Färbung erfolgte mit einem Ratte-anti-Maus CD11b-PE-Konjugat. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und CellQuest™ Software (BD Bioscience) (Gate auf OVA-FITC pos. Zellen). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei.

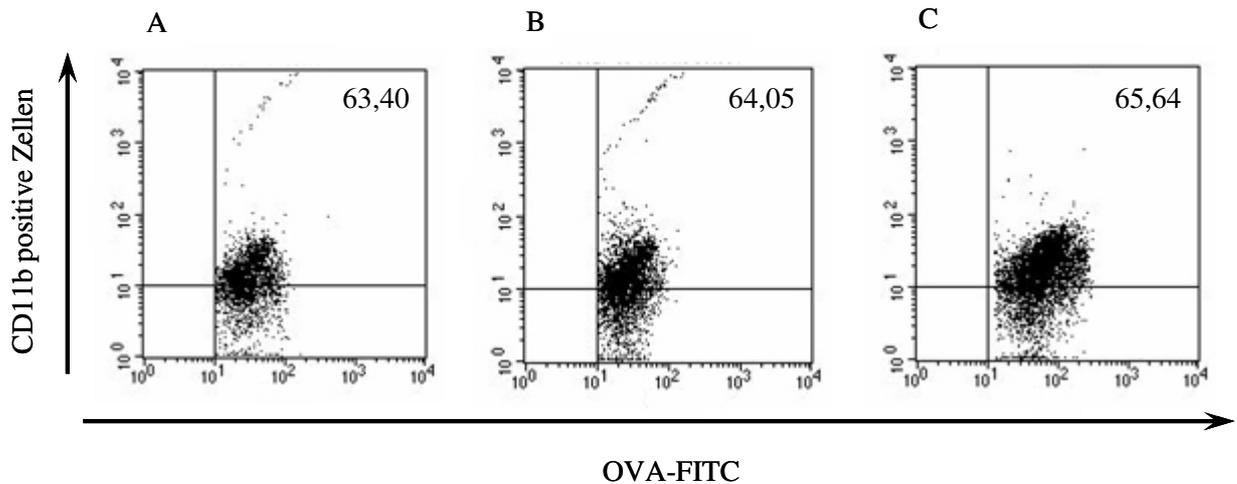


Abbildung 5.1.3.: Analyse von LPMC nach Applikation von OVA-FITC in verschiedenen Versuchstieren

50 µg OVA-FITC in PBS wurden intrarektal in Balb/c Wildtyp (A), DO11.10 (B) und CD44v7-/- (C) Mäuse appliziert und der Darm nach 30 min isoliert. Die LPMC-Färbung erfolgte mit einem Ratte-anti-Maus CD11b-PE-Konjugat. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und CellQuest™ Software (BD Bioscience) (Gate auf OVA-FITC pos. Zellen). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei.

Die Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Ratte-anti-Maus F4/80-Antigen-Antikörper, der spezifisch Makrophagen anfärbt, sollte bestätigen, dass es sich bei den Zellen, die OVA-FITC anlagern, um antigen-präsentierende Zellen handelt. Wie in Abbildung 5.1.4. zu sehen, war es möglich, einzelne doppelt-positive Zellen innerhalb der Lamina propria (LP) zu detektieren, die sowohl F4/80 auf ihrer Oberfläche aufwiesen als auch OVA-FITC gebunden hatten.

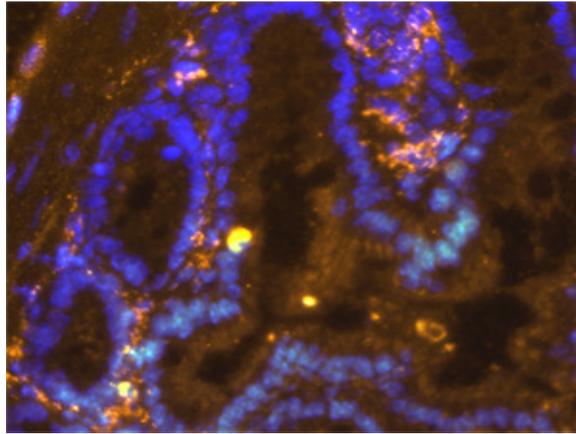


Abbildung 5.1.4.: Mukosale Aufnahme von OVA-FITC

OVA-FITC in PBS wurde intrarektal Balb/c Wildtyp Mäusen appliziert. Nach 30 min wurde der Darm isoliert. Angefertigte Darmschnitte wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (blau) und einem Ratte-anti-Maus F4/80-Antigen-Antikörper (rot) gefärbt. Die Schnitte wurden mittels „Zeiss Imager Z1 Axio“-Mikroskop und der AxioVision-Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) analysiert und fotografiert.

5.2. Induktion von oraler Toleranz in Wildtyp und CD44v7^{-/-} Mäusen

Zur Untersuchung der oralen Toleranz wurden DO11.10 CD4⁺ bzw. CD44v7-deletierte OVA-T-Zellrezeptor (OVA-TCR) positive CD4⁺ Zellen in Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert. Nach erfolgter Toleranzinduktion durch Fütterung mit dem spezifischen Antigen OVA und anschließender Immunisierung mit OVA erfolgte die Untersuchung der Zellen von kaudalen, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten zur Bestimmung der oralen Toleranz. Durch Fütterung des spezifischen Antigens OVA konnte in jeder Versuchsgruppe eine signifikante Reduktion der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der kaudalen Lymphknotenzellpopulation erreicht werden. Die Fütterung mit OVA verhinderte die Zunahme der OVA-TCR positiven T-Zellen nach Immunisierung mit dem spezifischen Antigen. Die ungefütterten Tiere zeigten signifikant mehr antigen-spezifische T-Zellen innerhalb der kaudalen Lymphknoten (Abbildung 5.2.1.). Um alle Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können, wurde der kleinste prozentuale Wert der Kontrollgruppe auf 1 gesetzt und die anderen Werte in Relation dazu berechnet. Die Werte aller Versuche finden sich im Anhang Tabelle 9.1.. Bemerkenswerterweise beeinflusste die Deletion von CD44v7 in den Donor-T-Zellen ebenso wenig wie die Deletion im Empfängertier nicht die Antigen-Reaktivität der OVA-TCR positiven T-Zellen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der mesenterialen und inguinalen Lymphknoten-Zellpopulation festgestellt werden. Die Anzahl der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb dieser Lymphknoten war zudem sehr gering (Daten nicht gezeigt).

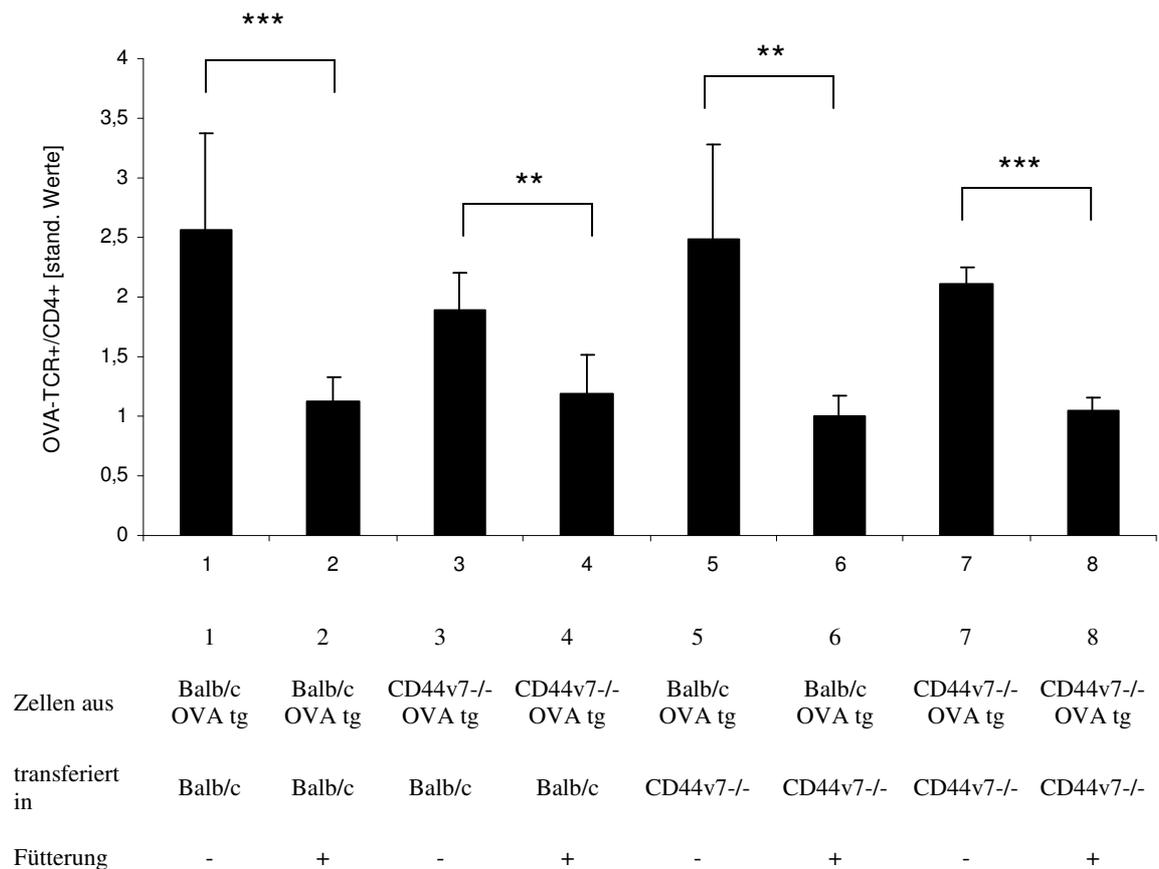


Abbildung 5.2.1.: Vergleich der prozentualen Anzahl reisolierter OVA-TCR pos. T-Zellen aus Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7^{-/-} Mäusen nach Transfer von DO11.10 CD4⁺ bzw. CD44v7^{-/-} OVA-TCR pos. CD4⁺ Zellen, Induktion von oraler Toleranz und anschließender Immunisierung mit OVA. Kaudale Lymphknotenzellen wurden aus OVA/PBS gefütterten Mäusen und Kontrollen 7 Tage nach erfolgter Immunisierung isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Die Auswertung der Zellen erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software (BD Bioscience). Dargestellt sind standardisierten Werte (** p ≤ 0.005; *** p ≤ 0.0001; n=6).

Fluoreszenz-Analysen mit CFSE zeigten ebenfalls, dass die orale Gabe des spezifischen Antigens die Proliferation von OVA-TCR positiven T-Zellen nach erfolgter Immunisierung innerhalb der kaudalen Lymphknoten verhindert. CFSE ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der nach Inkubation innerhalb des Zytoplasmas verweilt und bei jeder Teilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Das FACS-Histogramm einer mit dem spezifischen Antigen OVA gefütterten Maus weist deutlich weniger Zellgenerationen und somit weniger Proliferation der Zellen auf, als das eines nur mit PBS gefütterten Kontrolltieres (Abbildung 5.2.2.).

Zellen der mesenterialen und inguinalen Lymphknoten zeigten, wie zuvor schon erwähnt, nur eine geringe Anzahl an OVA-TCR positiven Zellen, die auch kaum Proliferation und keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Kontrolltieren und OVA gefütterten Mäusen aufwiesen.

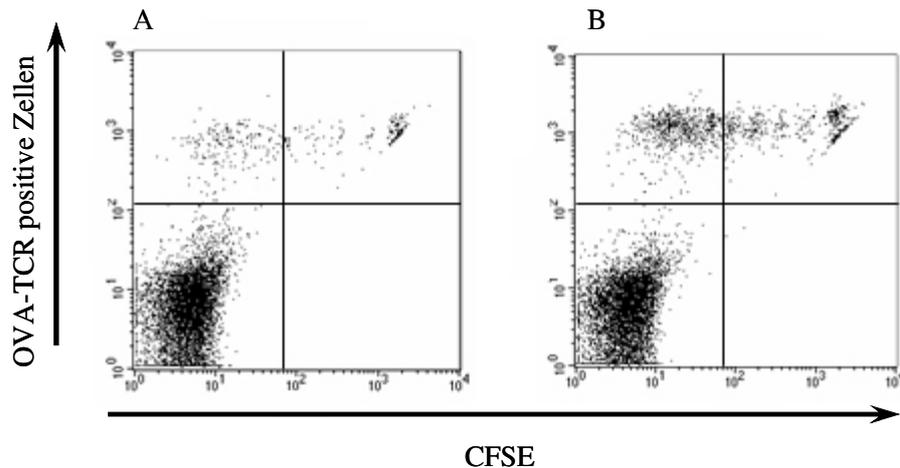


Abbildung 5.2.2.: Vergleich der Proliferation von OVA-TCR pos. T-Zellen nach Immunisierung mit OVA zwischen OVA/PBS gefütterten Mäusen (A) und Kontrollen (B)

OVA-TCR pos. T-Zellen wurden mit CFSE inkubiert und in Balb/c Wildtyp Mäuse transferiert. Die Hälfte der Mäuse wurde mit OVA in PBS gefüttert, die andere Hälfte nur mit PBS. Es folgte die Immunisierung aller Tiere mit OVA. Nach der Isolation wurden die kaudalen Lymphknoten zellen mit einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-PE-Konjugat gefärbt. Die Auswertung der Zellen erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software (BD Bioscience). Repräsentative FACS-Histogramme kaudaler Lymphknoten zellen zweier Mäuse werden gezeigt.

Um die Expression typischer pro- und anti-inflammatorischer Zytokine zu untersuchen, wurden reisolierte Zellen aus den unterschiedlich behandelten Tieren über Nacht mit OVA Peptid stimuliert und die Produktion der Zytokine im Überstand mittels ELISA analysiert. Da die Art der transferierten Zellen, wie zuvor schon gezeigt, keine Rolle spielte, wurde nur die Sekretion von Zytokinen nach Transfer von DO11.10 CD4⁺ Zellen in Balb/c Wildtyp und CD44v7^{-/-} Mäuse mit bzw. ohne Fütterung des spezifischen Antigens OVA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interferon (IFN)- γ bei kaudalen Lymphknoten zellen aus PBS gefütterten, immunisierten Tieren nach spezifischer Restimulation (Balb/c Wildtyp: 4230 ± 538 pg/ml; CD44v7^{-/-}: 4601 ± 396 pg/ml) im Vergleich zu Zellen aus OVA/PBS gefütterten, immunisierten Mäusen (Balb/c Wildtyp: 431 ± 54 pg/ml, $p \leq 0,0001$; CD44v7^{-/-}: 313 ± 225 pg/ml, $p \leq 0,0001$) signifikant erhöht war. Dabei spielte die Art des Empfängertieres keine Rolle (Abbildung 5.2.3.). Die Unterschiede zwischen Balb/c Wildtyp und CD44v7^{-/-} Mäusen waren nicht signifikant.

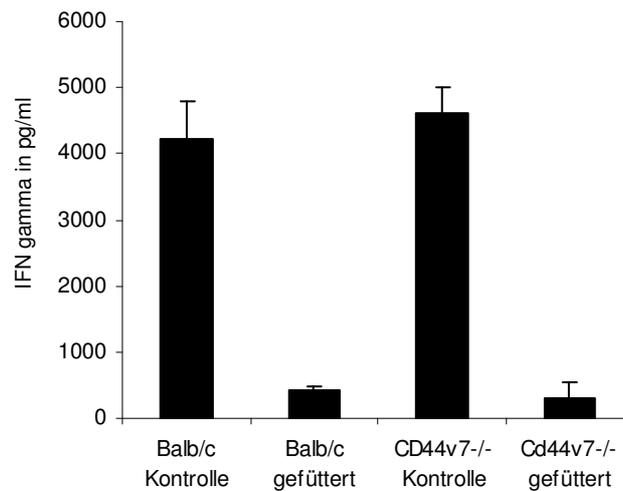


Abbildung 5.2.3.: IFN- γ Produktion reisolierter Zellen von OVA/PBS gefütterten Mäusen und Kontrollen nach Immunisierung mit OVA

Naive OVA-TCR pos. CD4⁺ Zellen wurden in Balb/c Wildtyp und CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert, die Tiere von d1 bis d5 mit OVA/PBS bzw. PBS (Kontrolle) gefüttert und anschließend mit OVA Protein immunisiert. Isolierte kaudale Lymphknotenzellen wurden über Nacht mit OVA Peptid restimuliert und die IFN- γ Produktion mittels ELISA ermittelt (***) $p \leq 0.0001$, n[Balb/c wt]=5, n[CD44v7-del.]=10)

Der Interleukin (IL)-10 ELISA zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede in der Produktion des Zytokins zwischen kaudalen Lymphknotenzellen OVA/PBS gefütterter und nur PBS gefütterter Tiere. Dabei wiesen Zellen aus OVA/PBS gefütterten, immunisierten Mäusen eine signifikant erhöhte Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 auf (Balb/c Wildtyp: 117 ± 26 pg/ml; CD44v7^{-/-}: 139 ± 38 pg/ml), als Zellen aus den kaudalen Lymphknoten von nur PBS gefütterten, immunisierten Mäusen (Balb/c Wildtyp: 31 ± 14 pg/ml, $p \leq 0,0001$; CD44v7^{-/-}: 39 ± 29 pg/ml, $p \leq 0,0001$). Wieder ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CD44v7^{-/-} und Balb/c Wildtyp Mäusen (Abbildung 5.2.4.).

Die Bestimmung der systemischen Anergie, ausgelöst durch orale Antigen-Gabe, erfolgte durch Induktion einer DTH (engl.: delayed type hypersensitivity)-Reaktion am Ohr. Sowohl Balb/c Wildtyp Mäuse als auch CD44v7^{-/-} Tiere zeigten keine Anschwellung des Ohres nach Transfer von antigenspezifischen Zellen mit anschließender Fütterung des Antigens (Balb/c Wildtyp: $1,6 \pm 2,8$ % Schwellung; CD44v7^{-/-}: $3,9 \pm 4,0$ % Schwellung), während mit PBS gefütterte Versuchstiergruppen ein signifikantes Anschwellen des Ohres aufwiesen (Balb/c Wildtyp: $26,4 \pm 7,4$ % Schwellung; $p \leq 0,05$; CD44v7^{-/-}: $34,2 \pm 7,1$ % Schwellung; $p \leq 0,005$) (Abbildung 5.2.5.).

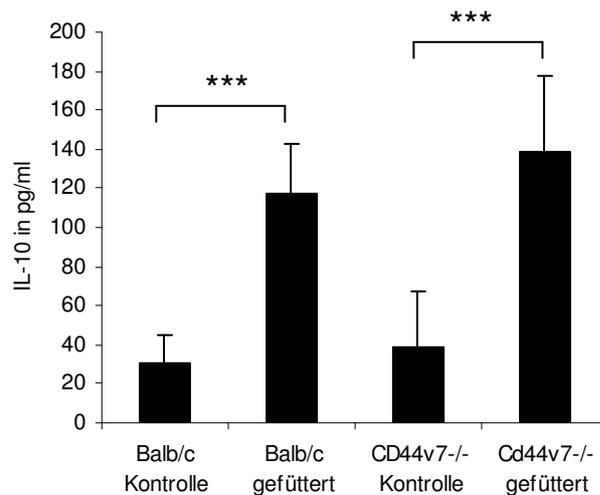


Abbildung 5.2.4.: IL-10 Produktion reisolierter Zellen von OVA/PBS gefütterten Mäusen und Kontrollen nach Immunisierung mit OVA

Naive OVA-TCR pos. CD4⁺ Zellen wurden in Balb/c Wildtyp und CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert, die Tiere von d1 bis d5 mit OVA/PBS bzw. PBS (Kontrolle) gefüttert und anschließend mit OVA Protein immunisiert. Isolierte kaudale Lymphknotenzellen wurden über Nacht mit OVA Peptid restimuliert und die IL-10 Produktion mittels ELISA ermittelt (***) $p \leq 0.0001$, n[Balb/c wt]=5, n[CD44v7-del.]=10)

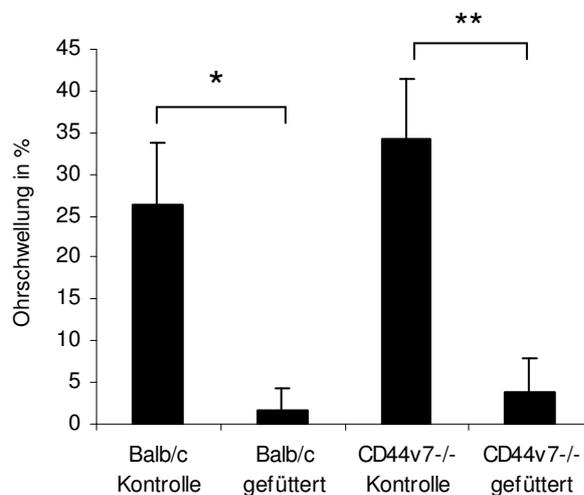


Abbildung 5.2.5.: Vergleich der Ohrschwellung nach Induktion einer DTH zwischen OVA/PBS gefütterten Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7^{-/-}-Mäusen und Kontrollen

OVA-TCR pos. CD4⁺ Zellen wurden in Balb/c Wildtyp bzw. CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert. Die Hälfte der Tiere wurde von d1 bis d5 mit OVA in PBS gefüttert, Kontrollen mit PBS. Die Induktion der DTH erfolgte durch Injektion von OVA Protein in die linke Ohrmuschel. Resultierende Schwellungen wurden mittels eines Oditest Längenmessgerätes (Kroeplin) ermittelt (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, n=3).

5.3. Charakterisierung der OVA-spezifischen Kolitis

Die obigen Ergebnisse zeigen klar, dass das bekannte antigen-spezifische Toleranzmodell durch orale Antigengabe auch in unseren Händen stabil nachvollziehbar war.

Es war jetzt naheliegend, in dem gleichen Modell die Vorgänge der mukosalen Immunisierung durch lokale Antigenapplikation zu untersuchen. An diesem Modell sollte die Bedeutung von CD44v7, das anscheinend wesentlich für die Ausbildung einer Kolitis im Mausmodell und die anhaltende Entzündung im Menschen ist, untersucht werden.

Immunkompetente Mäuse, in die T_H1 -stimulierte OVA-TCR positive T-Zellen transferiert wurden, entwickelten eine schwere Kolitis nach intrarektaler Immunisierung mit dem spezifischen Antigen OVA.

Zur Charakterisierung des Modells wurde das Gewicht der Mäuse über den kompletten Versuchszeitraum gemessen. Wie in Abbildung 5.3.1. dargestellt, war keine signifikante Gewichtsreduktion auf Seiten der OVA-spezifischen Kolitis-Tiere als auch auf Seiten der mit Kontrollprotein behandelten Tiere festzustellen.

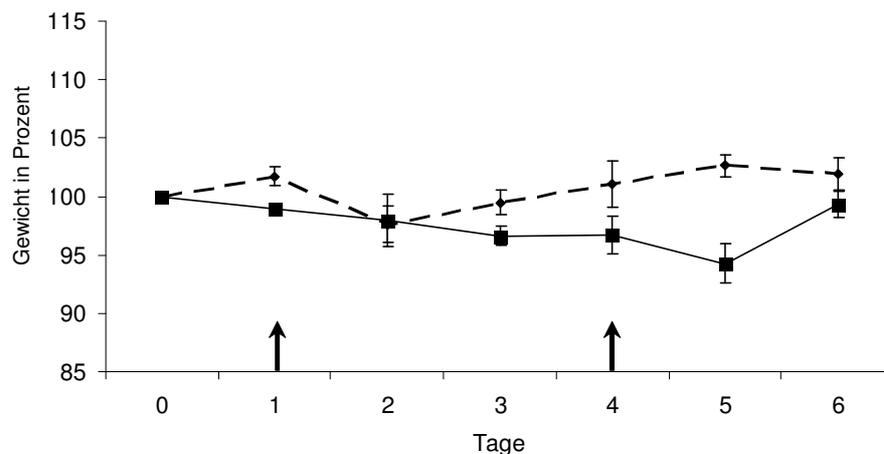


Abbildung 5.3.1.: Gewichtsverläufe nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis im Vergleich zu Kontrollen

Nach Transfer von OVA-TCR pos. T_H1 Zellen in Balb/c Wildtyp wurde eine OVA-spezifische Kolitis induziert (gestrichelte Linie). Kontrollen wurden mit BSA behandelt (durchgehende Linie). Das Gewicht der Tiere wurde täglich über den gesamten Zeitraum der Behandlung gemessen. Schwarze Pfeile markieren den Zeitpunkt der intrarektalen Behandlung (n=5).

Tiere die intrarektal mit OVA behandelt wurden, wiesen am Ende des Experimentes weichen bis flüssigen Stuhlgang auf, während die BSA behandelte Kontrollgruppe festen Kot bildete (Abbildung 5.3.2.). Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Darmlänge bei Kolitis ($10,4 \pm 0,8$ cm) und Kontrollen ($9,9 \pm 1,7$) festgestellt werden (Abbildung 5.3.3.).



Abbildung 5.3.2.: Dickdarm bei ausgebildeter OVA-spezifischer Kolitis und Kontrolle
Der Darm wurde am Tag 6 entnommen. Repräsentative Bilder werden gezeigt.

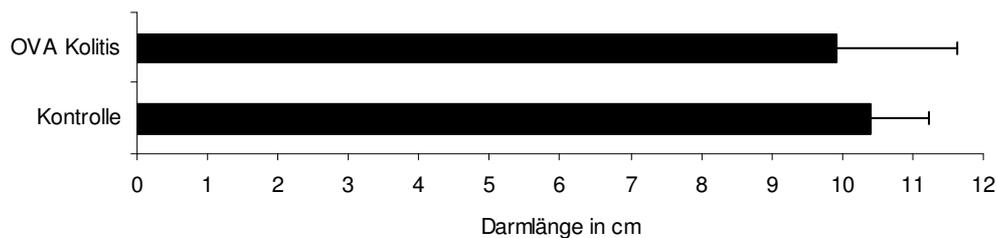


Abbildung 5.3.3.: Länge des Dickdarmes nach Induktion einer OVA-spezifischer Kolitis bzw. Kontrollen
Am Tag 6 wurde der Darm entnommen und mit einem handelsüblichen Lineal vermessen (n=5).

Bei der histologischen Untersuchung zeigte sich, dass die Kolonschleimhaut von Mäusen, in denen eine OVA-spezifische Kolitis induziert wurde, eine schwere Entzündung aufwies. Dies war gekennzeichnet durch inflammatorische Zellinfiltrate innerhalb der Mukosa, epitheliale Zell-Hyperplasie, Elongation der Krypten, Erosionen, Verlust von Becherzellen und eine verdickte Muscularis Propria als Hinweis auf eine transmurale Entzündung (Abbildung 5.3.4.). Kontrolltiere wiesen keine Gewebsveränderungen auf. Die Därme der Kontrolltiere zeigten ein vergleichbares Erscheinungsbild wie die Därme von unbehandelten gesunden Tieren. Die Dünndarmmukosa wies keine ausgedehnte Entzündung auf. Im Einzelfall zeigte sich eine Veränderung im Ileokolischen Übergang.

Der histologische Score, ein Gradmesser für die Entzündung des Darmes, war in der OVA-spezifischen Kolitisgruppe deutlich höher ($3,2 \pm 0,6$) als bei den BSA behandelten Mäusen ($0,6 \pm 0,7$; $p \leq 0,001$; Abbildung 5.3.5.).

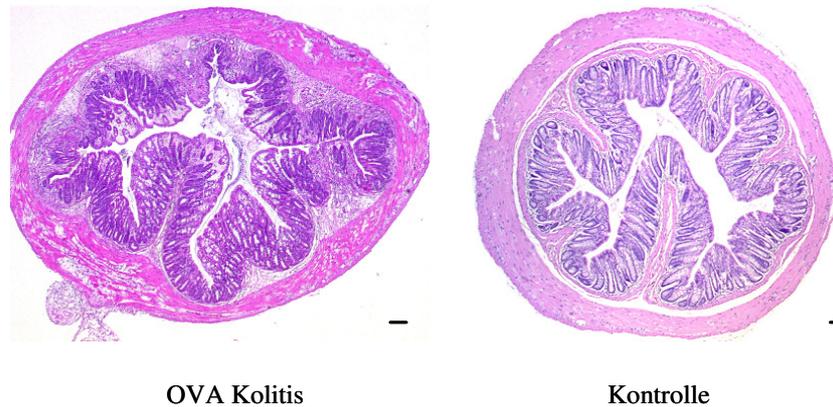


Abbildung 5.3.4.: Haematoxylin & Eosin Färbung von Darmquerschnitten isoliert aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis bzw. aus Kontrollen
Die Dickdärme wurden isoliert, geschnitten und mit Haematoxylin & Eosin gefärbt. Die Bilder wurden mit einem BZ-8000K Mikroskops aufgenommen (Messbalken 100 μm).

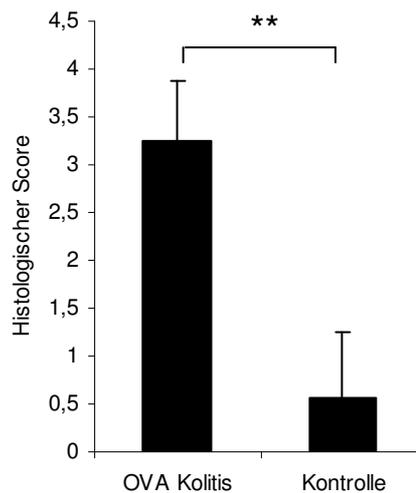


Abbildung 5.3.5.: Vergleich des histologische Score der Kolons zwischen ausgebildeter OVA-spezifischen Kolitis und Kontrolle
Nach der Isolation der Dickdärme wurden diese mit Haematoxylin & Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung mittels eines modifizierten Scoring-Schemas nach Asseman et al. [2003] bestimmt (** $p \leq 0,001$; $n=10$).

Reisolierte antigen-spezifische Zellen aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis wiesen nach Restimulation mit dem spezifischen Antigen OVA im Vergleich zu Zellen aus Kontrolltieren einen erhöhten Wert an $\text{IFN-}\gamma$ auf. Tiere mit induzierter OVA-spezifischer Kolitis zeigten einen 25-fach erhöhten $\text{IFN-}\gamma$ Wert innerhalb der Lamina propria mononukleären Zell (LPMC)-Population (748 ± 294 pg/ml) und einen zweieinhalbfach erhöhten Wert in der mesenterialen Lymphknoten (mLN)-Zellpopulation nach Restimulation (2689 ± 147 pg/ml) im Vergleich zu kultivierten Zellen aus intrarektal mit BSA behandelten Tieren (LPMC: 30 ± 5 pg/ml; $p \leq 0,05$; mLN: 1087 ± 321 pg/ml;

$p \leq 0,001$) (Abbildung 5.3.6.). Erhöhte IFN- γ Produktion bei Mäusen mit induzierter OVA-spezifischer Kolitis konnte auch mit Kolangewebe in einer Organkultur festgestellt werden.

Somit trägt das hier erstmals beschriebene Kolitismodell die histologischen und immunologischen Charakteristika einer chronisch floriden Entzündung des Darmes im Menschen.

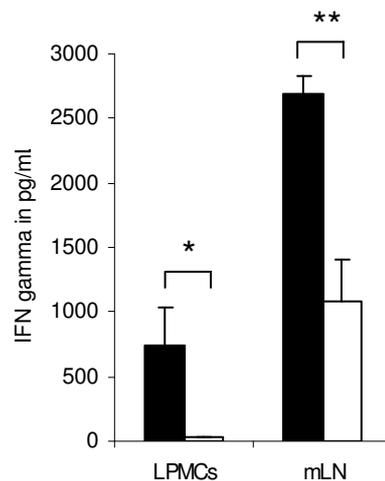


Abbildung 5.3.6.: Vergleich der IFN- γ Produktion reisolierter Zellen aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis bzw. Kontrollen

LPMC und mesenteriale Lymphknotenzellen (mLN) wurden aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis (schwarzer Balken) bzw. Kontrollen (weißer Balken) reisoliert. Die Zellen wurden über Nacht mit 5 μ g/ml OVA Peptid restimuliert und die IFN- γ Produktion mittels ELISA ermittelt. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, $n=5$).

5.4. Spezifischer Nachweis der OVA-TCR positiven T-Zellen im Kolon

Um die Antigen-Spezifität von T-Zellen zu bestimmen, wurden CD4⁺ T-Zellen aus einzelnen Organen reisoliert und auf ihre OVA-TCR Expression mittels des spezifischen Antikörpers KJ1-26 untersucht. Die intrarektal OVA-Exposition induzierte eine Einwanderung von OVA-TCR positiven Zellen in die Darmmukosa. Diese sammelten sich in der Lamina Propria an (Abbildung 5.4.1.). Es wurden signifikante mehr OVA-TCR positiven T-Zellen in der LP bei OVA-spezifischer Kolitis ($3,7 \pm 0,5$) gegenüber Kontrollen ($1,0 \pm 0,5$; $p \leq 0,0005$) gemessen. Interessanterweise beschränkte sich die Immunisierung auf die Darmmukosa. Im distalen Immunsystem, wie den mesenterialen Lymphknoten, zeigte sich kein Effekt ($1,7 \pm 0,6$ bzw. $1,1 \pm 0,4$; standardisierte Werte) (Abbildung 5.4.2.).

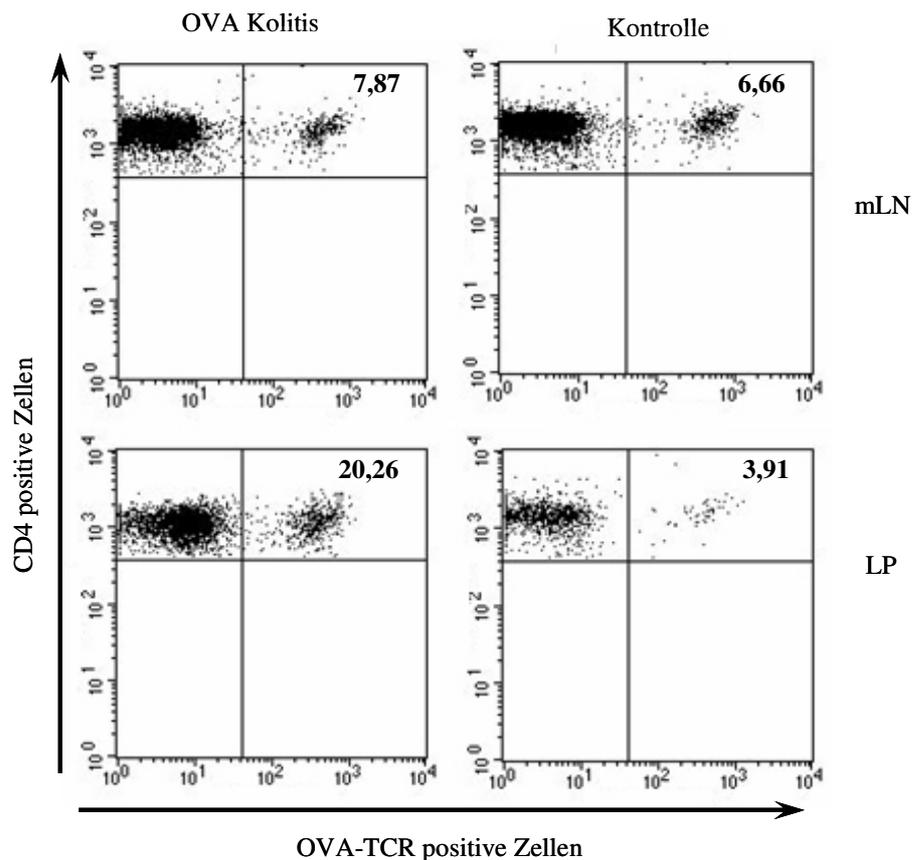


Abbildung 5.4.1.: Analyse von reisolierten OVA-TCR pos. T-Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis bzw. Kontrollen
Zellen aus der Lamina Propria (LP) und mesenterialen Lymphknotenzellen (mLN) wurden aus den verschieden behandelten Versuchstiergruppen isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-FITC-Konjugat und Maus-anti-Maus OVA-TCR-PE-Konjugat gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels eines FACS Calibur (BD Bioscience). Repräsentative FACS-Histogramme von 2 Mäusen werden gezeigt (Gate auf CD4⁺ Zellen).

5.5. Die OVA-spezifische Kolitis kann über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden

Zur Charakterisierung des Modells wurde untersucht, wie lange eine OVA-spezifische Kolitis aufrechterhalten werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass intestinale Entzündungserscheinungen und mukosale Schäden mit zunehmender Versuchsdauer ausheilten und ab Tag 13 keine histologischen Veränderungen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren mehr zu erkennen waren (Abbildung 5.5.1.). Eine zweimalige Antigenchallenge war also nicht ausreichend, eine anhaltende Entzündung anzustoßen.

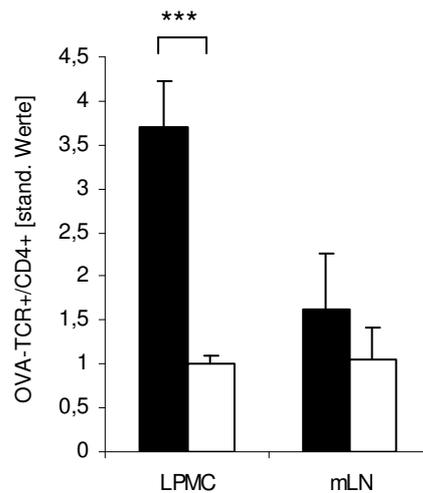


Abbildung 5.4.2.: Vergleich der Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis und Kontrollen

Nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis (schwarzer Balken) bzw. Behandlung mit Kontrollprotein (weißer Balken) wurden LPMC und mesenterialen Lymphknotenzellen (mLN) isoliert. Es folgte die Färbung der Zellen mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software der Firma BD Biosciences. Dargestellt sind standardisierte Werte der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der CD4 positiven Zellpopulation (***) $p \leq 0,0005$, $n = 8$).

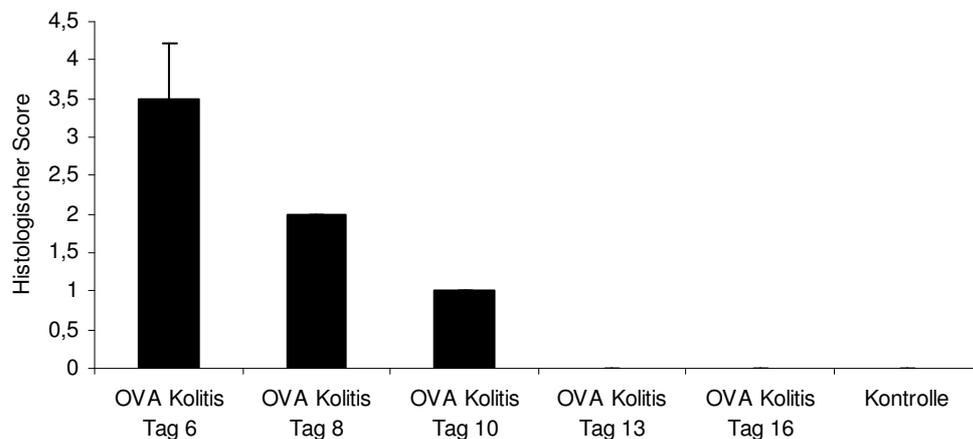


Abbildung 5.5.1.: Histologischer Score nach Standard-Induktion der OVA-spezifischen Kolitis am Tag 1 und 4 mit unterschiedlichen Isolationszeitpunkten

Nach der Isolation der Dickdärme wurden diese geschnitten und mit Haematoxylin & Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung mittels eines modifizierten Scoring-Schemas nach Assemann et al. [2003] bestimmt ($n=2$).

Zur Aufrechterhaltung einer OVA-spezifischen Kolitis über einen Zeitraum von 19 Tagen wurden DO11.10 T_H1-Zellen alle 7 Tage in Balb/c Wildtyp transferiert und eine OVA-spezifische Kolitis alle 3 Tage induziert.

In diesem Modell zeigte sich ein signifikant erhöhter histologischer Score ($2,5 \pm 0,5$) im Vergleich zu den Kontrollen ($0,8 \pm 0,4$; $p \leq 0,01$) bis zu einem Zeitraum von 19 Tagen (Abbildung 5.5.2.).

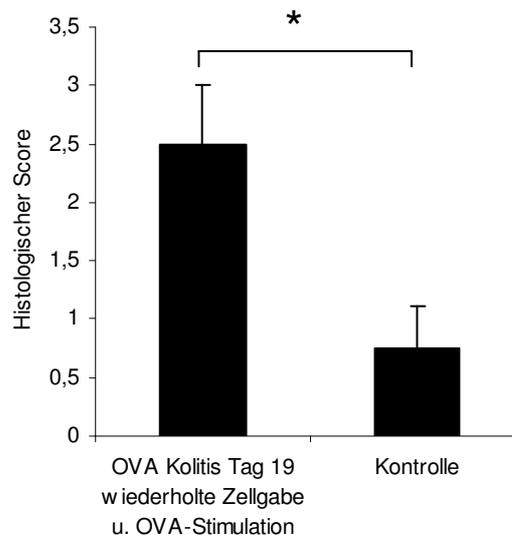


Abbildung 5.5.2.: Histologischer Score der OVA-spezifischen Kolitis nach wiederholtem Transfer von OVA-TCR pos. T-Zellen (d0, 6, 12) und mehrmaliger Stimulation mit OVA (d1, 4, 7, 10, 13 16) nach 19 Tagen Versuchsdauer im Vergleich zu Kontrollen

Isolierte Dickdärme wurden geschnitten, mit Haematoxylin & Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung mittels eines modifizierten Scoring-Schemas nach Asseman et al. [2003] bestimmt (* $p \leq 0,01$; $n=3$).

Interessanterweise konnten keine Unterschiede in der Anzahl der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der Lamina propria zwischen den beiden Versuchsgruppen bei wiederholter Injektion von DO11.10 T_H1-Zellen und wiederholter Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis bzw. intraluminaler Behandlung mit dem Kontrollprotein festgestellt werden. Auch die Produktion von IFN- γ nach Restimulation isolierter LPMC mit dem spezifischen Antigen OVA wies nach einer Versuchsdauer von 19 Tagen keine signifikanten Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt).

5.6. Die Induktion von oraler Toleranz unterbricht die Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Induktion von oraler Toleranz während der OVA-spezifischen Kolitis hat, wurden die Mäuse zwischen den intrarektalen Behandlungen einmal täglich mit jeweils 20 mg OVA gefüttert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Fütterung mit dem spezifischen Antigen die OVA-spezifische Kolitis ausheilt. Histologisch zeigte sich, entsprechend der Kontrolle, eine völlig ausgeheilte Mukosa am Tag 6. Ohne Fütterung entwickelte sich eine schwere transmurale Entzündung (Abbildung 5.6.1.).

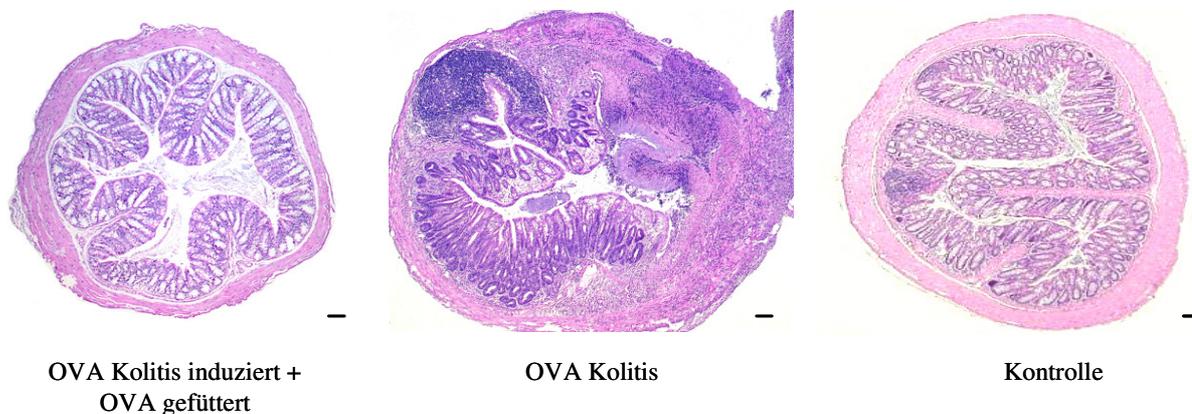


Abbildung 5.6.1.: Haematoxylin & Eosin Färbung von Dickdarmquerschnitten nach einer OVA-spezifischen Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung im Vergleich zur Kontrolle
Dickdärme wurden isoliert, geschnitten und mit Haematoxylin & Eosin gefärbt. Die Bilder wurden mit einem BZ-8000K Mikroskop aufgenommen (Messbalken 100 μ m).

Der histologische Score machte einen deutlichen Unterschied des Entzündungsgrades sichtbar. Die Fütterung mit OVA führte zu einem signifikant erniedrigtem histologischen Score ($0,9 \pm 0,6$) gegenüber der unbehandelten Kolitis ($3,3 \pm 0,5$; $p \leq 0,0001$). Die Entzündung ging dabei sogar auf den Score der Kontrollen ($0,4 \pm 0,5$; $p \leq 0,0001$) zurück (Abbildung 5.6.2.).

Nach Fütterung von OVA waren signifikant weniger OVA-TCR positive T-Zellen in der LP ($0,8 \pm 0,3$) im Vergleich zu einer bestehenden OVA-spezifischen Kolitis ($2,2 \pm 0,5$; $p \leq 0,0001$) nachweisbar. Der Anteil der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der LP war somit bei gefütterten Tieren ähnlich gering wie bei den Kontrollen ($1,1 \pm 0,2$; standardisierte Werte). Es konnten keine Unterschiede in den Werten der OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der mLN Zellpopulationen zwischen den verschieden behandelten Tieren festgestellt werden (Abbildung 5.6.3.).

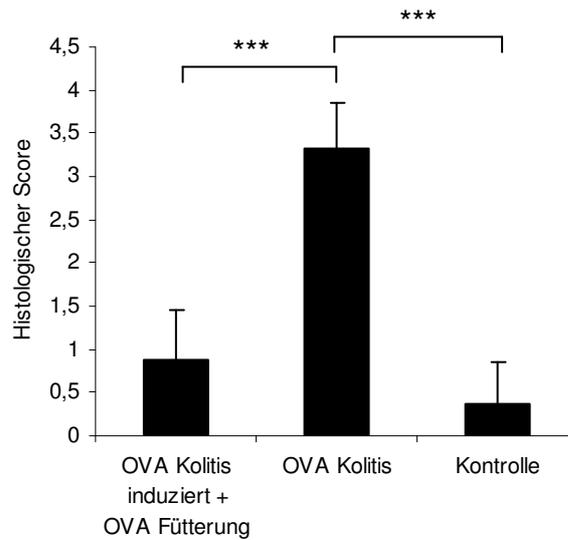


Abbildung 5.6.2.: Histologischer Score der OVA-spezifischen Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

Nach der Isolation der Dickdärme wurden diese mit Haematoxylin & Eosin gefärbt. Die Bestimmung des Entzündungsgrades erfolgte mittels einer modifizierten Skala nach Asseman et al. [2003] (** $p \leq 0,0001$; $n=10$).

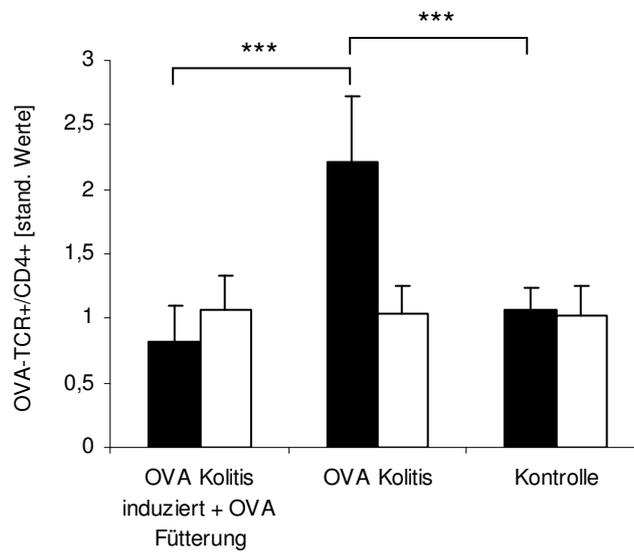


Abbildung 5.6.3.: Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

LPMC (schwarzer Balken) und mesenteriale Lymphknotenzellen (weißer Balken) wurden isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software der Firma BD Biosciences. Dargestellt sind die standardisierten Werte der OVA-TCR pos. Zellen innerhalb der CD4 pos. Zellpopulation (** $p \leq 0,0001$, $n = 8$).

Die immunhistochemische Analyse bestätigte diesen Befund. Die Anzahl der OVA-TCR positiven Lymphozyten wurde dazu pro HPF (high power field) gezählt. Bei einer OVA-spezifischen Kolitis fanden sich $28,5 \pm 17,2$ OVA-TCR positive Zellen/HPF im Darm gegenüber $2,3 \pm 1,3$ OVA-TCR positive Zellen/HPF bei den Kontrollen ($p \leq 0,05$) bzw. $5,5 \pm 2,1$ OVA-TCR positive Zellen/HPF nach Fütterung ($p \leq 0,05$; Abbildung 5.6.4.).

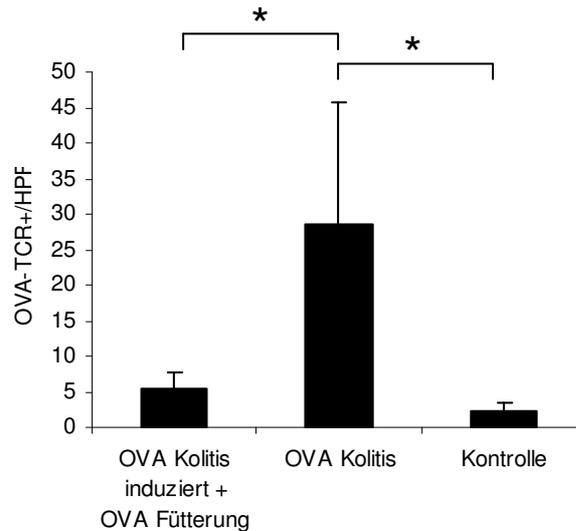


Abbildung 5.6.4.: Immunhistochemische Färbung von OVA-TCR pos. T-Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

Isolierte Därme wurden mit einem biotinylierten Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte mittels Dako REAL™ Detection System K5005. Die positiven Zellen wurden je HPF (high power field) gezählt (* $p \leq 0,05$, n = 4).

Reisolierte Zellen aus Mäusen, die mit dem spezifischen Antigen nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis gefüttert wurden, zeigten eine erniedrigte Produktion des Zytokins IFN- γ nach Restimulation mit dem spezifischen Antigen OVA *in vitro*. Diese war innerhalb der Lamina propria Zellpopulation auf Seiten der gefütterten Mäuse nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis (285 ± 221 pg/ml) im Vergleich zu ungefütterten Mäusen mit ausgebildeter OVA-spezifischer Kolitis (2818 ± 1118 pg/ml; $p \leq 0,0001$) geringer. Damit sank der Wert wieder auf das Niveau der mit BSA behandelten Kontrolltiere (262 ± 136 pg/ml; $p \leq 0,0001$; Abbildung 5.6.5.). Der gleiche Sachverhalt konnte auch bei Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten beobachtet werden.

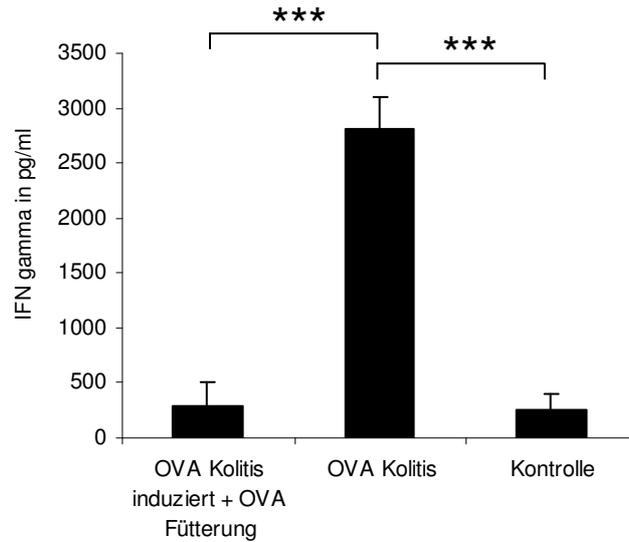


Abbildung 5.6.5.: Vergleich der IFN- γ Produktion reisolierter LPMC nach OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

Isolierte LPMC wurden über Nacht mit 5 $\mu\text{g/ml}$ OVA Peptid restimuliert und die IFN- γ Produktion mittels ELISA ermittelt (** $p \leq 0.0001$, $n=5$).

Eine Untersuchung der reisolierten Zellen zur IL-17 Produktion zeigte nach spezifischer Restimulation ebenfalls eine gesteigerte Produktion durch LPMC bei der OVA-spezifischen Kolitis (45 ± 26 pg/ml) (Abbildung 5.6.6.). Dies war signifikant erhöht im Vergleich zu der Produktion von IL-17 bei den Kontrollen (1 ± 2 pg/ml; $p \leq 0,01$) bzw. bei Antigenfütterung (7 ± 8 pg/ml; $p \leq 0,05$).

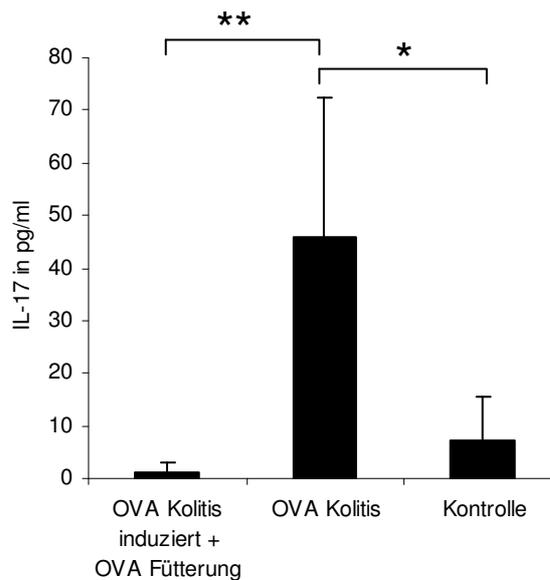


Abbildung 5.6.6.: Vergleich der IL-17 Produktion reisolierter LPMC nach OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

Isolierte LPMC wurden über Nacht mit 5 $\mu\text{g/ml}$ OVA Peptid restimuliert und die IFN- γ Produktion mittels ELISA ermittelt (** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, $n=5$).

Die Analyse von IL-10 ergab eine signifikant verminderte Produktion nach Restimulation der isolierten LPMC mit OVA Peptid in der Versuchsgruppe mit etablierter OVA-spezifischer Kolitis (31 ± 14 pg/ml) (Abbildung 5.6.7.). LPMC nach Antigenfütterung und bei Kontrollen zeigten im Vergleich dazu eine signifikant erhöhte Produktion von IL-10 nach spezifischer Restimulation (118 ± 26 pg/ml bzw. 72 ± 39 pg/ml; $p \leq 0.0005$ bzw. $p \leq 0.05$).

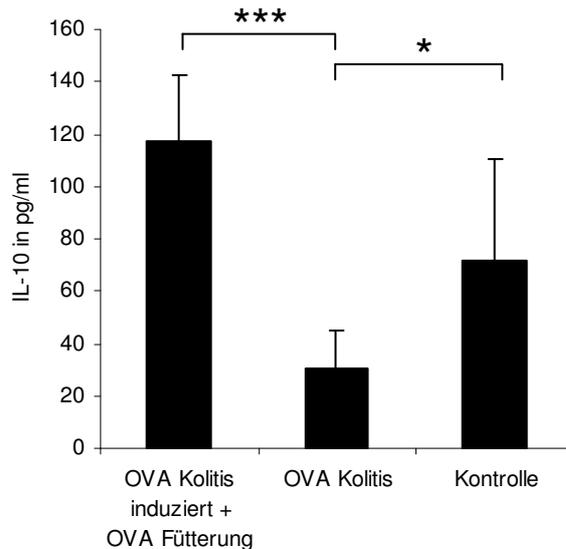


Abbildung 5.6.7.: Vergleich der IL-10 Produktion reisolierter LPMC nach OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

Reisolierter LPMC wurden über Nacht mit $5 \mu\text{g/ml}$ OVA Peptid restimuliert und die IL-10 Produktion mittels ELISA ermittelt. (***) $p \leq 0.0005$; *) $p \leq 0.05$, $n=5$)

5.7. FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen werden nach oraler Toleranz Induktion im Darm detektiert

FoxP3⁺ ist ein Transkriptionsfaktor und beschreibt regulatorische T-Zellen innerhalb des Immunsystems.

In der OVA-spezifischen Kolitis war die Anzahl der FoxP3⁺ CD4⁺ Lymphozytenpopulation im Vergleich zu den Kontrollen deutlich reduziert. Nach Fütterung mit OVA stieg die Anzahl der FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen wieder an und überstieg sogar das Niveau der Kontrollgruppe (Abbildung 5.7.1.).

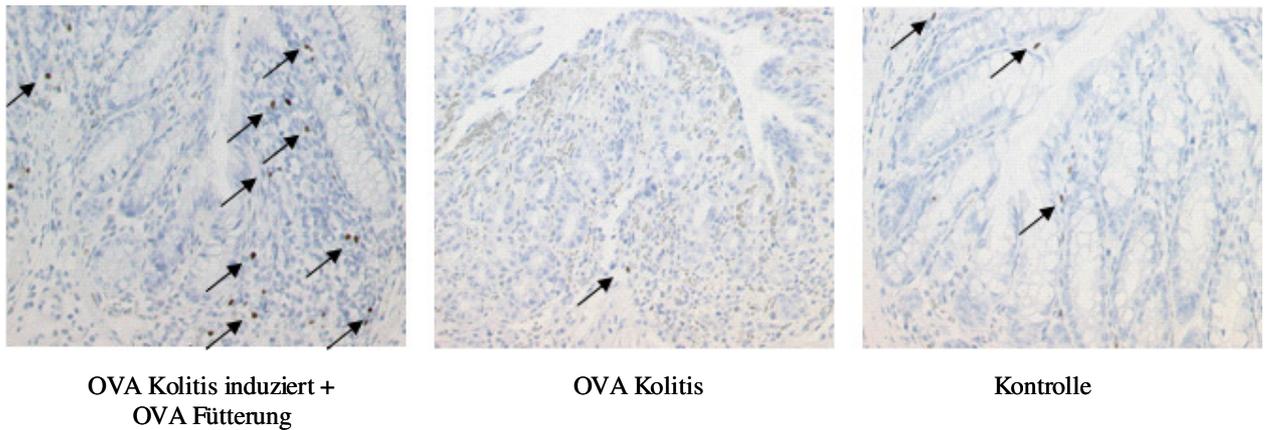


Abbildung 5.7.1.: Vergleich der FoxP3 pos. T-Zellen nach immunohistochemischer Färbung des Darmes zwischen OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen
 Dickdarmquerschnitte wurden mit einem Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörpers gefärbt und positive Zellen durch ein mehrstufiges Detektionssystem sichtbar gemacht. Bilder wurden mit einem „Zeiss Imager Z1 Axio“- Mikroskop aufgenommen. Repräsentative Bilder von 3 Tieren werden gezeigt.

Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der FoxP3 positiven Lymphozyten pro HPF (high power field) gezählt (Abbildung 5.7.2.), gemittelt aus 3HPF/Darm.

Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung FoxP3 positiver Zellen bei einer OVA-spezifischen Kolitis ($5,3 \pm 1,5$ Zellen/HPF) im Vergleich zu den Kontrollen ($12,0 \pm 1,4$ Zellen/HPF; $p \leq 0,001$). Zusätzliche Fütterung mit OVA induzierte eine signifikante Erhöhung dieser Zellpopulation ($19,7 \pm 3,1$ Zellen/HPF; $p \leq 0,0005$). Diese überstieg sogar die Anzahl der FoxP3 positiven Zellen der Kontrollgruppe ($p \leq 0,005$). Die FoxP3⁺ T-Zellen waren nicht OVA-spezifisch.

Diese Befunde zeigten sich auch nach der Isolation und der durchflusszytometrischen Analyse der CD4⁺ T-Zellen. FoxP3 positiv waren $1,5 \pm 1,0$ % der CD4⁺ Zellen in der Kolitis, $6,9 \pm 2,6$ % nach Fütterung ($p \leq 0,01$) und $5,5 \pm 0,1$ % bei den Kontrollen ($p \leq 0,0005$) (Abbildung 5.7.3.). Es konnten keine Unterschiede in der Population FoxP3 positiver T-Zellen innerhalb der mesenterialen Lymphknoten T-Zellpopulation festgestellt werden. Zusätzlich Färbungen zeigten, dass alle FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen gleichzeitig auch CD25 positiv waren (Daten nicht gezeigt).

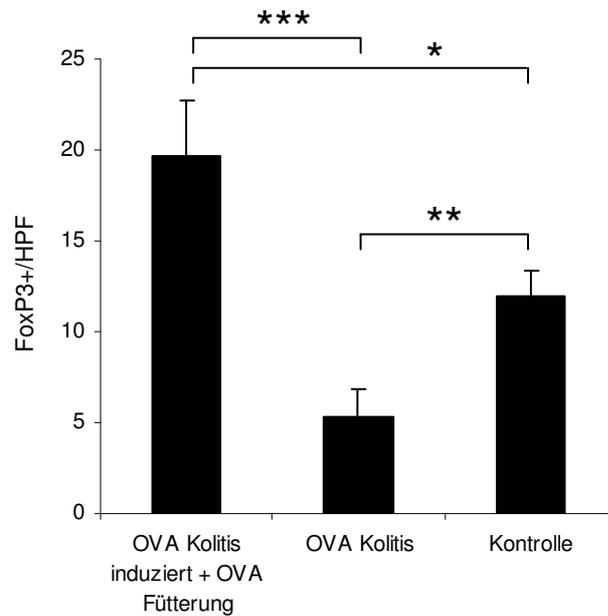


Abbildung 5.7.2.: Vergleich der prozentualen Anzahl FoxP3 pos. T-Zellen zwischen OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen nach immunhistochemischer Färbung des Darmes

Dickdarmquerschnitte wurden mit einem Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörpers gefärbt und positive Zellen durch ein mehrstufiges Detektionssystem sichtbar gemacht. Die Anzahl der positiven Zellen wurde mittels „Zeiss Imager Z1 Axio“- Mikroskop pro high power field (HPF) gezählt (** $p \leq 0,0005$; ** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,005$, $n = 4$).

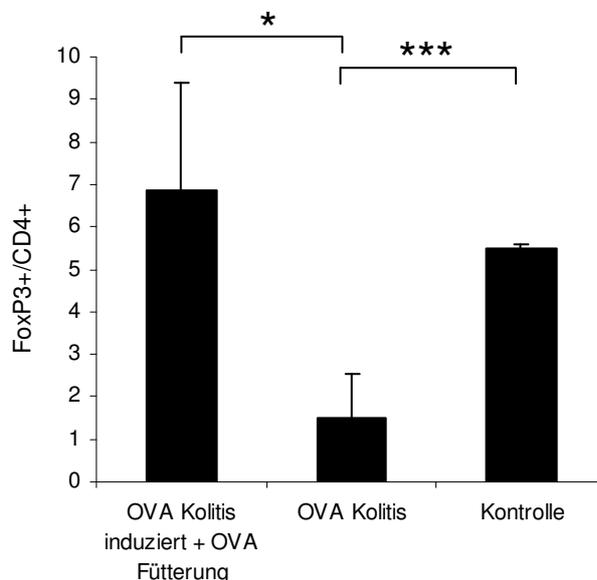


Abbildung 5.7.3.: Durchflusszytometrisch bestimmte prozentuale Anzahl FoxP3 pos. T-Zellen in der LP bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne OVA-Fütterung und Kontrollen

Isolierte LPMC der verschiedenen Versuchstiergruppen wurden isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software (BD Biosciences) (** $p \leq 0,0005$; * $p \leq 0,01$; $n = 4$).

Die durchflusszytometrische Analyse von doppel-gefärbten LPMC (Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper und Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper) zeigte ebenfalls nur eine sehr geringe Anzahl von doppel-positiven Zellen in jeder Versuchsgruppe ($< 0,1\%$). Wie in Abbildung 5.7.4. zu erkennen ist, kommt es zu einer Verlagerung zwischen OVA-TCR positiven und FoxP3 positiven Zellen je nach experimentellem Versuchsablauf. Während einer OVA-spezifischen Kolitis sinkt die prozentuale Anzahl von FoxP3 positiven Zellen, und die Anzahl von OVA-TCR positiven Zellen steigt innerhalb der Lamina propria im Vergleich zu den Kontrollen. Werden die Tiere zusätzlich nach Induktion der OVA-spezifischen Kolitis zwischen den intrarektalen Behandlungen mit OVA gefüttert, steigt die Anzahl der FoxP3 positiven Zellen erneut, sogar über das Niveau der Kontrollen hinaus, und die Anzahl der OVA-TCR positiven Zellen sinkt auf das Level der Kontrollen.

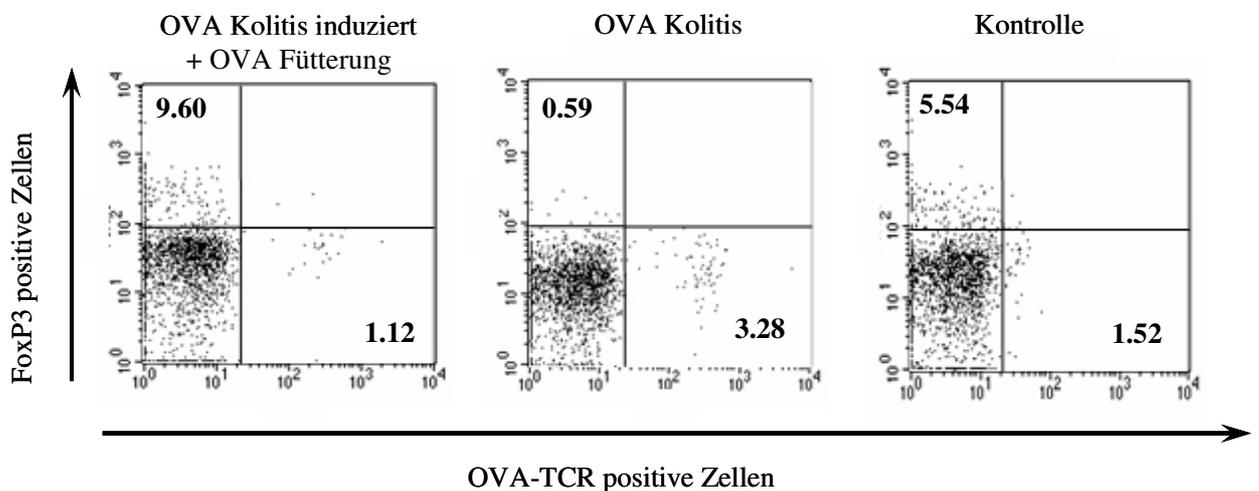


Abbildung 5.7.4.: Durchflusszytometrische Analyse von isolierten LPMC aus Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher OVA Fütterung und Kontrollen
LPMC wurden isoliert und mit einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper, einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper gefärbt. Die Auswertung der Zellen erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software (BD Bioscience). Repräsentative FACS-Histogramme von 3 Mäusen werden gezeigt (Gate auf CD4⁺ Zellen).

5.8. OVA-spezifische Kolitis Induktion in CD44v7^{-/-} Mäusen

In früheren Experimenten von Wittig und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von CD44v7^{-/-} Mäusen bzw. der Einsatz eines monoklonalen CD44v7-Antikörpers die Ausbildung einer chemisch-induzierten experimentellen Kolitis unterbindet bzw. eine etablierte experimentelle Kolitis ausheilt (Wittig et al., 2000, 1998). Durch Verwendung des neu etablierten Modells sollte die Bedeutung von CD44v7 während der Ausbildung einer solchen OVA-spezifischen Kolitis bestätigt sowie die Rolle von Makrophagen und T_H1-Zellen genauer definiert werden. Dazu wurden in einem ersten Experiment DO11.10 T_H1-Zellen und Wildtyp-Makrophagen (M ϕ) bzw. nur DO11.10 T_H1-

Zellen in CD44v7^{-/-} Mäuse transferiert. Wie in Abbildung 5.8.1. zu erkennen, zeigten Mäuse, die beide Zellpopulationen transferiert und eine OVA-spezifische Kolitis induziert bekamen, die typischen Merkmale einer experimentellen Kolitis mit z.B. Einstrom von mononukleären Zellen in die Mukosa, Hyperplasie und Verlust von Krypten und Becherzellen.

Dies korrelierte mit einem signifikant erhöhten histologischen Score nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis ($3,0 \pm 1,0$; Abbildung 5.8.2.) im Vergleich zu den Kontrollen ($1,3 \pm 0,4$; $p \leq 0,05$). Ein Versuchstier zeigte im Verlauf des Experimentes sehr starke Krankheitserscheinungen (Gewichtsabnahme $>20\%$, Lethargie und struppiges Fell), weshalb die Tötung dieses vor Ablauf des Experiments erfolgte.

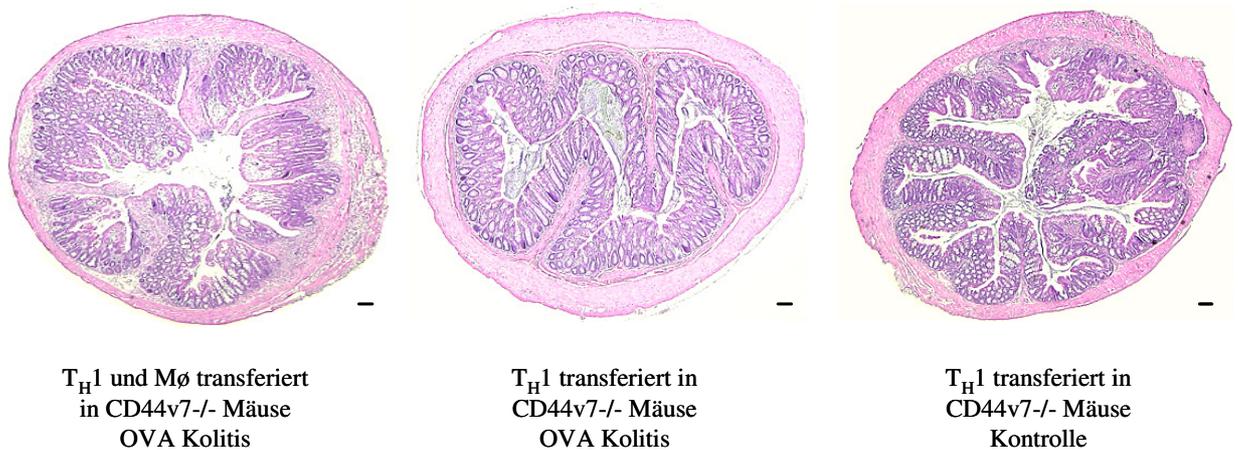


Abbildung 5.8.1.: Haematoxylin & Eosin gefärbte Dickdarmquerschnitte aus CD44v7^{-/-} Mäusen nach Transfer von DO11.10 T_H1 CD4⁺ Zellen mit und ohne wt Makrophagen (MØ) und nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis
Isolierte Dickdärme wurden geschnitten und mit Haematoxylin & Eosin gefärbt. Die Bilder wurden mit einem BZ-8000K Mikroskops aufgenommen (Messbalken 100 µm).

Wurden hingegen hochaufgereinigte DO11.10 T_H1-Zellen transferiert, zeigten sich keine Merkmale einer mukosalen Entzündung bzw. waren bei vereinzelt Tieren vorhandene leichte Entzündungserscheinungen bereits wieder ausgeheilt (Abbildung 5.8.1.). Parallel dazu zeigte sich trotz Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis keine signifikante Erhöhung des histologischen Scores ($0,5 \pm 0,9$; $p \leq 0,05$). Selbiges gilt für die mit Kontrollprotein behandelte Gruppe nach Transfer von DO11.10 T_H1-Zellen ($0,8 \pm 0,4$; $p \leq 0,05$) (Abbildung 5.8.2.).

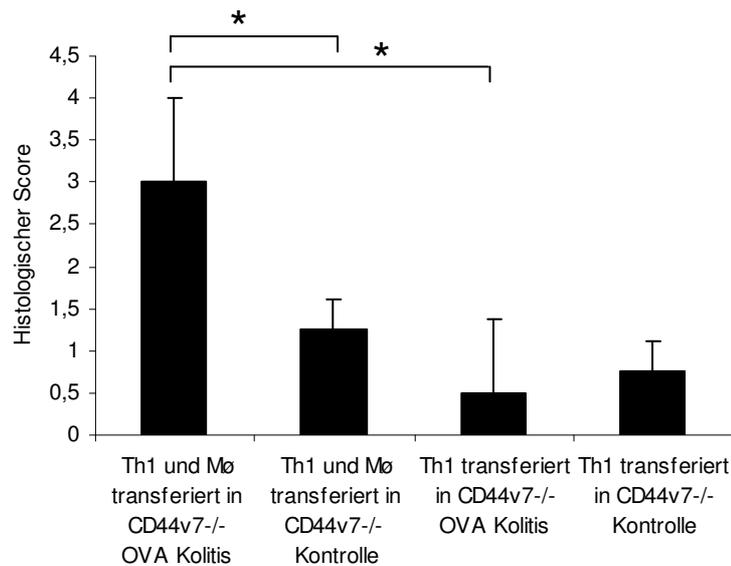


Abbildung 5.8.2.: Histologische Score der Kolons von CD44v7-/- Mäusen nach Transfer von DO11.10 T_H1 CD4⁺ Zellen mit und ohne wt Makrophagen (Mφ) und nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis

Nach der Isolation der Dickdärme wurden diese geschnitten, mit Haematoxylin & Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung mittels eines modifizierten Scoring-Schemas nach Asseman et al. [2003] bestimmt (*p ≤ 0,05 n=3).

Da die Ansammlung von OVA-TCR positiven T-Zellen innerhalb der Lamina propria als ein Merkmal der OVA-spezifischen Kolitis fungiert, erfolgte nach unterschiedlicher Behandlung die Isolation von LPMC aus dem Dickdarm und die durchflusszytometrische Analyse dieser. Es zeigte sich eine Ansammlung von OVA-TCR positiven T-Zellen innerhalb der LP nach Transfer von DO11.10 T_H1-Zellen und Wildtyp Makrophagen und anschließender Induktion einer OVA-spezifische Kolitis ($3,9 \pm 1,2$) (Abbildung 5.8.3.). Dieser Wert war im Vergleich zu den mit BSA behandelten Kontrollen (Kotransfer mit Makrohagen: $0,5 \pm 0,2$; $p \leq 0,05$; ohne Makrophagen: $0,9 \pm 0,3$; $p \leq 0,05$) bzw. zur Gruppe der nur mit DO11.10 T_H1-Zellen transferierten und OVA-spezifischen Kolitis induzierten Mäuse ($0,8 \pm 0,6$; $p \leq 0,01$; standardisierte Werte) signifikant erhöht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl OVA-TCR positiver T-Zellen innerhalb der mesenterialen Lymphknoten bei allen 4 Versuchsgruppen festgestellt werden.

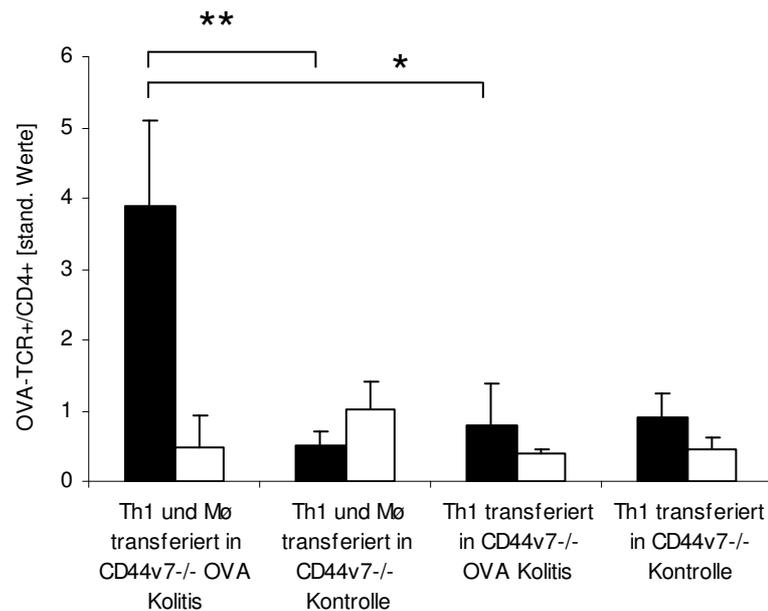


Abbildung 5.8.3.: Vergleich der Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen isoliert aus LP und mLN von CD44v7-/- nach Transfer DO11.10 T_H1 CD4⁺ Zellen mit und ohne wt Makrophagen (Mø) und nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis

LPMC (schwarzer Balken) und Zellen aus den mLN (weißer Balken) wurden isoliert und mit einem Ratten-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software der Firma BD Biosciences (**p ≤ 0,01; *p ≤ 0,05; n = 3).

5.9. Beeinflussung der CD44v7-Deletion in T-Zellen bei der Toleranz-induktion bei der OVA-spezifischen Kolitis

Zur Überprüfung des Einflusses von CD44v7 auf T-Zellen bei der Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis und oraler Toleranz wurden CD44v7-deletierte OVA-TCR pos. T_H1 Zellen in Balb/c Wildtyp Mäuse transferiert, eine entsprechende Kolitis induziert und ein Teil der Versuchstiere anschließend mit dem spezifischen Antigen gefüttert. Die histologischen Analysen zeigten, dass nach Transfer von CD44v7-deletierten Zellen eine Entzündungsreaktion innerhalb des Kolons mit den entsprechenden histologischen Charakteristika stattfand, die durch Fütterung des spezifischen Antigens unterbunden wurde (Abbildung 5.9.1.). Parallel dazu war der histologische Score nach Transfer von CD44v7-deletierten T-Zellen und Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis im Vergleich zu den Kontrollen ($0,5 \pm 0,7$; $p \leq 0,005$) signifikant erhöht ($3,2 \pm 0,8$). Erfolgte nach Transfer von CD44v7-deletierten Zellen und Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis zusätzlich eine Fütterung mit OVA, kam es erneut zu einer signifikanten Reduktion des histologischen Scores, annähernd auf das Niveau der Kontrollen ($0,7 \pm 0,6$; $p \leq 0,005$; Abbildung 5.9.2.).

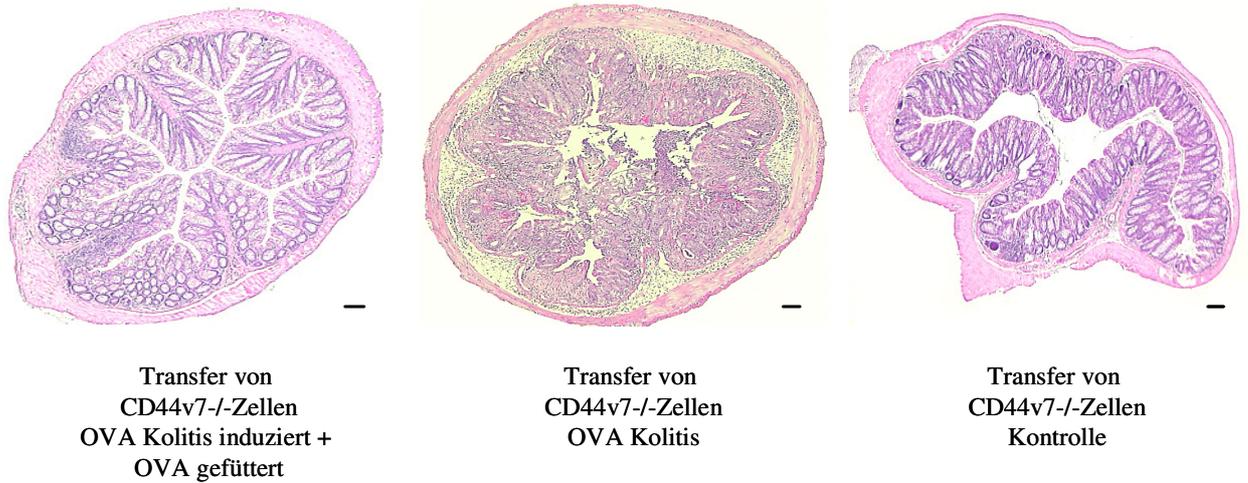


Abbildung 5.9.1.: Haematoxylin & Eosin Färbung von Darmquerschnitten aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7-/- OVA-TCR pos. T-Zellen
 Dickdärme wurden isoliert, geschnitten und mit Haematoxylin & Eosin gefärbt. Die Bilder wurden mit einem BZ-8000K Mikroskops aufgenommen (Messbalken 100 µm).

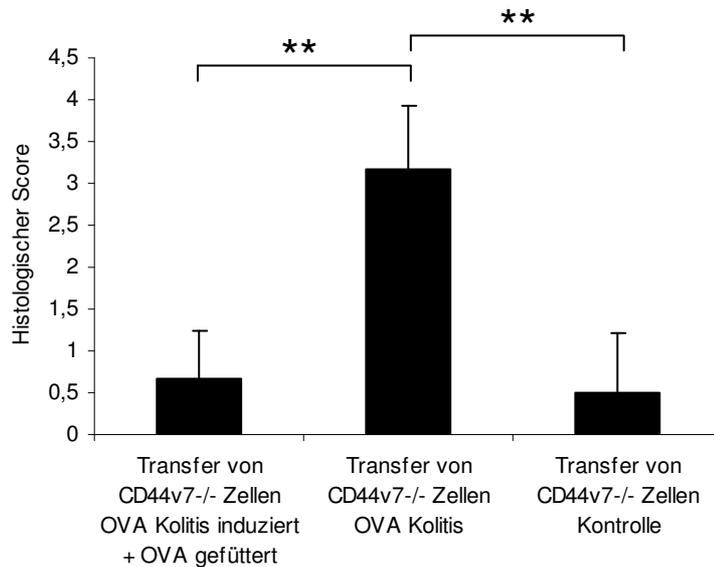


Abbildung 5.9.2.: Histologische Score der Kolons von Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7-/- OVA-TCR pos. T-Zellen
 Nach der Isolation der Dickdärme aus den unterschiedlich behandelten Versuchstieren wurden diese geschnitten, mit Haematoxylin & Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung mittels eines modifizierten Scoring-Schemas nach Asseman et al. [2003] bestimmt (**p ≤ 0,005 n=4).

Die Untersuchung auf antigen-spezifische Zellen innerhalb der Lamina propria mittels Durchflusszytometrie wies ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen auf. Dabei kam es zu einer Akkumulation von OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der LP nach Transfer von CD44v7-deletierten OVA-TCR positiven T-Zellen und Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis ($3,4 \pm 1,0$). Dies war bei den Kontrollen ($1,8 \pm 0,4$; $p \leq 0,05$) bzw. nach zusätzlicher Fütterung mit dem spezifischen Antigen OVA ($1,6 \pm 0,4$; $p \leq 0,05$; standardisierte Werte) nicht zu beobachten (Abbildung 5.9.3.). Die Analyse der mLN-Zellpopulation wies keine signifikanten Unterschiede bei der prozentualen Anzahl der OVA-TCR positiven T-Zellen auf. Eine Akkumulation von OVA-TCR positiven T-Zellen innerhalb der mesenterialen Lymphknoten erfolgte in keiner der untersuchten Tiergruppen.

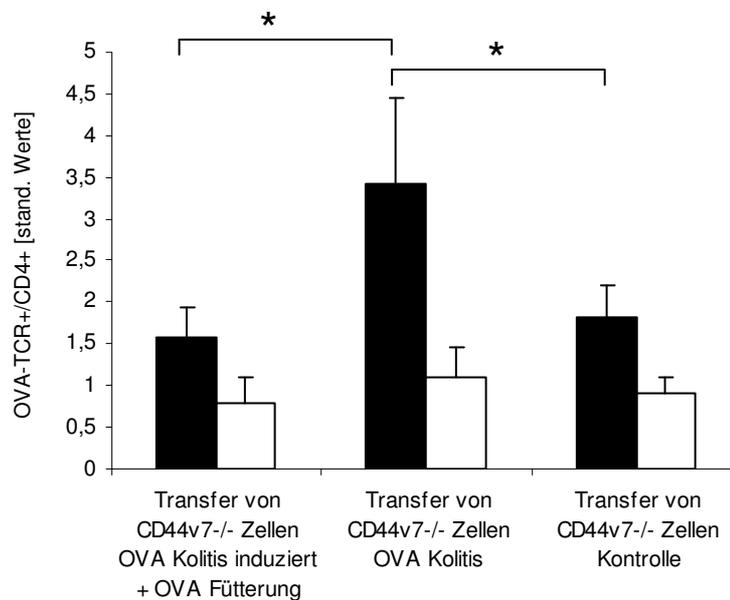


Abbildung 5.9.3.: Durchflusszytometrisch bestimmte Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen isoliert aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7-/- OVA-TCR pos. T-Zellen

LPMC (schwarzer Balken) und Zellen aus den mLN (weißer Balken) wurden isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software der Firma BD Biosciences. (* $p \leq 0,05$, $n = 4$).

Bestätigt wurde dieses Ergebnis auch durch die immunhistochemische Analyse der Darmquerschnitte. Dort konnten signifikant mehr OVA-TCR positive Zellen pro HPF nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis gezählt werden ($21,5 \pm 7,9$ Zellen/HPF) als im Vergleich zu den Kontrollen ($3,0 \pm 2,2$ Zellen/HPF; $p \leq 0,005$). Mäuse, die zwischen den intrarektalen OVA-Behandlungen zusätzlich mit dem spezifischen Antigen OVA gefüttert wurden, wiesen ebenfalls eine geringe Anzahl an OVA-TCR positiven Zellen im Darmquerschnitt auf ($2,3 \pm 1,3$ Zellen/HPF; $p \leq 0,005$) (Abbildung 5.9.4.).

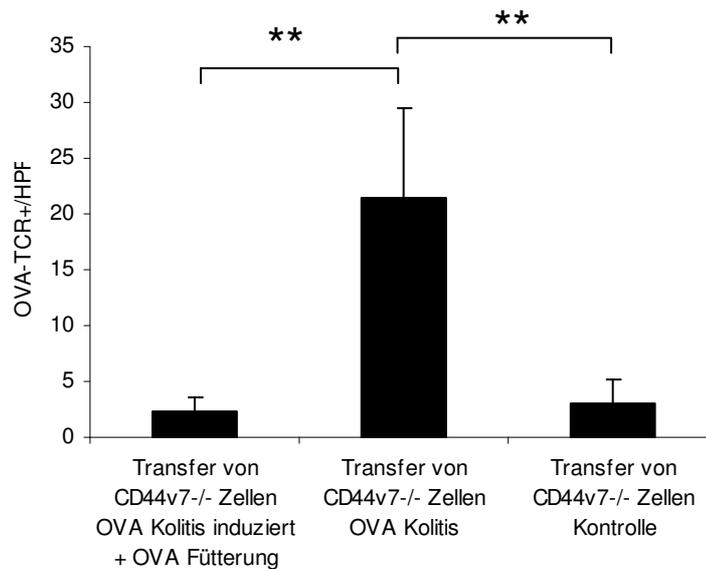


Abbildung 5.9.4.: Immunhistochemisch bestimmte Anzahl OVA-TCR pos. T-Zellen von Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7-/- OVA-TCR pos. T-Zellen

Nach Beendigung des Experiments wurden die Därme isoliert, in Stickstoff eingefroren und mit einem biotinylierten Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte mittels Dako REAL™ Detection System K5005. Die positiven Zellen wurden je HPF (high power field) gezählt (** $p \leq 0,005$, $n = 4$).

Eine Analyse des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ erfolgte nach Restimulation von aus Dickdärmen reisolierten LPMC. Mäuse mit transferierten OVA-TCR positiven CD44v7-deletierten T_H1-Zellen und induzierter OVA-spezifischer Kolitis zeigten einen signifikant erhöhten Wert an IFN- γ der reisolierten LPMC in Kultur (4522 ± 956 pg/ml), während die Zellen aus den Kontrollen keine Erhöhung dieses Zytokins nach spezifischer Restimulation aufwiesen (1991 ± 147 pg/ml; $p \leq 0,0001$). Eine Reduktion der Zytokinproduktion konnte bei LPMC der Mäuse nachgewiesen werden, die nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis wiederholt OVA oral verabreicht bekamen (313 ± 225 pg/ml; $p \leq 0,0001$) (Abbildung 5.9.5).

Die Analyse der Kulturüberstände auf das Vorhandensein des Zytokins IL-10 erfolgte ebenfalls nach Restimulation von reisolierten LPMC (Abbildung 5.9.6.). Die Induktion einer OVA spezifischen Kolitis in Balb/c Wildtyp Mäusen nach Transfer von CD44v7-deletierten T-Zellen reduziert die Bildung von IL-10 durch reisolierter LPMC in Kultur (39 ± 29 pg/ml) im Vergleich zu den Kontrollen (70 ± 14 pg/ml). Kam es zusätzlich zu einer Fütterung mit dem spezifischen Antigen OVA zwischen den intraluminalen Behandlungen, so zeigten die reisolierten LPMC in Kultur eine signifikant erhöhte IL-10 Produktion (139 ± 38 pg/ml; $p \leq 0,005$ bzw. $p \leq 0,01$).

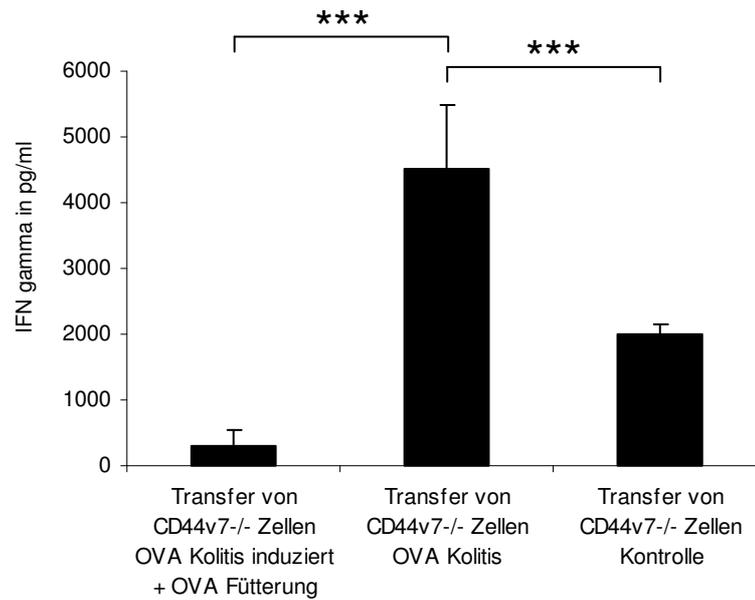


Abbildung 5.9.5.: Vergleich der IFN- γ Produktion reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen

Isolierte LPMC wurden über Nacht mit 5 μ g/ml OVA Peptid restimuliert und die IFN- γ Produktion mittels ELISA ermittelt. (***) $p \leq 0.0001$, n=10).

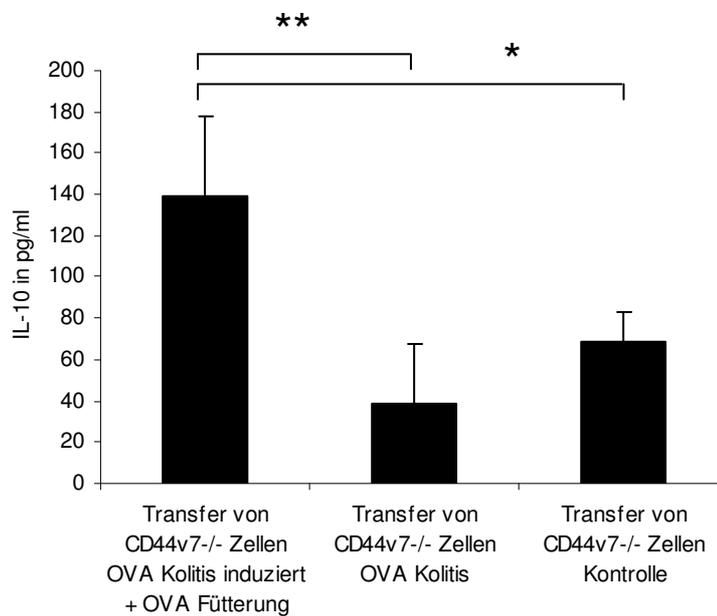


Abbildung 5.9.6.: Vergleich der IL-10 Produktion reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7^{-/-} OVA-TCR pos. T-Zellen

Isolierte LPMC wurden über Nacht mit 5 μ g/ml OVA Peptid restimuliert und die IL-10 Produktion mittels ELISA ermittelt. (**) $p \leq 0.005$, (*) $p \leq 0.01$; n=5).

Durchflusszytometrische Untersuchungen hinsichtlich des Transkriptionsfaktors FoxP3, der in regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, zeigten eine signifikante Reduktion innerhalb der LPMC-Population aus Mäusen mit etablierter OVA-spezifischer Kolitis nach Transfer von CD44v7-deletierten Zellen ($4,8 \pm 0,9 \%$), im Vergleich zu den Kontrollen ($7,9 \pm 0,2 \%$; $p \leq 0,001$) (Abbildung 5.9.7.). Erfolgte zwischen den intrarektalen Behandlungen mit OVA die orale Gabe von OVA, stieg die prozentuale Anzahl von FoxP3 positiven Zellen innerhalb der LPMC an und überstieg sogar signifikant die Werte der Kontrollen ($17,4 \pm 1,4 \%$; $p \leq 0,0005$). Dabei waren FoxP3 positive Zellen auch immer gleichzeitig CD25 positiv (Daten nicht gezeigt).

Immunhistochemische Färbungen konnten die durchflusszytometrischen Daten bestätigen. Die Auszählung der mit einem Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper gefärbten Darmschnitte ergab eine signifikant reduzierte Anzahl an FoxP3 positiven Zellen in Mäusen die eine OVA-spezifische Kolitis induziert bekamen ($3,75 \pm 1,5$ Zellen/HPF). Die Kontrollen zeigten eine erhöhte Anzahl an FoxP3 positiven Zellen in den Darmquerschnitten ($5,75 \pm 0,5$ Zellen/HPF; $p \leq 0,01$). Diese konnte jedoch durch die tägliche Fütterung (Tag 2 bis 4) mit dem spezifischen Antigen OVA zwischen den intraluminalen OVA Behandlungen (Tag 1 und 5) ($25,8 \pm 18,7$ Zellen/HPF; $p \leq 0,005$) signifikant gesteigert werden (Abbildung 5.9.8.).

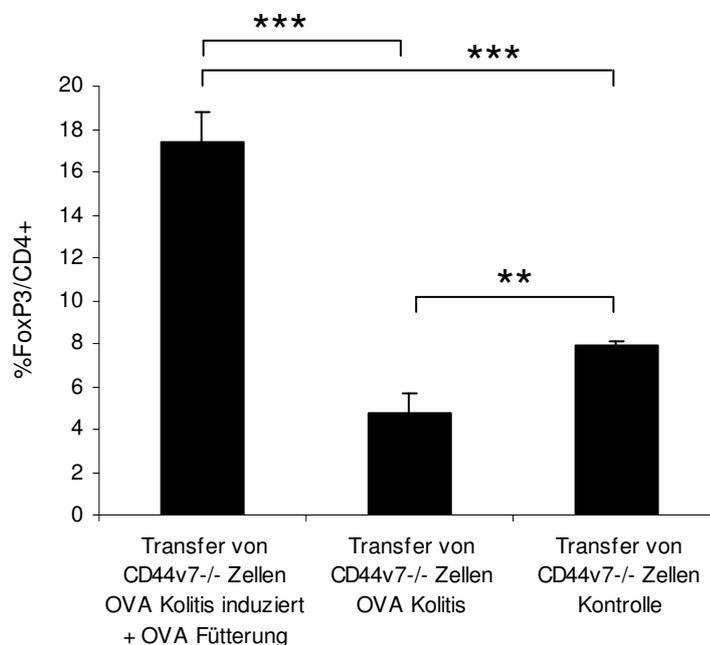


Abbildung 5.9.7.: Durchflusszytometrische Analyse von FoxP3 pos. Zellen reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7-/- OVA-TCR pos. T-Zellen

LPMC wurden isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software (BD Biosciences) (** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,0005$; $n = 4$).

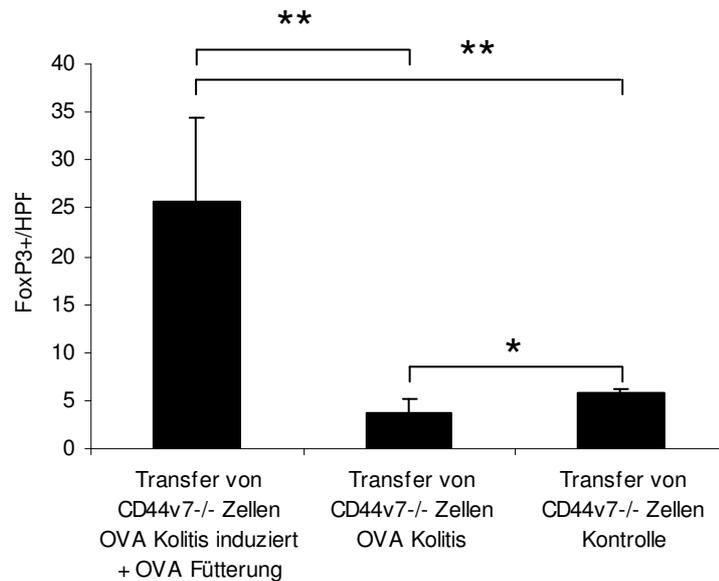


Abbildung 5.9.8.: Vergleich der Anzahl von FoxP3 pos. Zellen reisolierter LPMC aus Balb/c Wildtyp Mäusen mit OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne zusätzlicher Fütterung nach Transfer von CD44v7-/- OVA-TCR pos. T-Zellen

Dickdarmquerschnitte wurden angefertigt und die Zellen mittels eines Ratte-anti-Maus FoxP3-Antikörpers markiert und durch ein mehrstufiges Detektionssystem sichtbar gemacht. Die Anzahl der Zellen wurde mittels „Zeiss Imager Z1 Axio“- Mikroskop pro high power field (HPF) gezählt (**p≤0,005; *p≤0,01; n= 4).

5.10. OVA-spezifische Kolitis und M1.1 und Gal-2

In Kooperation mit Daniela Paalik aus der Arbeitsgruppe von Andreas Sturm (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie, Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum) wurde die Wirkung des Tierlektins Galektin-2 (Gal-2) und des Fusionsproteins M1.1 (CD44v7-IgM) auf die Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis untersucht. Die intraperitoneale Injektion von sowohl Gal-2 als auch M1.1 verhinderte die Ausbildung einer intestinalen Entzündung. Im Vergleich zu Tieren mit ausgebildeter OVA-spezifischer Kolitis konnte keine epitheliale Ulzeration, kein Einstrom von mononukleären Zellen in die Mukosa und kein Verlust von Becherzellen beobachtet werden (Abbildung 5.10.1.).

Dies wurde durch die Erhebung des histologischen Scores bestätigt. Dort kam es zur signifikanten Reduktion des histologischen Scores nach Injektion von Gal-2 ($0,8 \pm 0,3$; $p \leq 0,0005$) bzw. von M1.1 ($0,7 \pm 0,8$; $p \leq 0,001$) im Vergleich zur unbehandelten Kolitis ($3,3 \pm 0,8$). Tiere, die mit Kontrollprotein behandelt wurden, zeigten keine intestinalen Entzündungserscheinungen und wiesen einen gesunden, sehr niedrigen histologischen Score auf ($0,4 \pm 0,4$ pg/ml; $p \leq 0,0001$) (Abbildung 5.10.2.). Die intraperitoneale Injektion von PBS bzw. isotonischer Kochsalzlösung hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis (Daten nicht gezeigt).

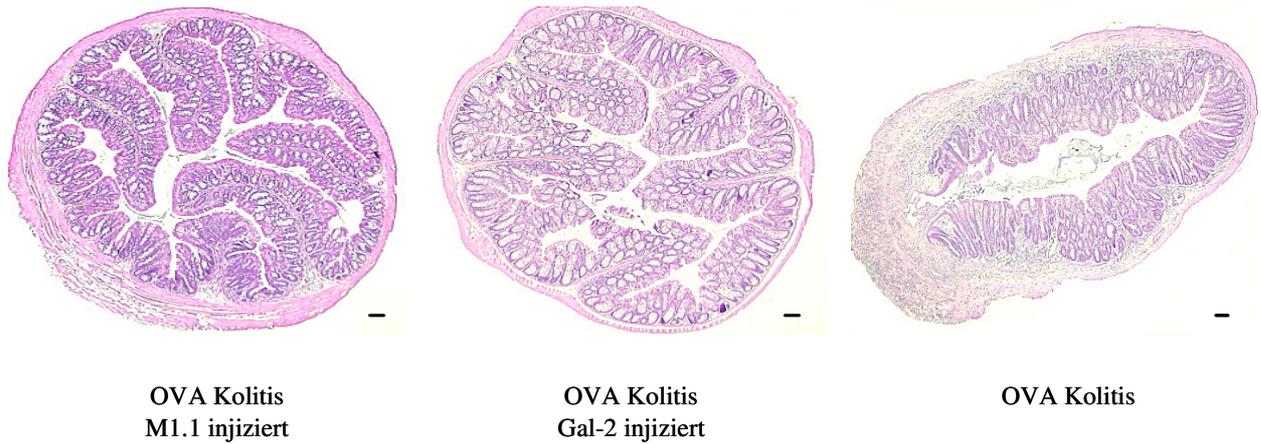


Abbildung 5.10.1.: Haematoxylin & Eosin gefärbte Dickdarmquerschnitte isoliert aus Balb/c Wildtyp nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis mit und ohne Injektion von M1.1 bzw. Gal-2
Isolierten Dickdärme wurden geschnitten und mit Haematoxylin & Eosin gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem BZ-8000K Mikroskop (Messbalken 100 μ m).

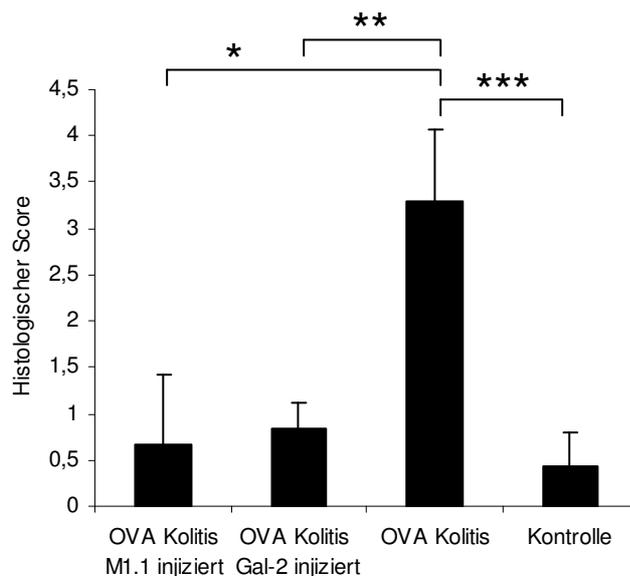


Abbildung 5.10.2.: Histologischer Score bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne Injektion von M1.1 bzw. Gal-2 im Vergleich zu Kontrollen
Isolierte Dickdärme wurden mit Haematoxylin & Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung mittels eines modifizierten Scoring-Schemas nach Asseman et al. [2003] bestimmt (** $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,0005$; * $p \leq 0,001$; $n=5$).

Parallel dazu zeigte sich, dass die Behandlung der Kolitis mit Gal-2 und M1.1 eine Reduktion von OVA-TCR positiver T-Zellen innerhalb der Lamina propria (Gal-2: $0,7 \pm 0,1$; $p \leq 0,0001$; M1.1: $1,0 \pm 0,8$; $p \leq 0,005$) im Vergleich zur unbehandelten Kolitis ($3,0 \pm 0,6$) zur Folge hat. Die Kontrollen zeigten ebenfalls eine signifikant erniedrigte Anzahl an OVA-TCR positiver T-Zellen innerhalb der LP ($1,0 \pm 0,3$; $p \leq 0,0005$; standardisierte Werte) (Abbildung 5.10.3.). Die Anzahl der

OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der mLN war bei allen vier Versuchsgruppen auf demselben niedrigen Niveau, und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

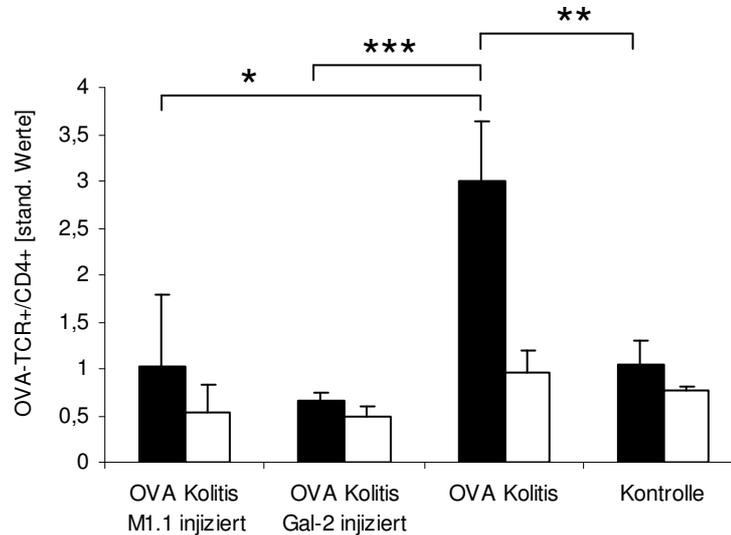


Abbildung 5.10.3.: Vergleich der Anzahl OVA-TCR pos. Zellen bei OVA-spezifischer Kolitis mit und ohne Injektion von M1.1 bzw. Gal-2 und Kontrollen

LPMC (schwarzer Balken) und mesenterialen Lymphknotenzellen (weißer Balken) wurden isoliert und mit einem Ratte-anti-Maus CD4-Antikörper und einem Maus-anti-Maus OVA-TCR-Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels FACSCalibur und der CellQuest™ Software der Firma BD Biosciences (** $p \leq 0,0001$; ** $p \leq 0,0005$; * $p \leq 0,005$; $n=5$).

6. Diskussion

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden hervorgerufen durch eine aggressive Immunantwort des Darmimmunsystems. Einer von 250 Nordeuropäern ist an diesen chronischen, wiederkehrenden Entzündungen des Gastrointestinaltrakts erkrankt (Gaya et al., 2006). In gesunden Individuen ist das mukosale Immunsystem in der Lage, eine Vielzahl von Nahrungsmittelantigenen und Antigenen der vorhandenen Darmbakterien zu tolerieren. Dieses Phänomen wird als orale Toleranz bezeichnet. Eine gebrochene Toleranz wird als möglicher Pathomechanismus der CED vermutet (Duchmann 1995; Mowat 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Modell einer antigen-spezifischen Kolitis entwickelt, dass in verschiedenen genetischen Mausmodellen etabliert werden kann und eine einfache Methode darstellen soll, um sowohl die Rolle verschiedener T-Zellpopulationen z.B. regulatorischer oder Effektor-T-Lymphozyten als auch die Mechanismen der Immunisierung im Vergleich zur oralen Toleranz, zu untersuchen. Dabei sollte vor allem auf die Rolle des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD44v7 eingegangen werden.

6.1. Ovalbumin wird im Darm präsentiert

Grundlage des antigen-spezifischen Kolitismodells war das transgene Ovalbumin (OVA)-spezifische T-Zellrezeptor (TCR) Modell DO11.10. Bis zu 97% der T-Zellen dieser Mäuse exprimieren einen T-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche, der spezifisch das OVA Peptid 323-339 erkennen kann (Murphy et al., 1990). Verschiedene Forschergruppen waren schon in der Lage, nach Transfer von OVA-TCR positiven T-Zellen und Verabreichung von OVA-exprimierenden *E.coli* Bakterien in den Darmtrakt, eine passagere Kolitis in verschiedenen Mäusestämmen zu induzieren (Iqbal et al., 2001; Yoshida et al., 2001, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die direkte Applikation von OVA in den Darm ausreichend ist, eine chronische Entzündung der Darmmukosa hervorzurufen. Es ist bekannt, dass sowohl Dendritische Zellen als auch Makrophagen Antigene aus der Mukosa aufnehmen können (Kelsall and Rescigno 2004; Smith et al., 2005). Einleitende Untersuchungen sollten jetzt vor allem klären, welche Zellen in welchem Zeitraum ein Antigen aus dem Darmlumen aufnehmen können.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass OVA schon nach 10 Minuten von intestinalen antigen-präsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen wird. Diese waren zu einem Großteil CD11b positiv, was auf intestinale Makrophagen hindeutet. Ein weiterer, jedoch geringfügiger Prozentsatz der Zellen, die das Antigen aufgenommen haben, waren CD11c positiv, ein Marker, der sich im Wesentlichen auf Dendritischen Zellen, aber auch auf Makrophagen und B-Zellen nachweisen lässt. CD11c ist ein Transmembranprotein, dass sowohl APZ aktiviert als auch den sogenannten oxidativen Burst auslösen kann, ein Oxidationsprozess, bei dem Sauerstoffradikale freigesetzt werden und der die intrazelluläre

Verdauung von Pathogenen nach Phagozytose in z.B. Makrophagen bewerkstelligt (Cabañas et al., 1989).

Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigten, dass es sich bei dem Großteil der antigen-aufnehmenden Zellen um intestinale Makrophagen handelt, da sie neben der grünen Fluoreszenz des aufgenommenen OVA-FITC-Konjugates zusätzliche eine Färbung mit dem Makrophagen-spezifischen Antikörper F4/80 aufwiesen.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass OVA schon bei der geringen Menge von 50 µg von APZ aufgenommen wird, und dass sowohl intestinale APZ von Balb/c Wildtyp Mäusen als auch von CD44v7^{-/-} Mäusen das Antigen aufnehmen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass nach der Verabreichung von OVA in den Darm, dieses sehr schnell und auch schon in geringen Mengen von intestinalen APZ sowohl in Balb/c Wildtyp als auch CD44v7^{-/-} Mäusen aufgenommen und präsentiert wird.

6.2. CD44v7 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung von oraler Toleranz

Ovalbumin ist ein Protein, das in großen Mengen im Eiklar von Vogeleiern vorkommt. Es eignet sich hervorragend für antigen-spezifische Studien, da es ein Neo-Antigen für den murinen Organismus ist und keine Kreuzreaktivität mit der Darmmukosa aufweist. Die Induktion von oraler Toleranz nach Transfer von DO11.10 (OVA-TCR positive) T-Zellen in Balb/c Wildtyp Mäuse und Fütterung mit OVA konnte schon mehrfach gezeigt werden (Van Houten and Blake, 1996; Lee et al., 2000). Ein Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden ob bei einer antigen-spezifischen Kolitis durch die Fütterung mit dem spezifischen Antigen orale Toleranz induziert und die Kolitis auf diese Art und Weise unterbunden bzw. ausgeheilt werden kann. Um die Bedeutung von CD44v7 in diesem Zusammenhang genau erläutern zu können, sollten einleitende Versuche klären, ob es möglich ist, nach Deletion von CD44v7 jeweils beim Spender- und Empfängertier, orale Toleranz zu induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl nach Transfer von DO11.10 T-Zellen als auch nach Transfer von CD44v7-deletierten OVA-TCR positiven T-Zellen in Balb/c Wildtyp, aber auch in CD44v7^{-/-} Mäuse orale Toleranz durch Fütterung mit OVA erzielt werden konnte. Ausdruck der entstandenen Anergie war eine signifikante Reduktion der Anzahl OVA-TCR positiven T-Zellen innerhalb der kaudalen Lymphknoten in gefütterten Tieren, im Vergleich zu den PBS-gefütterten Kontrollen. Fluoreszenz-Analysen mit CFSE zeigen zusätzlich, dass die Proliferation der OVA-TCR positiven T-Zellen bei gefütterten Tieren stark vermindert ist. Diese Befunde entsprechen den publizierten Ergebnissen bei Toleranzinduktion im T-Zelltransfermodell, bei denen nach Induktion oraler Toleranz eine Blockade des Zellzyklus festgestellt werden konnte (Van Houten and Blake, 1996; Sun et al., 2003).

Eine Analyse der Interferon (IFN)- γ und Interleukin (IL)-10 Produktion bei isolierten kaudalen Lymphknotenzellen zeigt eine verminderte Produktion von IFN- γ und eine erhöhte Produktion von IL-

10 bei gefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass die Fütterung mit OVA, nach Transfer von OVA-TCR positiven T-Zellen, die Proliferation dieser durch regulierende Zytokine supprimiert.

Die orale Gabe von 20 mg OVA wird als Niedrig-Dosis-Fütterung angesehen (bis 50mg) und es konnte gezeigt werden, dass diese Art der oralen Toleranzinduktion durch die Bildung regulatorischer T-Zellen erreicht wird (Miller et al., 1992). Dabei werden supprimierende Zytokine wie TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β , engl.: transforming growth factor), IL-10 und IL-4 gebildet, die eine Aktivierung von Effektor-T-Zellen und somit eine Immunantwort unterdrücken. Hoch-Dosis-Gaben von Antigen induzieren im Gegensatz dazu die Anergie und/oder klonale Deletion von Effektor-T-Zellen (Melamed und Friedman, 1993; Chen et al., 1995). Eine strikte Unterteilung scheint nach neuesten Erkenntnissen jedoch schwierig zu sein. Es ist eher wahrscheinlich, dass sich beide Mechanismen überschneiden (Garside und Mowat, 2001).

Dass der Experimentieransatz aber auch systemische Anergie hervorruft, zeigt klinisch die Induktion einer DTH (engl.: delayed type hypersensitivity) am Ohr. Gefütterte Tiere zeigen eine sehr geringe Schwellung nach Restimulation mit OVA während Kontrolltiere eine deutliche Immunisierung mit DTH Reaktion und signifikanter Ohrschwellung aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion einer oralen Toleranz unabhängig von der Expression von CD44v7 induziert werden kann, und dass diese gekennzeichnet war durch eine verminderte Anzahl an OVA-TCR positiven T-Zellen aufgrund einer reduzierten Proliferation der T-Zellen bzw. Apoptose in der Lamina propria (LP).

6.3. Ausbildung der Ovalbumin-spezifischen Kolitis

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kolitis durch intrarektal verabreichtes OVA nach Transfer von OVA-TCR positiven T-Zellen in immunkompetente Balb/c Wildtyp Mäuse induziert. Keine Kolitis konnte beobachtet werden nach Transfer von T-Zellen mit identischer Antigen-Spezifität und der Verabreichung des Kontrollproteins BSA. Dies deutet darauf hin, dass die entwickelte Kolitis antigenspezifisch ist und antigen-unspezifische T-Zellen nicht in der Lage sind, diese Kolitis zu etablieren.

Der führende klinische Befund bei den OVA-behandelten Mäusen war Durchfall mit weichem bis flüssigem Stuhl. Diarrhö ist auch das Hauptsymptom der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie dem Morbus Crohn des Menschen. Kontrolltiere wiesen in fast allen Experimenten normalen Stuhl auf. Die Behandlung mit BSA/Ethanol ruft demnach keine intestinale Entzündung und demzufolge keine veränderte Stuhlkonsistenz hervor.

Des Weiteren zeigten sowohl OVA-behandelte Mäuse als auch die Kontrollen negative Hämoocult-Ergebnisse. Die durchaus ausgeprägte Kolitis ging auch nicht mit einem signifikanten Gewichtsverlust einher. Verschiedene experimentelle Kolitis-Modelle konnten schon zeigen, dass die Schwere der

Entzündung nicht in Zusammenhang mit einem Gewichtsverlust stehen muss (Übersicht in Bouma und Strober, 2003)

Die histologischen Untersuchungen der Dickdärme zeigten auf Seiten der Kolitis-induzierten Gruppe eine Infiltration von mononukleären Zellen in die LP und die Submukosa. Darüber hinaus konnte eine Zerstörung der gleichförmigen Kryptenstruktur mit fokaler Aggregation von lymphoidalen Zellen und einem Verlust von Becherzellen beobachtet werden. Diese fokalen Infiltrate ähneln denen im SCID-Transfer-Modell, beschrieben von Powrie et al. (1993). Die transmurale Entzündung und die segmentalen Infiltrate entsprachen außerdem modellhaft den pathologischen Befunden, die bei Morbus Crohn beobachtet werden.

Der signifikante Anstieg von OVA-TCR positiven T-Zellen in der LP von OVA-behandelten Mäusen stützt die Aussage, dass es sich bei dem hier etablierten Modell um ein antigen-spezifisches Modell handelt, da keine Anhäufung dieser Zellen in der LP von Kontrollen nachgewiesen werden konnte. Es ist anzunehmen, dass die Ursache hierfür die lokale Applikation von OVA und daraus resultierender Immunreaktion und das spezifische Einwandern der OVA-TCR positiven Effektor-T-Zellen zum Ort der Entzündung ist. Keine Infiltration von OVA-TCR positiven T-Zellen sowie Entzündungserscheinungen konnten innerhalb des Dünndarms festgestellt werden, da die intrarektale Gabe von OVA mittels Gefäßkatheters auf den Kolon beschränkt war und kein Antigen in den Dünndarm appliziert werden konnte. Somit resultiert die Induktion dieser OVA-spezifischen Kolitis in einer transmuralen inflammatorischen Krankheit, die auf den Dickdarm beschränkt und auf eine T_H1 vermittelte Immunantwort zurückzuführen ist.

Im SCID-Transfer Modell (Powrie et al., 1993) konnte gezeigt werden, dass die endogene Darmflora der wesentliche antigene Stimulus für die mukosale Entzündung sein kann, da in einer nahezu „gnotobiotischen“ d.h. keimfreien Umgebung kaum Entzündungserscheinungen festgestellt werden konnten (Aranda et al., 1997). Ein wesentlicher Vorteil solcher Transfermodelle ist, dass die transferierten T-Zellen innerhalb von Geweben leicht detektierbar sind. So konnten in dem hier beschriebenen Modell die transferierten antigen-spezifischen T-Zellen durch Einsatz des anti-Maus OVA-TCR-Antikörpers KJ1-26 (Murphy et al., 1990) spezifisch detektiert werden.

Der Nachteil der bisherigen Transfermodelle ist jedoch, dass die Antigen-Spezifität dieser transferierten Zellen nicht nachgewiesen werden kann. Im SCID-Transfer-Modell konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden, ob eine Antigen-Kreuzreaktivität mit dem Darmgewebe notwendig ist, um die Kolitis zu induzieren und/oder ob antigen-spezifische T-Zellen notwendig sind, die etablierte Kolitis aufrecht zu erhalten. Im vorliegenden neu etablierten Modell war die Ausbildung der Kolitis eindeutig auf die Antigenreaktion der spezifischen T-Zellen zurückzuführen. Die Antigen-Spezifität der Immunreaktion konnte eindeutig durch die Identifikation von OVA-TCR positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie nachgewiesen werden.

Des Weiteren zeigte die Vorbehandlung mit Ethanol in der mit BSA behandelten Kontrollgruppe, dass die Unterbrechung der epithelialen Barriere nicht ausreicht, transferierte T-Zellen zu aktivieren und

die Migration in die LP zu induzieren. Diese Ergebnisse stehen in starkem Kontrast zu denen von Yoshida et al. (2001), die vermuteten, dass die Behandlung mit Ethanol zu einer zerstörten Barrierefunktion des Epitheliums führt und zu einer Translokation der intestinalen Bakterien und das dies ausreichend ist, die Homöostase der Mukosa anhaltend zu stören. Diese akute Kolitis wurde jedoch durch OVA-TCR positive T-Zellen ausgelöst, nachdem die Mäuse Ethanol und OVA exprimierende *Escherichia coli* Bakterien (*EcOVA*) verabreicht bekommen haben. In unseren Händen zeigte sich eindeutig, dass die intrarektale Gabe von Ethanol allein keine stabile Infiltration von mononukleären Zellen zufolge hat, wie wir sie während der OVA-spezifischen Kolitis vorfinden. Im Vergleich zu den Versuchen bei denen *EcOVA* verwendet wurde, ist das vorliegende Modell leicht zu reproduzieren, insbesondere da gentechnisch veränderte *Escherichia coli* nur unter bestimmten Sicherheitsbedingungen im Tierstall eingesetzt werden können. Wir halten das hier beschriebene Modell deshalb für besonders geeignet, um die Mechanismen der Immunregulation auf Antigene zu untersuchen. In diesem Modell können darüber hinaus auch die Mechanismen der oralen Toleranz im Vergleich zur antigen-spezifischen Immunisierung geklärt werden. Die direkte Applikation von OVA in den Darm und der Einsatz von Balb/c Wildtyp Mäusen stellt dabei eine Weiterentwicklung der bisherigen antigen-spezifischen Kolitismodelle dar, da auf die Verwendung von immundefizienten Mäusen und modifizierten Bakterien verzichtet werden konnte (Yoshida et.al., 2001, Iqbal et.al., 2002, Watanabe et al., 2005). Da noch unklar ist, ob und wie bakterielle Antigene auf die Immunantwort und somit die Induktion einer Kolitis wirken, ist die direkte Applikation des Proteins von Vorteil.

Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die Immunreaktion durch Zytokine vermittelt wurde, die dem T_H1 -Typ entsprechen. Dabei kam es zu einer Erhöhung in der Produktion von $IFN-\gamma$ durch T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten, LP und Darmgewebeskultur. $IFN-\gamma$ ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem von T-Zellen nach Aktivierung durch IL-12 von APZ gebildet wird. Frühe Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung von T-Zellen in intestinale Gewebe durch IL-12 und anti-CD3 eine erhöhte Sekretion von $IFN-\gamma$ zur Folge hat. Diese resultierte in einer signifikanten, schweren Gewebsverletzung (Monteleone et al., 1999). Diese T_H1 -vermittelte Immunantwort stellt einen bedeutenden Faktor der Pathophysiologie von Morbus Crohn dar. Untersuchungen in einem anderen Kolitis-Modell zeigten ebenfalls, dass die Inflammation im Darm vermittelt wird, durch die Produktion von $IFN-\gamma$ nach Aktivierung von T_H1 -Zellen durch IL-12 (Powrie et al., 1994b). In diesem Modell erfolgte die Induktion der mukosalen Entzündung mittels Transfer von $CD45^{RB^{high}}$ T-Zellen (naive T-Zellen) in SCID bzw. $Rag2^{-/-}$ Mäuse. Dies führte zu einer schweren intestinalen Entzündung nach 3 bis 5 Wochen. Ein Kottransfer mit $CD45^{RB^{low}}$ T-Zellen verhinderte hingegen die Ausbildung einer Inflammation (Morrissey et al., 1993; Powrie et al., 1994b). Die Kolitis, die in dem vorliegenden Modell beschrieben wird, ist kurzlebiger und hat einen sehr akuten Verlauf im Vergleich zum SCID-Transfer-Modell.

Langzeitversuche zeigten, dass die Entzündungserscheinungen im Darm und der Histologische Score innerhalb von 6 Tagen nach der letzten intrarektalen OVA-Applikation deutlich reduziert war, und

dass es zu einer Ausheilung der Kolitis kommt. Die Verbesserung der Symptome und Remission der Kolitis war verbunden mit der Abnahme an OVA-TCR positiven CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Lamina propria und einer reduzierten Produktion von IFN- γ (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine ein- bis zweimalige Antigengabe nicht ausreichend ist, um eine anhaltende Entzündung anzustoßen. Die wiederholte Gabe von voraktivierten OVA-TCR positiven T-Zellen und die wiederholte OVA-Applikation sorgten für eine Aufrechterhaltung der Kolitis über einen Zeitraum von bis zu 19 Tagen. Es konnten nach Beendigung des Experimentes keine OVA-TCR positiven CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Lamina propria wieder gefunden werden. Die Zellen zeigten auch keine signifikant erhöhte Sekretion von IFN- γ nach Restimulation in Kultur. Dies deutet darauf hin, dass die induzierte Langzeit-Kolitis nach 19 Tagen einen anderen Charakter aufweist, als die akute OVA-spezifische Kolitis. Es ist möglich, dass antigen-unspezifische T-Zellen durch die wiederholte Gabe von OVA kreuzimmunisiert wurden und nun die Hauptursache für die Aufrechterhaltung der Kolitis über diesen langen Zeitraum sind.

6.4. Induktion von oraler Toleranz unterdrückt die Ausbildung einer OVA-spezifische Kolitis

Wie zuvor schon erwähnt, scheint bei experimentellen Kolitismodellen und bei CED im Menschen die Ausbildung der Krankheit auf einer fehlgeleiteten Immunantwort zu basieren, die auf eine Störung des homöostatischen Gleichgewichts zurückzuführen ist (Wittig und Zeitz, 2003). Die abnormal übersteigerte Immunantwort wird dabei durch eine erhöhte Aktivierung von Effektor-T-Lymphozyten generiert (Elson et al., 2005). Durch Induktion von oraler Toleranz sollte nun versucht werden, die übersteigerte Aktivierung zu verhindern, das homöostatische Gleichgewicht wieder herzustellen und dadurch die Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis zu verhindern.

Durch die Fütterung mit dem Antigen OVA konnte die Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis unterbrochen werden. Dies wurde deutlich durch einen signifikanten Rückgang des histologischen Scores auf das Niveau der gesunden Kontrollen im Vergleich zur etablierten OVA-spezifischen Kolitis. Wie bereits diskutiert, wird orale Toleranz durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst (Garside und Mowat, 2001). Dies ist zum einen die Unterdrückung einer Immunantwort durch regulatorische Zytokine, zum anderen die Induktion von Apoptose der aktivierten Effektorzellen. Von Van Houten und Blake (1996) wurde im oralen Toleranz-Modell nach adoptivem Transfer von transgenen Zellen gezeigt, dass bereits 5 Tage nach Fütterung mit dem spezifischen Antigen eine vernachlässigbare Anzahl transferierter, transgener Zellen in der Lamina propria detektierbar war. Sie nahmen daher an, dass anerge Zellen nicht mehr in die LP einwandern. Dies könnte auch im vorliegenden Fall eine Ursache für die reduzierte Anzahl von OVA-TCR positiven T-Zellen in der LP nach der Fütterung mit OVA sein.

In dem vorliegenden Modell war die IFN- γ Sekretion der LPMC *in vitro* nach Antigen-Restimulation in den gefütterten Tieren deutlich reduziert. Da neuere Untersuchungen zeigten, dass bei Morbus Crohn die übersteigerte Immunantwort sowohl durch T_H1- als auch durch T_H17-Lymphozyten vermittelt wird (Yen et al., 2006), wurde außerdem die Konzentration von IL-17 in der Kultur der LPMC untersucht. Mäuse mit etablierter OVA-spezifischer Kolitis zeigten im Vergleich zu den Kontrollen einen deutlichen Anstieg von IL-17, der durch zusätzliche Fütterung mit OVA signifikant reduziert wurde. Daher kann man davon ausgehen, dass die Fütterung mit OVA und somit die Induktion der oralen Toleranz die Aktivierung von Effektor-T-Zellen sowohl des T_H1-Typs als auch des T_H17-Typs unterbindet. Diese Unterdrückung der Aktivierung von Effektor-T-Lymphozyten ist aller Voraussicht nach die Hauptursache dafür, dass nach Fütterung mit dem spezifischen Antigen und Induktion der oralen Toleranz die etablierte OVA-spezifische Kolitis im Tiermodell ausheilt.

Zelluläre Analysen verdeutlichten, dass bei der Toleranzinduktion in der antigen-spezifischen Kolitis regulatorische T-Zellen von Bedeutung sind. Immunhistochemisch und durchflusszytometrisch wurde ein signifikanter Anstieg von FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen innerhalb der LP von OVA-gefütterten Mäusen nachgewiesen. Dies bestätigte sich sowohl im Vergleich zu Mäusen mit etablierter OVA-spezifischer Kolitis als auch im Vergleich zu den Kontrollen. Bemerkenswert ist, dass diese regulierenden T-Zellen OVA-TCR negativ, also nicht antigen-spezifisch waren. In der LP bei OVA-spezifischer Kolitis waren keine bis spärliche FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen in den massiven Infiltraten aus OVA-TCR positiven Zellen nachweisbar. Dagegen kam es bei Toleranzinduktion zu einem weitgehend kompletten Rückgang des Anteils OVA-TCR positiver T-Zellen und dafür zu einem signifikanten und überschießenden Anstieg von FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen, der den Anteil bei gesunden Kontrollen überstieg. Dies zeigt, dass es durch Fütterung mit OVA zu einer zellulären Suppression der antigen-spezifischen Effektorzellen durch antigen-unspezifische regulatorische T-Zellen kommt. Die Mechanismen dieser Suppression sind bisher nicht komplett bekannt (Faria and Weiner, 2005). Regulierende Zytokine wie TGF- β und IL-10 scheinen daran beteiligt zu sein. IL-10 hat eine dichotome Funktion während der Immunantwort und wirkt negativ auf die Produktion von T_H1 Zytokinen. Dies wird vor allem im Kolitismodell von IL-10^{-/-} Mäusen deutlich, die eine spontane Enterokolitis entwickeln (Rennick and Fort, 2000). Im beschriebenen Modell zeigte sich bei der etablierten OVA-spezifischen Kolitis eine signifikant reduzierte IL-10 Produktion durch reisolierte LPMC, während die zusätzliche Fütterung mit OVA einen Anstieg der Produktion von IL-10 bewirkte. Es wird vermutet, dass die erhöhte Sekretion von IL-10 durch die vermehrte Anzahl von FoxP3 positiven Zellen innerhalb der LMPC Population nach Fütterung mit OVA erfolgt.

6.5. CD44v7-Deletion auf Makrophagen, aber nicht auf T-Zellen unterbindet die Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis

Deletion von CD44v7 bzw. der Einsatz von Antikörper gegen CD44v7 schützt im Mausmodell vor der Ausbildung einer chemisch-induzierten Kolitis bzw. induziert deren Ausheilung. Darüber hinaus sind doppeldeletierte CD44v7^{-/-} x IL-10^{-/-} Mäuse vor der Ausbildung einer Enterokolitis geschützt (Wittig et al, 1998, 2000). Die Bedeutung von CD44v7, das wesentlich für die intestinale Immunantwort zu sein scheint, sollte nun sowohl in der inflammatorischen Immunantwort im neu entwickelten Modell der OVA-spezifischen Kolitis als auch in der protektiven Immunantwort der antigen-spezifischen Toleranz untersucht werden.

Zu unserer Verwunderung konnte in der CD44v7^{-/-} Maus nach Transfer von OVA-TCR positiven T-Zellen und Stimulation mit Ovalbumin eine Kolitis induziert werden. Dies ließ sich allerdings nur dann reproduzieren, wenn den OVA-TCR positiven T-Zellen eine geringe Anzahl Wildtyp-Makrophagen mit erhaltener CD44v7-Expression zugemischt war. Der Transfer hochreiner T-Zellen, unabhängig ob diese CD44-Wildtyp oder CD44v7^{-/-} waren, führte nicht zur Ausbildung einer Kolitis. Somit ist die Expression von CD44v7 auf aktivierten Makrophagen essentiell, eine experimentelle Kolitis auszubilden. Das Fehlen von CD44v7 auf komplett allen Makrophagen schützt vor dieser intestinalen Entzündung. Dagegen ist die Möglichkeit, CD44v7 auf der T-Zelle hochzuregulieren, nicht relevant, denn sowohl CD44v7-Wildtyp als auch CD44v7^{-/-} T-Zellen können nach Antigenstimulation eine Kolitis in Wildtyp-Mäusen induzieren. Histologisch und immunologisch wies die Kolitis in der CD44v7^{-/-} Maus nach Kotransfer von Wildtyp-Makrophagen die gleichen Charakteristika auf wie in der Balb/c Wildtyp-Maus. Die geschützte CD44v7^{-/-} Maus zeigte dagegen einen Normalbefund in der LP. Die „Verunreinigung“ mit geringsten Mengen von Makrophagen (< 2%) mit erhaltener CD44v7-Expression reichte somit aus, antigen-induziert eine schwere intestinale Entzündung hervorzurufen.

Die Ausheilung der entzündlichen Infiltrate aus OVA-TCR positiven T-Zellen wird vermutlich durch eine erhöhte Apoptose der Effektor-T-Zellen in der Darmmukosa vermittelt. Bei CED, im Besonderen bei MC, zeigen T-Zellen, am ehesten aufgrund einer Störung der homöostatischen Balance innerhalb des Darmes, einen gesteigerten Zell-Zyklus und eine gestörte Apoptose. Die Induktion von Apoptose der Effektor-T-Zellen scheint daher eine effektive Methode die Ausbildung der Krankheit zu verhindern.

Dies bestätigte sich in unterschiedlichen experimentellen Kolutismodellen. So resultierte die Deletion von CD44v7 in einer erhöhten Apoptoserate von aktivierten Lymphozyten und Makrophagen nach Aktivierung (Wittig et al., 2000). CD44v7 wird exklusiv auf aktivierten mononukleären Zellen, Lymphozyten und Makrophagen exprimiert, insbesondere innerhalb der entzündlichen Darmmukosa (Wittig et al., 1997). Andererseits zeigten unsere Ergebnisse eindeutig, dass die Expression von CD44v7 auf Makrophagen, aber nicht auf T-Zellen essentiell für die Ausbildung der OVA-

spezifischen Kolitis ist. Es ist daher zu vermuten, dass neben der Apoptose von T-Zellen in den Infiltraten auch die Inhibition der Makrophagenaktivierung, bedingt durch das fehlende kostimulatorische Signal von CD44v7, in einer nicht-aktivierenden Präsentation des Antigens resultiert und somit zu einer verminderten Entzündung führt. Dies wurde bestätigt durch kürzliche Untersuchungen (Wittig et al, Manuskript), bei denen Makrophagen mit CD44v7-Deletion keine T-Zellaktivierung und -proliferation induzieren konnten.

Dass die Deletion von CD44v7 auf den T-Zellen keine Rolle bei der Entwicklung der OVA-spezifischen Kolitis spielt, wird durch die Ergebnisse nach Transfer von CD44v7-deletierten OVA-TCR positiven T-Zellen in Balb/c Wildtyp Mäuse bestätigt. Der Transfer dieser Zellen und die intrarektale Applikation von OVA führten zur Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis. Dabei zeigen sich dieselben Symptome und Parameter wie nach Induktion einer OVA-spezifischen Kolitis in Balb/c Wildtyp Mäusen nach Transfer von DO11.10 T-Zellen ohne CD44v7-Deletion. Sind also Wildtyp-Makrophagen vorhanden, kommt es nach Transfer von CD44v7-deletierten T-Zellen und intrarektaler Verabreichung von OVA zu einer schweren intestinalen Entzündung mit signifikantem prozentualen Anstieg von OVA-TCR positiven Zellen innerhalb der LP. Die Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis lässt sich, wie bei den DO11.10 T-Zellen, nach Transfer von CD44v7-deletierten T-Zellen durch orale Gabe von OVA unterdrücken. Auch hier wurde in der unauffälligen Mukosa eine Vermehrung von FoxP3 positiven Zellen in der LP festgestellt. Diese Ergebnisse bestätigen sowohl die Aussage, dass die Ausbildung der OVA-spezifischen Kolitis abhängig ist von der Expression von CD44v7 auf Makrophagen als auch die Aussage, dass die Expression von CD44v7 auf T-Zellen keine Auswirkung auf die Induktion einer inflammatorischen oder tolerogenen Immunantwort hat.

6.6. Therapeutische Beeinflussung der OVA-spezifischen Kolitis

M1.1 ist ein Fusionsprotein, bestehend aus humanem IgM und den murinen CD44v1-10 Varianten, und ist ein Antagonist von CD44 für die Bindung an seine Liganden, wie z.B. Hyaluronsäure als Ligand von CD44s und Osteopontin als Ligand von CD44v6 und v7. Die therapeutische Gabe von M1.1 bedeutet somit eine kompetitive Hemmung der Wirkung von CD44v7. Tatsächlich waren Mäuse nach Injektion von M1.1 vor der Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis geschützt. Dies konnte auch schon im Modell der TNBS- und DSS-induzierten Kolitis gezeigt werden (Wittig et al., 1998; Farkas et al., 2005). Wie zuvor bereits erwähnt, ist dies wahrscheinlich auf eine erhöhte Apoptose von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten zurückzuführen (Wittig et al., 2000). Hoffmann et al. (2007) zeigten zudem, dass der Einsatz von CD44v7-Antikörpern nicht nur im Mausmodell, sondern auch beim Patienten *in vitro* eine antiinflammatorische Wirkung zeigt. Dabei kam es zur Induktion der Apoptose von aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen aus der Lamina propria von Morbus Crohn-Patienten *in vitro*.

Galektin-2 (Gal-2) induziert T-Zellapoptose durch Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-9 und erhöht die Bax/Bcl-2 Ratio (Sturm et al., 2004a). Bekannt ist, dass die Bax Expression bei Morbus Crohn reduziert und die Expression von Gal-2 im entzündeten Darm nach Induktion einer DSS-Kolitis verringert ist (Sturm et al., 2004b).

In Kooperation mit Daniela Paclik aus der Arbeitsgruppe von Andreas Sturm (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Charité Campus Virchow Klinikum) wurde die Wirkung von Gal-2 während der OVA-spezifischen Kolitis untersucht (Paclik et al., 2008). Die Injektion von Gal-2 zwischen den intrarektalen Behandlungen schützte ebenfalls vor der Ausbildung einer OVA-spezifischen Kolitis. Alle Symptome, die auf die Ausbildung einer intestinalen Entzündung hindeuten, waren im Vergleich zur etablierten OVA-spezifischen Kolitis signifikant reduziert.

6.7. Zusammenfassung und Ausblick

Bei dem in dieser Dissertation vorgestellten Modell handelt es sich um eine OVA-spezifische Kolitis, die durch den adoptiven Transfer von T_H1 -Zellen in immunkompetente Mäuse und intrarektaler Applikation von OVA induziert wird. Gezeigt werden konnte, dass die induzierten intestinalen Entzündungen die Charakteristika einer chronischen transmuralen Entzündung wie bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn aufweisen. Es wurde daher als Modell für die immunpathogenetischen Abläufe der Krankheit eingesetzt und die Möglichkeiten der Beeinflussung der Immunantwort in Abhängigkeit des aktivierenden, kostimulatorischen Moleküls CD44v7 untersucht. Es zeigte sich, dass bei fehlender Expression von CD44v7 keine intestinale Entzündung ausgelöst werden kann. Induktion von oraler Toleranz heilt die Entzündung aus, dabei ist die Expression von CD44v7 nicht notwendig. Die Entzündungsblockade bei fehlender Expression von CD44v7 oder Toleranz geht mit einer vermehrten Expression von FoxP3 positiven Zellen einher.

Der Vorteil dieses neuen Modells ist, dass durch die Verwendung eines spezifischen Antigens die Möglichkeit eröffnet wird, notwendige Bedingungen für die Induktion als auch die Suppression der Kolitis zu studieren. Zudem ist es einfach in der Handhabung und kann schnell reproduziert werden.

Weitere Untersuchungen sollten sich vor allem auf die Stimulierung und Aktivierung transferierter naiver OVA-TCR Zellen in Richtung T_H1 *in vivo* konzentrieren. Des Weiteren sollte erforscht werden, ob die ausgebildete OVA-spezifische Kolitis im Langzeitmodell durch die orale Gabe des Antigens OVA ausgeheilt werden kann. Dies wäre tatsächlich ein Hinweis darauf, dass Toleranzinduktion eine bestehende, aktive Entzündung neutralisieren oder zumindest wesentlich abschwächen kann und würde eine klinische Bedeutung für die Therapie von Patienten mit Morbus Crohn andeuten. Außerdem gibt es bisher keine Erklärung, warum die Kolitis im Langzeitmodell aufrechterhalten wurde, obwohl nach 19 Tagen keine antigen-spezifischen T-Zellen mehr nachweisbar waren. Zu vermuten ist hier eine Bystander-Inflammation, ausgelöst durch antigen-unspezifische

T-Zellen. Eine Weiterentwicklung des Modells wäre auch die Verwendung von anderen bzw. mehreren spezifischen Antigenen.

Interessant für die klinische Verwendung wäre die Fragestellung, inwieweit eine Unterdrückung bzw. Ausheilung einer experimentellen Kolitis durch Transfer von FoxP3 positiven T-Zellen verwirklicht werden kann. Allerdings gelingt der Transfer regulatorischer T-Zellen aus technischen Gründen bisher nur unzureichend, da diese Zellen schwer zu kultivieren sind. In diesem Modell können neue therapeutische Ansätze untersucht werden, die vor allem die Abhängigkeit der Immunantwort von der Antigenspezifität oder die Unterscheidung der Reaktion von T-Zellen und Makrophagen klären wollen. Dabei kann sowohl die orale Gabe als auch die Injektion von therapeutischen Substanzen getestet werden.

Krankheitsmodelle im Versuchstier sind im Vergleich zum Patienten wenig individuell und spiegeln natürlich nicht das gesamte Spektrum einer komplexen Krankheit wieder. Sie können jedoch gut definierte immunologische Prozesse sehr klar darstellen. Ihre Optimierung stellt daher für mein Empfinden einen wesentlichen Bestandteil für die Entwicklung innovativer Therapien für Patienten dar.

7. Danksagung

„Per aspera ad astra“ - über die Steine zu den Sternen. An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir geholfen haben, über die Steine meiner Doktorarbeit zu klettern.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Bianca Wittig, die mich nicht nur mit diesem spannenden Thema betraut hat, sondern mir auch die Chance gegeben hat, mit meinem ausländischen Abschluss in Deutschland zu promovieren. Danke für die nie endende Unterstützung, die Hilfe bei der Umsetzung meiner experimentellen Ideen, die Diskussionsfreude und für die Beantwortung meiner tausenden von Fragen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Kürsad Turgay, der sich trotz des fachfremden Themas bereit erklärt hat, die Zweitkorrektur meiner Arbeit zu übernehmen. Ich hoffe, ich konnte Sie für das spannende Thema der mukosalen Immunität begeistern.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Katja Heilmann, die sich mit Feuereifer auf die Korrektur meiner Dissertation gestürzt hat, auch wenn es nicht immer einfach war. Danke für die vielen Diskussionen, Tipps, Ratschläge und das perfekte Arbeitsklima.

Ich bedanke mich sehr bei Frau Dr. Ute Hoffmann, die mich in die Methodik eingeführt hat, und bei Claudia Hayford, die mir die Laborarbeit erleichtert hat und mir bei der Verbesserung der Protokolle immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Es war eine Freude mit euch zu arbeiten.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Sonnenfeld-Stiftung für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Hansjürgen Frhr. von Villiez, für die sehr nette und persönliche Betreuung und das große Verständnis für die großen und kleinen Zeitverzögerungen beim Verfassen meiner Arbeit.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Christoph Loddenkemper und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere bei Simone Spiekermann und Frau Dr. Anja Kühl, für die Hilfe bei allen Immunfärbungen und bei der Analyse der Darmschnitte.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Martin Zeitz und seinen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik I der Charité CBF sowie der FEM, insbesondere Frau Dr. Ana Stiglic, für die nette Unterstützung und Zusammenarbeit während meiner Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt der AG Biotechnologie von Prof. Dr. Burkhard Micheel für die Herstellung von OVA-FITC sowie den Mitgliedern der Nachwuchsgruppe Antikörpertechnologie für die Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit und für alle Hinweise, Tipps und Hilfestellungen, wie man an Computerprogrammen und sonstigen Dingen nicht verzweifelt.

Bei Prof. Dr. Carsten Niemitz bedanke ich mich für die Hilfe bei der Zulassung zur Promotion, und dass er sich bereit erklärt hat meine „Zulassungsarbeit“ zu korrigieren und zu bewerten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der AG Prof. Dr. Alf Hamann für die Bereitstellung des KJ-Antikörpers und für die anregenden Diskussionen meine Arbeit betreffend sowie bei der AG Dr. Peter Henklein für die Herstellung des OVA-Peptids.

Mein größter Dank gilt meiner Mama und meiner besten Freundin Jule. Ihr seid meine tragenden Säulen und ich danke euch dafür, dass Ihr mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen seid. Danke für eure Liebe, Geduld, Motivation und Hilfe in allen Lebenslagen. Ohne euch wäre all das nicht machbar gewesen. Danke.

Ein weiteres dickes Dankeschön geht an meine Großeltern, die mich mit Liebe und gutem Essen überschüttet haben. Danke, dass ihr mich bei allen noch so verrückten Ideen und Projekten unterstützt habt.

Meinem Papa und dem Rest der Familie danke ich für die Unterstützung in all den Jahren und dafür, dass sie vieles ermöglicht haben.

Last but not least möchte ich mich bei meinem großartigen Freundeskreis bedanken. Ihr ward Motivationskünstler, (Telefon-)Seelsorger, Ablenkungsmanöver, Fußball-Liebhaber und Live-Ticker, Partylöwen, Schulter zum Ausweinen, Umzugshelfer, Berichterstatter, Feinschmecker, Lebensberater, Freunde des Dudens und der Kommasetzung, Tratschverein und Chefköche. Ihr habt mit mir gelebt, gelacht, geflucht, gelitten und euch gefreut. Ihr seid mein i-Punkt!

8. Literaturverzeichnis

- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X (2009) Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Disease* 15(3):341-352
- Appleman LJ, Boussiotis VA (2003) T cell anergy and costimulation. *Immunology Reviews* 192:161-80
- Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M (1997) Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4⁺, CD45RB^{high} T cells to SCID recipients. *Journal of Immunology* 158(7): 3464–3473
- Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN (2000) The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine* 191(4):603-612
- Asseman C, Read S, Powrie F (2003) Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4⁺ regulatory T cells and IL-10. *Journal of Immunology* 171(2):971-978
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* 40(8):955-962

- Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, Fletcher MJ, Chasan-Taber S, Finger E, Morales A, Le CH, Trentham DE (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and Rheumatism* 41(2):290-297
- Behrens, G, Li, M, Smith, CM, Belz, GT, Mintern, J, Carbone, FR, Heath, WR (2004) Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunology and cell biology* 82(1):84-90
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics* 27(1):20-21
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MadCAM-1. *Cell* 74(1):185-195
- Bi Y, Liu G, Yang R (2007) Th17 cell induction and immune regulatory effects. *Journal of Cell Physiology* 211(2):273-278
- Bonen DK, Cho JH (2003) The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124(2):521-536
- Bouma G, Strober W (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 3(7):521-533
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* 27(1):68-73
- Bull DM, Bookman MA (1977) Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *Journal of Clinical Investigation* 9(5):966-974
- Burks AW, Laubach S, Jones SM (2008) Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121(6):1344-1350

- Cabañas C, Lacal P, Mollinedo F, López-Rivas A, Sánchez-Madrid F, Bernabeu C. (1989) A monoclonal antibody to CD11c antigen inhibits the production of superoxide anion induced by concanavalin A in PMA-differentiated U-937 cells. *Immunology Letters* 20(3):193-197
- Call ME, Wucherpfennig KW (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annual Review of Immunology* 23:101-125
- Cehade M, Mayer L (2005) Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115(1):3-12
- Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL (1995) Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376(6536):177-180
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* 198(12):1875-1886
- Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D (1989) Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245(4915):308-310
- Corthey A (2006) A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 64(2):93-96
- De Keyser F, Elewaut D, De Wever N, Bensbaho K, Cuvelier C (1996) The gut associated addressins: lymphocyte homing in the gut. *Bailliere's Clinical Rheumatology* 10(1):25-39
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology* 102(3):448-455
- Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath M (1996) Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *European Journal of Immunology* 26(4):934-938

- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews* 206:260-276
- Faria AM, Weiner HL (2005) Oral tolerance. *Immunological Reviews* 206:232-259
- Faria AM, Weiner HL (2006) Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 13(2-4):143-157
- Farkas S, Hornung M, Sattler C, Anthuber M, Günthert U, Herfarth H Schlitt HJ, Geissler EK, Wittig BM (2005) Short-term treatment with anti-CD44v7 antibody, but not CD44v4, restores the gut mucosa in established chronic dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical and Experimental Immunology* 142(2): 260–267
- Farrell RJ, LaMont JT (2002) Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 31(1):41-62
- Ferreira CT, Seidman E (2007) Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. *Jornal de pediatria (Rio J)* 83(1):7-20.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4(4):330-336
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W (1996) Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of Immunology* 157(3):1261–1270
- Garside P, Mowat AM (2001) Oral tolerance. *Seminars in Immunology* 13(3):177-185
- Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J (2006) New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 367(9518):1271-1284
- Gee K, Kryworuchko M, Kumar A (2004) Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 52(1):13-26

- Gendelman HE, Orenstein JM, Martin MA, Ferrua C, Mitra R, Phipps T, Wahl LA, Lane HC, Fauci AS, Burke DS, et al. (1988) Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 167(4):1428-1441
- Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB (1991) X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *American Journal of Pathology* 138(6):1379-1387
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285(5425):221-227
- Greenberg BM, Calabresi PA (2008) Future research directions in multiple sclerosis therapies. *Seminars in Neurology* 28(1):121-127
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. (1997) CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737-742
- Groux H, Powrie F (1999) Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunology Today* 20(10):442-445
- Günthert U (1993) CD44: A multitude of isoforms with diverse functions. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 184:47-63
- Günthert U, Hofman M, Rudy S, Reber M, Zöllner M, Haussmann S, Matzku A, Wenzel A, Ponta, H, Herrlich P (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65(1):13-24
- Günthert U, Schwärzler C, Wittig B, Lamann J, Riuz P, Stauder R, Bloem A, Smadja-Joffe F, Zöllner M, Rolink A (1998) Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune response, tumor progression and haematopoiesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 451:43-49
- Guo Y, Wu Y, Shinde S, Sy MS, Aruffo A, Liu Y (1996) Identification of a costimulatory molecule rapidly induced by CD40L as CD44H. *Journal of Experimental Medicine* 184(3):955-961

- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6(11):1123-1132
- Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC (1994) Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *Journal of Immunology* 152(7):3282-3293
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122(7):1987-2000
- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129(2):550-564
- Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M (2002) Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology* 70(3):121-130
- Hoffmann U, Heilmann K, Hayford C, Stallmach A, Wahnschaffe U, Zeitz M, Günthert U, Wittig BM (2007) CD44v7 ligation downregulates the inflammatory immune response in Crohn's disease patients by apoptosis induction in mononuclear cells from the lamina propria. *Cell Death and Differentiation* 14(8):1542-1551
- Hyun JG, Barrett TA (2006) Oral tolerance therapy in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* 101(3):569-571
- Iqbal N, Oliver JR, Wagner FH, Lazenby AS, Elson CO, Weaver CT (2002) T helper 1 and T helper 2 cells are pathogenic in an antigen-specific model of colitis. *Journal of Experimental Medicine* 195(1):71-84
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20:197-216
- Jensen-Jarolim E (2006) Mukosale Immunität. In: Gastrointestinaltrakt. *Springer, Berlin* 87-148

- Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(5):832-836
- Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM (2004) Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 50(2):81-92
- Kagnoff MF (2007) Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *Journal of Clinical Investigation* 117(1):41-49
- Kelsall BL, Rescigno M (2004) Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. *Nature Immunology* 5(11):1091-1095
- Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T (2001) Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microscopic Research and Technique* 53(4):241-245
- König H, Ponta H, Herrlich P (1998) Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator. *EMBO Journal* 17(10):2904-2913.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewski K, Müller W (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75(2):263-274
- Kumar S, Jack R (2006) Invited review: Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *Journal of Endotoxin Research* 12(5):278-284
- Lack G (2008) Clinical practice. Food allergy. *New England Journal of Medicine* 359(12):1252-1260
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 201(2):233-240
- Lee HO, Miller SD, Hurst SD, Tan LJ, Cooper CJ, Barrett TA (2000) Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T-cell migration to sites of inflammation. *Gastroenterology* 119(1):129-138

- Lee KH, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS (2003) The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302(5648):1218-1222
- Lee SH, Starkey PM, Gordon S (1985) Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *Journal of Experimental Medicine* 161(3):475-489
- Lindsay JO, Hodgson HJ (2001) Review article: the immunoregulatory cytokine interleukin-10--a therapy for Crohn's disease? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 15(11):1709-1716
- Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, Marboe C, Donna Mancini D, Cortesini R, Suci-Foca N (2004) Alloantigen specific CD8⁺CD28⁻ FoxP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *International Immunology* 16(8):1055-1068
- Mannick EE, Bonomolo JC, Horswell R, Lentz JJ, Serrano MS, Zapata-Velandia A, Gastanaduy M, Himel JL, Rose SL, Udall JL Jr, Hornick CA, Liub Z (2004) Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Immunology* 112(3):247-257
- Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, Louka AS, Clot F, Percopo S, Coto I, Hugot JP, Ascher H, Sollid LM, Greco L, Clerget-Darpoux F (2004) HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetics Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigens* 63(6):562-567
- Mason D, Powrie F (1990) Memory CD4⁺ T cells in man form two distinct subpopulations, defined by their expression of isoforms of the leucocyte common antigen, CD45. *Immunology* 70(4):427-433
- Mattes J, Foster PS (2003) Regulation of eosinophil migration and Th2 cell function by IL-5 and eotaxin. *Current Drug Targets Inflammation and Allergy* 2(2):169-174
- McFarland BJ, Sant AJ, Lybrand TP, Beeson C (1999) Ovalbumin(323-339) peptide binds to the major histocompatibility complex class II I-A(d) protein using two functionally distinct registers. *Biochemistry* 38(50):16663-16670

- Melamed D, Friedman A (1993) Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *European Journal of Immunology* 23(4):935-942
- Melamed D, Friedman A (1994) In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *European Journal of Immunology* 24(9):1974-1981
- Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL (1992) Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(1):421-425
- Milling SW, Cousins L, MacPherson GG (2005) How do DCs interact with intestinal antigens? *Trends in Immunology* 26(7):349-352
- Monteleone G, MacDonald TT, Wathen NC, Pallone F, Pender SL (1999) Enhancing Lamina propria Th1 cell responses with interleukin 12 produces severe tissue injury. *Gastroenterology* 117(5):1238-1241
- Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD (1993) CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 178(1):237-244
- Mosmann TR, Cherwinski C, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136(7):2348-2357
- Mowat AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Review Immunology* 3(4):331-341
- Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250(4988):1720-1723
- Murphy KM, Travers P, Walport M (2008) Janeway's Immunology. 7th Revised Edition. *Taylor & Francis, London*

- Nanno M, Matsumoto S, Koike R, Miyasaka M, Kawaguchi M, Masuda T, Miyawaki S, Cai Z, Shimamura T, Fujiura Y (1994) Development of intestinal intraepithelial T lymphocytes is independent of Peyer's patches and lymph nodes in aly mutant mice. *Journal of Immunology* 153(5):2014-2020
- Newberry RD, Lorenz RG (2005) Organizing a mucosal defense. *Immunological Reviews* 206: 6-21
- Nielsen CH, Marquart HV, Leslie RGQ (2005) The Role of Complement in Immune and Autoimmune Responses. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 32:68-82
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307(5707):254-258
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3):694-702
- Ostanin DV, Pavlick KP, Bharwani S, D'Souza D, Furr KL, Brown CM, Grisham MB (2006) T cell-induced inflammation of the small and large intestine in immunodeficient mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290(1):G109-119
- Paclik D, Berndt U, Guzy C, Dankof A, Danese S, Holzloehner P, Rosewicz S, Wiedenmann B, Wittig BM, Dignass AU, Sturm A (2008) Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice. *Journal of Molecular Medicine* 86(12):1395-1406
- Paul WE, Seder RA (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76(2):241-251
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 4(1):33-45
- Poussier P, Julius M (1994) Intestinal intraepithelial lymphocytes: the plot thickens. *Journal of Experimental Medicine* 180(4):1185-1189

- Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffman RL (1994a) Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 179(2): 589-600
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Barcomb Caddle L, Coffman RL (1993) Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International immunology* 5(11):1461-1471
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Barcomd Caddle L, Coffmann R (1994b) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1(7):553-562
- Read S, Malmström V, Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 192(2):295-302.
- Reiner SL (2007) Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129(1):33-36.
- Rennick DM, Fort MM (2000) Lessons From Genetically Engineered Animal Models XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 278:G829–G833
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology* 2(4):361-367
- Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Schölmerich J, Gross V (1997) Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 9(9):893-899
- Romagnani S (2008) Human Th17 cells. *Arthritis Research & Therapy* 10(2):206
- Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P (1997) Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology* 110(1):104-113

- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology* 22:745-763
- Salmi M, Jalkanen S (2005) Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunological Reviews* 206:100-113
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, 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(3):1151-1164
- Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101(5):455-458
- Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* 22:531-562
- Sampson HA (1999) Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103(5 Pt 1):717-728
- Sands BE (2007) Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *Journal of Gastroenterology* 42(1):16-25
- Schenk M, Mueller C (2007) Adaptations of intestinal macrophages to an antigen-rich environment. *Seminars in Immunology* 19(2):84-93
- Shevach EM (2002) CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews. Immunology* 2(6):389-400
- Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE (2005) Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunological Reviews* 206:149-159
- Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H (2001) Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *Journal of Immunology* 167(5):2651-2656

- Stinchcombe JC, Griffiths GM (2003) The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8+ CTL. *Seminars in Immunology* 15(6):301-305
- Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH (2008) IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *Journal of Immunology* 181(9):5948-5955
- Strober W, Fuss I, Mannon P (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* 117(3):514-21
- Sturm A, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Wiedenmann B, Rosewicz S, Dignass AU, Gabius HJ (2004a) Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *Journal of Immunology* 173(6):3825–3837
- Sturm A, Leite AZ, Danese S, Krivacic KA, West GA, Mohr S, Jacobberger JW, Fiocchi C (2004b) Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53(11):1624–1631
- Sun J, Alison Stalls M, Thompson KL, Fisher Van Houten N (2003) Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction. *Cellular Immunology* 225(1):33-41
- Van Houten N, Blake SF (1996) Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 157(4):1337-1341
- Watanabe T, Yamori M, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y (2005) CD4+CD25+ T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflammatory Bowel Disease* 11(6):541-550
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53(11):1658-64
- Weiner HL (2001) Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3(11):947-954

- Wittig BM, Johansson B, Zöller M, Schwärzler C, Günthert U (2000) Abrogation of Experimental Colitis Correlates with Increased Apoptosis in Mice Deficient for CD44 Variant Exon 7 (CD44v7). *Journal of Experimental Medizin* 191(12):2053–2063
- Wittig BM, Schwärzler C, Föhr N, Günthert U, Zöller M (1998) Cutting Edge: Curative Treatment of an Experimentally Induced Colitis by a CD44 Variant V7-Specific Antibody. *Journal of Immunology* 161(3):1069–1073
- Wittig B, Seiter S, Föger N, Schwärzler C, Günthert U, Zöller M (1997) Functional activity of murine CD44 variant isoforms in allergic and delayed type hypersensitivity. *Immunology Letters* 57(1-3): 217–223
- Wittig BM, Seiter S, Schmidt DS, Zuber M, Neurath M, Zoller M (1999) CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Laboratory investigation* 79(6):747-759
- Wittig BM, Stallmach A, Zeitz M, Günthert U (2002) Functional involvement of CD44 variant 7 in gut immune response. *Pathobiology* 70(3):184-189
- Wittig BM, Zeitz M (2003) The gut as an organ of immunology. *International Journal of Colorectal Disease* 18(3):181-187
- Wong WM, Stamp GW, Elia G, Poulosom R, Wright NA (2000) Proliferative populations in intestinal metaplasia: evidence of deregulation in Paneth and goblet cells, but not endocrine cells. *Journal of Pathology* 190(1):107-113.
- Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA (2001) A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *Journal of Immunology* 166(12):7282-7289
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D (2006) IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *Journal of Clinical Investigation* 116(5):1310-1316

Yoshida M, Shirai Y, Watanabe T, Yamori M, Iwakura Y, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y (2002) Differential localization of colitogenic Th1 and Th2 cells monospecific to a microflora-associated antigen in mice. *Gastroenterology* 123(6):1949-1961

Yoshida M, Watanabe T, Usui T, Matsunaga Y, Shirai Y, Yamori M, Itoh T, Habu S, Chiba T, Kita T and Wakatsuki Y (2001). CD4 T cells monospecific to ovalbumin produced by *Escherichia coli* can induce colitis upon transfer to BALB/c and SCID mice. *International Immunology* 13(12):1561-1570

Zhu J, Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112(5):1557-1569

9. Anhang

Tabelle 9.1.: Standardisierte Mittelwerte und Standardabweichung reisolierter OVA-TCR-positiver Zellen aus kaudalen Lymphknoten mit und ohne Induktion oraler Toleranz in Balb/c und CD44v7-/- Mäusen

| Zellen aus | Balb/c OVA tg | Balb/c OVA tg | CD44v7-/- OVA tg | CD44v7-/- OVA tg | Balb/c OVA tg | Balb/c OVA tg | CD44v7-/- OVA tg | CD44v7-/- OVA tg |
|-------------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| transferiert in | Balb/c | Balb/c | Balb/c | Balb/c | CD44v7-/- | CD44v7-/- | CD44v7-/- | CD44v7-/- |
| Fütterung | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Mittelwert | 2,57 | 1,13 | 1,89 | 1,19 | 2,49 | 1,00 | 2,11 | 1,05 |
| Standard- abweichung | 0,81 | 0,21 | 0,31 | 0,32 | 0,79 | 0,17 | 0,15 | 0,10 |
| n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Pamela Holzlöhner

Berlin, den 2. Juli 2009