

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
in Berlin-Buch

DISSERTATION

Chemokin-abhängige Rekrutierung und Funktionalität von
T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen
Bedingungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité . Universitätsmedizin Berlin

von

Solveig Tetzlaff

aus Cottbus

Datum der Promotion: 18.12.2020

INHALTSVERZEICHNIS

	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
	Abkürzungsverzeichnis	VII
	Zusammenfassung	XI
	Summary	XIII
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das lymphatische System	1
1.1.1	Sekundäre lymphatische Gewebe	1
1.1.1.1	Milz	1
1.1.1.2	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT)	2
1.1.1.3	Das Peritoneum als immunologisches Organ	5
1.1.2	Die zelluläre Immunabwehr	6
1.1.2.1	T-Lymphozyten	8
1.2	Mechanismen der Lymphozytenmigration und Rezirkulation	10
1.2.1	Vier-Stufen-Modell der transendothelialen Migration von Leukozyten	10
1.2.2	Das Chemokin-/ Chemokinrezeptorsystem	11
1.2.2.1	Homöostatische und inflammatorische Funktionen des Chemokin-/ Chemokinrezeptorsystems	13
1.2.2.2	Biologische Bedeutung von CXCR3	14
1.2.2.3	Biologische Bedeutung von CXCR5	17
1.2.3	Struktur und Funktion von Adhäsionsmolekülen	19
1.3	Pathophysiologische Immunantworten im Darm	23
1.3.1	Akute und chronische Dickdarmentzündungen beim Menschen (Kolitis)	23
1.3.2	Mausmodelle für entzündliche Darmerkrankungen	25
1.4	Aufgabenstellung	27

2.	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Material	28
2.1.1	Puffer und Medien	28
2.1.2	Chemikalien	28
2.1.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	29
2.1.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.5	Software	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden	32
2.2.1.1	Isolierung von primären mononukleären Zellen	32
2.2.1.1.1	Isolierung von mononukleären Zellen aus der Milz	32
2.2.1.1.2	Erythrozytenlyse	32
2.2.1.1.3	Isolierung von Knochenmarkszellen	32
2.2.1.1.4	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Peritoneum	33
2.2.1.1.5	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Kolon	33
2.2.1.1.6	Ermittlung von Zellzahl und Vitalität	34
2.2.1.2	Durchflusszytometrie	34
2.2.1.2.1	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	35
2.2.1.2.2	<i>Gating</i> -Strategie von T-Zellen in der Durchflusszytometrie	35
2.2.2	Tierexperimentelles Arbeiten	35
2.2.2.1	Generierung stabiler gemischter Knochenmarkschimäre	36
2.2.2.2	Gewichtsermittlung der Versuchstiere	36
2.2.2.3	Induktion einer DSS-vermittelten Kolitis	36
2.2.2.4	Intraperitoneales <i>Priming</i>	36
2.2.3	Histologische Methoden	37

2.2.3.1	Herstellung von Paraffinschnitten	37
2.2.3.2	Anfertigung von Übersichtsfärbungen mittels H&E	37
2.2.3.3	Histologische Begutachtung und Krankheitsscore	38
2.2.4	Statistik	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1	Bedeutung der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CXCR3 für die organspezifische Rekrutierung von T-Lymphozyten während einer akuten Kolitis	39
3.1.1	CXCR5 KO-Mäuse zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber einer akuten DSS-Kolitis	39
3.1.2	Verringerte Anzahl von T-Zellen im Kolon von CXCR5 KO-Mäusen	41
3.1.3	Mausmodell zur Generierung stabiler gemischter Knochenmarks-chimäre	42
3.1.3.1	Reduzierte intraepitheliale Anreicherung von CXCR5 ^{-/-} T-Zellen und CXCR5 ^{-/-} CXCR3 ^{-/-} T-Zellen unter homöostatischen Bedingungen	44
3.1.3.2	Verminderte intraepitheliale Anreicherung von CXCR5 ^{-/-} T-Zellen sowie CXCR5 ^{-/-} CXCR3 ^{-/-} T-Zellen während einer akuten Kolitis	45
3.1.3.3	CXCR5 ^{-/-} T-Zellen zeigen keine, CXCR5 ^{-/-} CXCR3 ^{-/-} T-Zellen zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung unter homöostatischen Konditionen verglichen zu Wt T-Zellen	47
3.1.3.4	CXCR5 ^{-/-} CXCR3 ^{-/-} T-Zellen, jedoch nicht CXCR5 ^{-/-} T-Zellen, zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung unter inflammatorischen Konditionen verglichen zu WT T-Zellen	50
3.1.4	<i>Rescue</i> -Versuche von KO-Mäusen während akuter Kolitiden	51
3.1.4.1	<i>Rescue</i> von KO-Mäusen mittels intravenöser Injektion von Wt T-Zellen	51
3.1.4.2	<i>Rescue</i> von KO-Mäusen während einer akuten DSS-Kolitis mittels intravenöser Injektion von Wt oder CXCR5 ^{-/-} T-Zellen	53

3.2	Expression von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen und B-Zellen unter dem Einfluss des peritonealen Mikromilieus als Einflussfaktor der akuten Kolitis	56
3.2.1	Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen auf B-Zellen und T-Zellen	57
3.2.2	Injektion von B-Lymphozyten und T-Zellen splenischen Ursprungs in das murine Peritoneum führt zum intraperitonealen <i>Priming</i>	61
4.	DISKUSSION	64
4.1	CXCR5 beeinflusst eine akute Kolitis im Mausmodell	64
4.1.1	Potentielle CXCR5-abhängige Mechanismen in der Regulation intestinaler Entzündungen	65
4.1.2	Die Bedeutung von CXCR5 und CXCR3 für T-Zell-regulierte lokale Immunantworten und intestinale <i>Repair</i> mechanismen	68
4.2	Das Peritoneum als Prägungsort für das intestinale <i>Homing</i> von T-Zellen	73
4.2.1	Potentiell bedeutsame Adhäsionsmoleküle für die transperitoneale Migration von T-Zellen in das entzündete Kolon	74
4.2.2	Funktionelle und strukturelle Plastizität statt angeborener Konditionierung	78
4.3	Ausblick: Pathophysiologische Funktionen von CXCR5	80
5.	LITERATURVERZEICHNIS	82
6.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	92
7.	LEBENS LAUF	93
8.	PUBLIKATIONS LISTE	95
9.	DANKSAGUNG	96

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe des Dünndarms und Kolons
- Abb. 2 Überblick der Subgruppen von CD4⁺ T-Lymphozyten
- Abb. 3 Funktionen von T-Zellen
- Abb. 4 Vier-Stufen-Modell der Leukozytenmigration
- Abb. 5 Chemokine und ihre Chemokinrezeptoren
- Abb. 6 Homöostatische und inflammatorische Funktionen der Chemokinrezeptoren
- Abb. 7 Einteilung zellulärer Adhäsionsmoleküle
- Abb. 8 Flussdiagramme zur Zuordnung statistischer Tests
- Abb. 9 Höhere Empfindlichkeit von CXCR5^{-/-} Mäusen bei einer akuten DSS-Kolitis im Vergleich zu Wt-Mäusen
- Abb. 10 CXCR5^{-/-} Mäuse zeigen eine verringerte Frequenz von intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon verglichen zu Wt-Mäusen unter homöostatischen wie auch akut-entzündlichen Bedingungen
- Abb. 11 Mausmodell zur Generierung stabiler gemischter Knochenmarkschimäre
- Abb. 12 Repräsentative *Gating*-Strategie zur Differenzierung von Wt und CXCR5^{-/-} Zellen des Kolons in stabilen gemischten Knochenmarkschimären
- Abb. 13 CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen und CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraepitheliale Anreicherung unter homöostatischen Bedingungen
- Abb. 14 CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen und CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraepitheliale Anreicherung während einer akuten Kolitis im Vergleich zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen
- Abb. 15 Repräsentative *Gating*-Strategie zur Differenzierung von Wt und CXCR5^{-/-} Zellen des Peritoneums in stabilen gemischten Knochenmarkschimären
- Abb. 16 CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen keine, CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung unter homöostatischen Bedingungen
- Abb. 17 CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} sowie CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung während einer akuten Kolitis
- Abb. 18 *Rescue* von $\gamma\delta$ KO-Mäusen unter einer akuten DSS-Kolitis
- Abb. 19 *Rescue*-Modell von $\gamma\delta$ KO-Mäusen unter einer akuten DSS-Kolitis mittels intravenöser Injektion von Wt oder CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen

- Abb. 20 $\gamma\delta$ KO-Mäuse zeigen nach Injektion von CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen verglichen zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen nur geringe Defizite im Regenerationsvermögen nach einer akuten Entzündung
- Abb. 21 CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine verringerte Anreicherung in Peritoneum und Kolon nach Injektion in $\gamma\delta$ KO-Mäuse verglichen zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen
- Abb. 22 Exemplarische *Gating*-Strategie für B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz und des Peritoneums bezüglich der Expressionslevel von CD44
- Abb. 23 Übersicht der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen der Milz und des Peritoneums
- Abb. 24 Quantitative Darstellung der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen der Milz und des Peritoneums
- Abb. 25 Übersicht der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz und des Peritoneums
- Abb. 26 Intraperitoneale Injektion splenischer B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen führt zum *Priming* mit Hoch- oder Runterregulation der untersuchten Adhäsionsmoleküle

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Auswahl von Modellen zur Generierung einer akuten Kolitis
- Tab. 2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
BCA-1	<i>B-cell attracting chemokine-1</i>
BLC	<i>B-lymphocyte chemoattractant</i>
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CP	colonische Plaques (<i>colonic patches</i>)
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic t lymphocyte</i>)
CU	Colitis ulcerosa
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DETC	<i>dendritic epidermal t cell</i>
DKO	<i>double knock-out</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DP	doppelt positiv
DSS	Dextran Sodium Sulfat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAE	follikel-assoziiertes Epithel
FB	Fibroblast
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDC	follikuläre dendritische Zelle (<i>follicular dendritic cell</i>)
FDCM1/2	follikuläre dendritische Zelle Marker 1/ 2
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein 3</i>

GAGs	Glykosaminoglykane
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
HBSS	<i>Hankø's Balanced Salt Solution</i>
HEV	Venole mit hohem Endothel (<i>high endothelial venule</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IgA ASC	<i>IgA Ab-secreting cell</i>
IL	Interleukin
ILF	isolierter lymphoider Follikel
IL-R	Interleukinrezeptor
INF-	Interferon-
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
Kap.	Kapitel
KGF	Keratinozytenwachstumsfaktor (<i>keratinocyte growth factor</i>)
KO	<i>knock-out</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LP	Lamina propria
LPAM	<i>lymphocyte Peyer patch adhesion molecule</i>
LPL	Lamina propria Lymphozyten
LTi	<i>lymphoid tissue inducer</i>
LTo	<i>lymphoid tissue organizer</i>
LZ	Lymphozyt
MAdCAM-1	<i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MC	Morbus Crohn

MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
mLN	mesenterialer Lymphknoten (<i>mesenterial lymphnode</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC	Mucin
M-Zellen	<i>microfold cells</i>
MZ	Monozyt
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NKG2D	<i>natural-killer group 2, member D</i>
NP	Neutrophiler
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
OVA	Ovalbumin
PALS	periarterioläre Lymphscheide
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>peritoneal cavity</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>)
PP	Peyerscher Plaque
PT-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
pT	prä-TCR-
RA	rheumatoide Arthritis
RAG	Rekombination-aktivierendes Gen (<i>recombination-activating gene</i>)
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
S1P-R	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor

SILT	<i>solitary intestinal lymphoid tissues</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLOs	sekundäre lymphatische Organe
SP	einfach positiv (<i>single positive</i>)
SZ	Stromazelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEC	Thymische epitheliale Zelle (<i>thymic epithelial cell</i>)
T _{eff}	T-Effektorzellen
TGF-	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _{H1} /T _{H2}	T-Helferzellen Typ 1/ Typ 2
TLOs	Tertiäre lymphatische Organe
TLR	Toll-like Rezeptor
T _{mem}	<i>memory</i> T-Zelle
TNF-	Tumornekrosefaktor-
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
Vgl.	Vergleich
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
Wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

Die koordinierte Rezirkulation von Immunzellen durch die sekundären lymphatischen Organe (SLOs) und peripheren Gewebe ist essenziell für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase sowie die rasche Initiierung von Immunantworten während akuter Entzündungsreaktionen. Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle sind für die Rekrutierung von Immunzellen in ihre Zielgewebe dabei von besonderer Bedeutung. Der Chemokinrezeptor CXCR5 zählt zu den maßgeblichen Faktoren in der Genese der SLOs. CXCR5 KO (*knock-out*) Mäuse zeigen entsprechend Architekturstörungen der SLOs, welche auch das mukosale Immunsystem des Darmes betreffen. Die Rekrutierung von Lymphozyten ins Peritoneum, ist ebenfalls CXCR5-abhängig. Unter Induktion einer akuten DSS-Kolitis zeigen CXCR5 KO-Mäuse eine stärkere intestinale Entzündung, einhergehend mit einer Reduktion intraepithelialer T-Zellen, einer Subpopulation von T-Lymphozyten, welche für ihre regenerativen Kapazitäten bei der Heilung verletzter Gewebe bekannt ist. Um auszuschließen, dass ein genereller Entwicklungsdefekt des lymphatischen Gewebes ursächlich für diese Beobachtungen war, wurde in einem Modell knochenmarkschimärer Mäuse das Migrationsverhalten von Wildtyp (Wt) und CXCR5 KO Zellen in einem Wt Organismus untersucht. In Kenntnis der proinflammatorischen Wirkungsweisen des Chemokinrezeptors CXCR3 beim Ablaufen intestinaler Immunantworten, wurde dieser in die Betrachtungen mit einbezogen. Unter homöostatischen wie inflammatorischen Konditionen zeigte sich eine verminderte intraepitheliale Anreicherung von CXCR5 KO sowie CXCR5 CXCR3 DKO (*double knock-out*) T-Zellen. Dies konnte tendenziell auch bezüglich der intraperitonealen Anreicherung von CXCR5 KO sowie CXCR5 CXCR3 DKO T-Zellen unter inflammatorischen wie homöostatischen Bedingungen gezeigt werden. Zur Überprüfung der funktionellen Kapazität von CXCR5 KO T-Zellen im Vergleich zum Wt während einer akuten Kolitis, wurden Wt sowie CXCR5 KO T-Zellen in KO-Mäuse transferiert. Mäuse, welche KO T-Zellen erhalten hatten, zeigten eine leicht verzögerte Regeneration im Vergleich zum Wt. In allen untersuchten Kompartimenten (Milz, Peritoneum, Kolon) ließen sich zudem weniger CXCR5 KO als Wt T-Zellen nachweisen. In Kenntnis der Bedeutung von CXCR5 für den Eintritt in das Peritoneum und das Stattfinden einer intraperitonealen phänotypischen Prägung von Lymphozyten, wurden die Expressionslevel intestinaler *Homing*moleküle auf T-Zellen der Milz und des Peritoneums untersucht. Es zeigten sich hohe peritoneale Expressionslevel von CD44, LFA-1 sowie CD29. Das $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin war peritoneal runterreguliert. Intraperitonealer Transfer von Wt Splenozyten zeigte eine Prägung des Adhäsionsmolekülbesatzes hin zu dem primär peritonealer T-Zellen.

Diese Arbeit zeigt, dass CXCR5 an der Rekrutierung von T-Zellen in das entzündete Kolon beteiligt ist. Eine transperitoneale Passage der T-Zellen, mit Prägung hin zu einem zur Migration in das Kolon prädisponierenden Phänotyps, kann hierbei vermutet werden.

SUMMARY

Coordinated recirculation of immune cells through secondary lymphoid organs (SLOs) and peripheral tissues is essential for the maintenance of immunological homeostasis as well as rapid induction of immune responses towards acute inflammatory patterns. Chemokine receptors as well as adhesion molecules play a pivotal role for the recruitment of immune cells towards target tissues. The chemokine receptor CXCR5 is considered a main component in the development of SLOs. CXCR5 KO (knock-out) leads to alterations in SLOs architecture, which also involves the mucosa-associated lymphatic tissues. The recruitment of lymphocytes to the peritoneum is CXCR5-dependent as well. Induction of an acute DSS-colitis in CXCR5 KO mice leads to an aggravated intestinal inflammation, accompanied by a reduction of intraepithelial T cells, a cell population known for their capacities in tissue healing. To exclude that a general developmental defect of lymphoid organs is fundamental for these observations a model of mixed bone marrow chimeric mice was generated to investigate the migratory behavior of wildtype (wt) versus CXCR5 KO cells in a wt background. The chemokine receptor CXCR3 was included in further studies due to its proinflammatory functions in intestinal inflammations. An impaired intraepithelial recruitment of CXCR5 KO and CXCR5 CXCR3 KO T cells was seen under homeostatic and inflammatory conditions. The same tendency was observed concerning the intraperitoneal enrichment of CXCR5 KO and CXCR5 CXCR3 DKO (double knock-out) T cells compared to wt cells under inflammatory and homeostatic conditions. To determine the functional capacities of CXCR5 KO and wt T cells during an acute colitis, CXCR5 KO as well as wt T cells were transferred into CXCR5 KO mice. Animals, receiving CXCR5 KO T cells, displayed a slightly delayed recovery compared to wt cells. All investigated compartments (spleen, peritoneum, colon) showed less CXCR5 KO than wt T cells. Given the role of CXCR5 in regulating peripheral lymphocyte homing and tissue-priming, expression levels of intestinal homing molecules were examined on splenic as well as on peritoneal T cells. High levels were obtained for CD44, LFA-1 and CD29. 4 7-Integrin showed a peritoneal downregulation. Intraperitoneal transfer of splenocytes into wt mice converted the adhesion molecule expression towards T cells originated from the peritoneum.

Taken together these data display an impact of CXCR5 in recruiting T cells to the inflamed colon. Transperitoneal passage of T cells, leading to a gut-entering predisposing phenotype, might be of importance.

1. EINLEITUNG

1.1 Das lymphatische System

Das lymphatische System ist ein Netzwerk bestehend aus den lymphatischen Organen und Geweben, den Immunzellen sowie den Lymphgefäßen [1]. Es ist die strukturelle Grundlage des Immunsystems und seine Aufgabe besteht in der Abwehr exogener Pathogene, Elimination körpereigener krankhaft-veränderter Bestandteile sowie der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Eine Funktionsstörung dieses feinabgestimmten Systems führt zu einer mangelhaften Beseitigung von Krankheitserregern, Tumorentstehung oder Autoimmunität. Es kann eine Einteilung in die angeborene und erworbene Immunität vorgenommen werden. Während erstere entwicklungsgeschichtlich älter und auch bei einfachen Lebewesen vorzufinden ist, findet sich das erworbene, adaptive Immunsystem nur bei höheren Lebewesen und ermöglicht eine spezifische Abwehr gegen jede Art von Krankheitserreger [2]. Im Folgenden wird auf die feingeweblichen sowie zellulären Bestandteile näher eingegangen.

1.1.1 Sekundäre lymphatische Gewebe

Die lymphatischen Gewebe lassen sich in primäre und sekundäre lymphatische Organe einteilen. Zu den primären (zentralen) lymphatischen Organen zählen das Knochenmark sowie der Thymus. Hier findet die Entstehung und Differenzierung von Vorläuferzellen zu immunkompetenten B-Lymphozyten ($B=bone$, Knochenmark) oder T-Lymphozyten ($T=Thymus$) statt. In den sekundären lymphatischen Organen (SLOs) treffen diese Zellen auf Antigene, die zu einer Spezialisierung und Proliferation führen. Zu ihnen zählen die Milz, Lymphknoten, Lymphfollikel, Tonsillen, Aggregate lymphatischen Gewebes im Magen-Darm-Trakt (darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT)) sowie die Peritonealhöhle [2].

1.1.1.1 Milz

Die Milz hat, neben ihrer Rolle als Speicherort für die Makrophagen des Blutes und Aussonderungsstätte überalterter Blutzellen, vor allem wichtige Aufgaben in Bezug auf die antigeninduzierte Differenzierung und Vermehrung von T- und B-Lymphozyten. Feingeweblich wie funktionell sind zwischen den verschiedenen Spezies große Unterschiede festzustellen, weswegen im Weiteren auf die murine Milz eingegangen werden soll. Ihr Parenchym gliedert sich in die rote und weiße Pulpa, wobei hier nur die zum lymphatischen Gewebe zählende, weiße Pulpa betrachtet wird. Die im Inneren gelegenen Zentralarterien werden von einer Scheide aus Lymphozyten umgeben, welche insbesondere T-Lymphozyten und dendritische Zellen (*dendritic*

cells, DCs) enthält und als periarterioläre Lymphe (PALS) bezeichnet wird. Sie entspricht der T-Zell-Zone. Hier treten T-Lymphozyten und DCs in Kontakt mit den passierenden B-Lymphozyten. Um diese Zone befindet sich die B-Zell-Zone, bestehend aus den B-Zell-Follikeln und der Marginalzone, welche PALS und Follikel umhüllt. In den B-Zell-Follikeln findet die klonale Expansion von aktivierten B-Zellen statt, was zum Isotypenwechsel und somatischer Hypermutation führt [3]. Die Architektur wird durch das Zusammenspiel verschiedener homöostatischer Chemokine und Chemokinrezeptoren aufrechterhalten. CCR7 ist der wesentliche Chemokinrezeptor, welcher T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und DCs in die T-Zell-Zone der Milz leitet. Auf Stromazellen und Venolen mit hohem Endothel (*high-endothelial venule*, HEV) werden dessen Liganden CCL19 und CCL21 exprimiert. Eine Defizienz für CCR7 führt zu einer Akkumulation von T-Zellen im peripheren Blut sowie in Körperhöhlen [4, 5]. Die B-Zellen verlassen die T-Zell-Zone über Bindung des Chemokinrezeptors CXCR5 an den Liganden CXCL13, welcher von follikulären dendritischen Zellen (*follicular dendritic cell*, FDC) und benachbarten Stromazellen in B-Zell-Follikeln exprimiert wird [6-8]. Der stetige Blutfluss entlang der weißen Pulpa ermöglicht eine permanente Kontrolle des Blutes auf Pathogene durch das residente Immunsystem. Während die T-Zell-Zone vor allem adaptive Immunreaktionen in Gang setzt, können in der Marginalzone aufgrund zweier spezifischer Makrophagenpopulationen adaptive wie auch angeborene Immunantworten generiert werden. Dies macht die Milz zu einer der wichtigsten Organe in der Abwehr gegen Bakterien oder Pilze [9].

1.1.1.2 Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT)

Dem Immunsystem des Darmes wird eine besondere Bedeutung zuteil, da aufgrund der großen Oberfläche zum einen eine permanente Exposition gegenüber körperfremden, potentiell krankheitserregenden Stoffen und Bakterien besteht, zum anderen aber auch eine Toleranz gegenüber nicht-schädlichen Antigenen (z. B. Nahrungsmittelbestandteile, kommensale Bakterien) gewährleistet sein muss. Die Schleimhaut ist daher von einem komplexen Netzwerk aus einzelnen sowie organisierten Immunzellen durchsetzt, welches in seiner Gesamtheit als GALT bezeichnet wird. Es ist eine Untereinheit des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (*mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT). Je nach betrachtetem Darmabschnitt unterscheiden sich die Bestandteile des GALT bezüglich Nomenklatur und auch hinsichtlich ihrer Struktur und Funktionalität. Zum GALT des Kolons zählen die mesenterialen Lymphknoten (*mesenterial lymphnodes*, mLN), SILTs (*solitary lymphoid intestinal tissues*), lose im Epithel und der Lamina propria (LP) lokalisierte Leukozyten sowie die kolonischen Plaques (*colonic patches*, CPs), welche den Peyerschen Plaques (PPs) des Dünndarmes entsprechen [10-12]. Bei den PPs handelt

es sich um Aggregate von Zellen, welche in der Submukosa sowie LP des Dünndarmes zu finden sind. Sie gliedern sich, wie Lymphknoten, in eine B- und T-Zell-Zone. Ihre Lymphfollikel ragen in die Mukosa, weshalb das übliche Epithel fehlt und stattdessen mit dem sog. Follikel-assoziierten Epithel (FAE) überzogen ist. Hier sind die M-Zellen (*microfold cells*) zu finden. Ihre Aufgabe besteht in der Aufnahme von Antigenen an der apikalen Seite und Abgabe dieser an Antigen-präsentierende Zellen (*antigen-presenting cell*, APC; v.a. DCs und Makrophagen), welche das Antigen T- und B-Lymphozyten darbieten. Die Antigenaufnahme in den PPs erfolgt somit nicht, wie bei gewöhnlichen Lymphknoten, über den Blutstrom. Nach Aktivierung der T-Zellen und B-Zellen wird eine spezifische Immunantwort mit Produktion von Immunglobulin A (IgA) generiert. 70-80% des im menschlichen Körper gebildeten IgA entstammen dem GALT. Die B-Zellen verlassen nach Aktivierung über die mLN den Darm, zirkulieren durch das Blut und gelangen über die mLN wieder zurück ins enterische Gewebe [10]. Das kolonische Äquivalent der PPs stellen die CPs dar. Sie befinden sich in der Submukosa und bestehen aus wenigen B-Zell-Follikeln (meist zwei), welche von einer T-Zell-Zone umgeben sind. Apikal der CPs ist die Muscularis mucosae unterbrochen, wodurch ein unmittelbarer Kontakt der CPs zum intestinalen Epithel besteht.

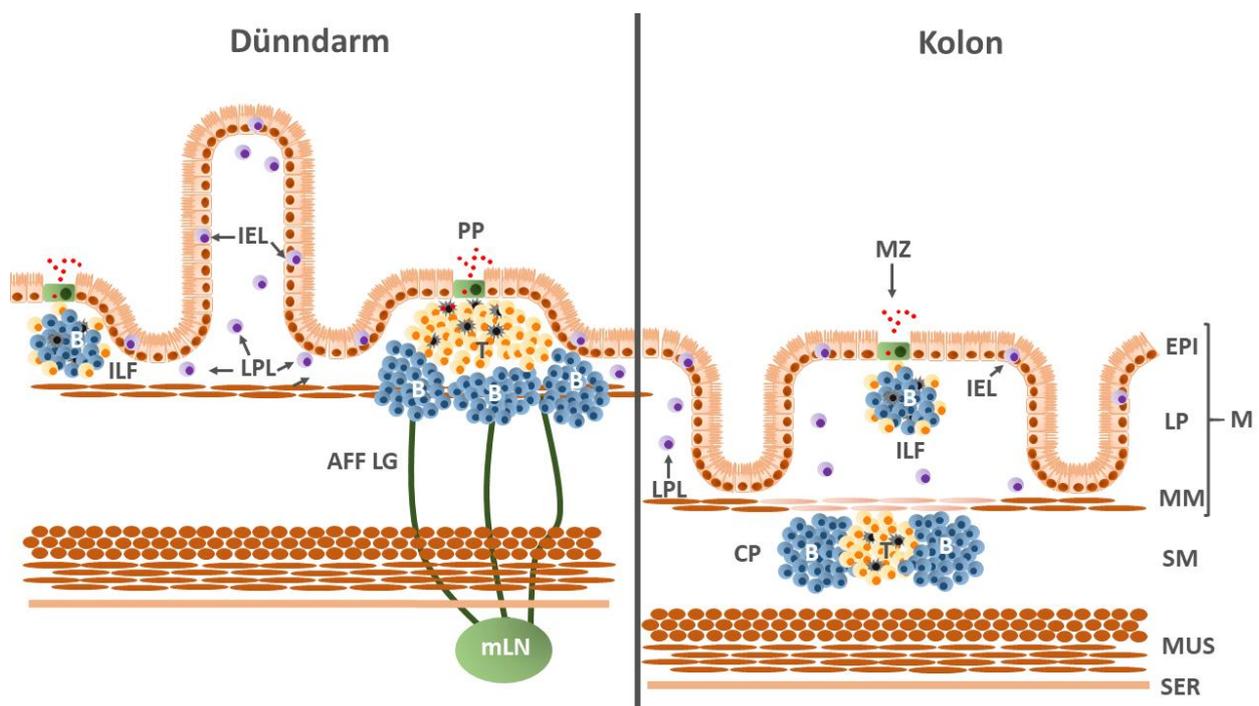


Abb. 1: Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe des Dünndarms und Kolons

Vereinfachte schematische Darstellung der lymphatischen Organe von Dünndarm und Kolon. AFF LG = afferente Lymphgefäße, B = B-Zell-Zone, CP = *colonic patch*, EPI = Epithel, IEL = intraepitheliale Lymphozyten, ILF = isolierter lymphoider Follikel, LP = Lamina propria, LPL = Lamina propria Lymphozyten, M = Mukosa, mLN = mesenteriale Lymphknoten, MM = Muscularis mucosae, MUS = Muscularis, MZ = M-Zellen, PP = Peyersche Plaques, SER = Serosa, SM = Submukosa, T = T-Zell-Zone.

Auf diese Weise können Antigene, wie in den PPs, unmittelbar durch intraepithelial lokalisierte APCs prozessiert und gegenüber anderen Immunzellen dargeboten werden. Neben den CPs finden sich im Kolon sogenannte SILTs, zu denen die *cryptopatches* sowie die größeren, aus ersteren entstehenden isolierten lymphoiden Follikeln (ILFs) zählen. Sie unterscheiden sich zu den CPs nicht nur hinsichtlich ihrer Größe, sondern auch bezüglich ihrer anatomischen Lokalisation, dem Entwicklungszeitpunkt sowie der für ihre Entwicklung benötigten Botenstoffe. [11]. Ein weiterer Bestandteil des GALT stellen die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) dar, welche im Dünndarm in einem Verhältnis von 1:10 und im Dickdarm mit 1:50 zu den Epithelzellen auftreten [13]. Sie erreichen den Darm mittels diverser Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle (Vgl. Kapitel 1.2.1.1 und 1.2.2), rezirkulieren im Vergleich zu anderen Lymphozyten jedoch nicht. Sie bestehen zu einem großen Anteil aus T-Lymphozyten, mit einem im Verhältnis zu anderen Geweben überproportional großem Prozentsatz an T-Lymphozyten, welche einen T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR) tragen (Vgl. Kapitel 1.1.2.1) [14]. Die Zellzusammensetzung variiert je nach betrachtetem Darmabschnitt. Während im Kolon vorzugsweise TCR⁻ CD4⁺ T-Lymphozyten nachzuweisen sind, lassen sich im Dünndarm im Wesentlichen CD8⁺ T-Lymphozyten finden, welche entweder einen α-TCR (70-80%) oder einen β-TCR (< 10%, entweder CD8⁺ oder CD4⁻ CD8⁻) tragen. Unter physiologischen Konditionen zeichnen sich o.g. Zellpopulationen durch anti-inflammatorische Zytokinprofile aus (u.a. TGF-β (*transforming growth factor* β), IL-10 (Interleukin 10)), wobei unter Einfluss eines inflammatorischen Reizes auch pro-inflammatorische Zytokine (TNF-α (Tumornekrosefaktor α), INF-γ (Interferon γ)) sezerniert werden können. Weiterhin werden unter Ausschüttung direkt-lytischer Substanzen wie Perforine und Granzym B infizierte Epithelzellen eliminiert. Durch Expression des Keratinozyten Wachstumsfaktors (*keratinocyte growth factor*, KGF) unterstützen sie zudem die epitheliale Wundheilung [15].

Ergänzend zu den immunologischen Bestandteilen des GALT existieren Mechanismen, welche zur mukosalen Immunität beitragen. Hierzu zählen neben Zellen, welche keinen hämatopoetischen Hintergrund haben (Epithelzellen, Becherzellen, Paneth-Zellen), das residente Mikrobiom sowie mechanische und chemische Barrieren. Durch das Vorhandensein von geschlossenen Zell-Zell-Kontakten (*tight junctions*), Mikrovillibusatz der Epithelien sowie einer von den Becherzellen produzierten, dichten Schleimschicht bestehend aus Muzinen, wird eine interzelluläre Passage von Pathogenen verhindert. Die Dichtigkeit erhöht sich zugunsten von Stofftransporten stetig vom Duodenum Richtung Kolon. In den Krypten des Dünndarmepithels und Magens finden sich weiterhin die Paneth-Zellen. Sie produzieren Lysozyme, Peptidasen und Defensine und erweitern die mechanische Barriere um eine chemische Abwehrfunktion [16]. Kommensale der Bacteroides-

, Enterokokken- oder Lactobazilluspezies sind weiterhin an physiologischerweise ablaufenden Prozessen beteiligt, welche zur Induktion intestinaler Immunantworten und Entwicklung diverser Lymphozytensubpopulationen (z.B. regulatorische T-Zellen und B-Zellen) beitragen [17].

1.1.1.3 Das Peritoneum als immunologisches Organ

Das Peritoneum ist eine seröse Haut, welche den Bauchraum auskleidet und die sich darin befindlichen inneren Organe, ausgenommen der pelvinen, überspannt. Es besteht aus zwei Blättern. Dem der inneren Bauchwand anliegenden Peritoneum parietale und dem die Organe überziehenden Peritoneum viscerale. Das Peritoneum beinhaltet Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven der es überziehenden Organe [18]. Histologisch betrachtet besteht es aus einer doppelten Schicht von Mesothelzellen, welche bedeutsam für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion des Peritoneums sind. Wachstumsfaktoren, Proteasen, Proteoglykane und extrazelluläre Matrixproteine dienen der peritonealen Flüssigkeitssekretion und Absorption sowie Reparaturmechanismen des Gewebes. Mittels Produktion von Zytokinen und Chemokinen spielen sie eine wichtige Rolle bei peritonealen Inflammationen [19]. Inzwischen ist bekannt, dass das Peritoneum immunoregulatorische Funktionen übernimmt, ohne ein klassisches lymphatisches Organ zu sein. Die Eintrittsstelle von B- und T-Lymphozyten in die Peritonealhöhle ist das große Netz, Omentum majus. Es ist eine fett- und bindegewebsreiche Struktur, welche sich von der großen Krümmung des Magens, über das Kolon transversum und den Dünndarm erstreckt und vom Peritoneum viscerale überzogen wird. Es beinhaltet eine große Anzahl von Immunzellen. Bei fokalen Entzündungen legt sich das Omentum über die betroffene Stelle und sorgt für eine räumliche Begrenzung der Inflammation. Immunzellen erreichen das Omentum über die HEV, welche in lymphozytenreichen Regionen, den sog. Milchflecken (*milky spots*), lokalisiert sind. Die *milky spots* bestehen vor allem aus Makrophagen, B1-Zellen und wenigen T-Zellen [20]. Dies entspricht im Wesentlichen der Zellzusammensetzung der Peritonealhöhle selbst. Die B1-Zellen sind eine besondere Subpopulation von B-Zellen, welche vor allem in der Pleura- und Peritonealhöhle zu finden sind. Sie unterscheiden sich von den konventionellen B2-Zellen durch einen spezifischen Besatz mit verschiedenen Oberflächenmolekülen und Antigenrezeptoren, welche Epitope bakterieller Antigene binden und sich durch eine rasche Produktion natürlicher Antikörper, v.a. IgM als erste Abwehrreaktion, auszeichnen [21]. Der Eintritt von Lymphozyten in die *milky spots* erfolgt via Expression von CXCR5, CD34 (*peripheral lymphnode addressin*, PNA_d) und MAdCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*) auf dem Endothel der HEV. Unter CXCR5-Defizienz zeigt sich eine Anreicherung von B1-Zellen im peripheren Blut sowie eine Reduktion natürlicher IgM-Antikörper [7]. Der Austritt erfolgt über die Toll-like-

Rezeptor (TLR)-induzierte Herabregulation von Integrinen sowie mittels CD9 und dem Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1P-R), welcher ebenfalls für das Verlassen von Lymphozyten aus den Lymphknoten verantwortlich ist [20, 22]. Interessanterweise sind in den B-Zell-reichen Regionen der *milky spots*, im Gegensatz zu den SLOs, keine FDCs und DCs zu finden. Normalerweise finden sich FDCs vor allem in den B-Zell-Follikeln und exprimieren CD35, CD21, FDCM1, FDCM2 und CXCL13. CXCL13 ist im Peritoneum vor allem außerhalb der B-Zell-reichen Regionen, CD35 insgesamt nur spärlich nachzuweisen [23]. Die Organisation der *milky spots* wird daher von CXCL13 exprimierenden Stromazellen und Makrophagen aufrechterhalten, welche sichelförmig um das B-Zell-Zentrum lokalisiert sind. Es wird angenommen, dass bakterielle Antigene, welche über den Blutstrom in die *milky spots* gelangen, zu einer vermehrten Expression von CXCL13 führen und somit zur Rekrutierung von CXCR5⁺ T- und B-Lymphozyten beitragen [21, 23]. Keimfrei aufgezogene Mäuse zeigen entsprechend eine reduzierte Anzahl von *milky spots* im Peritoneum [24]. Weiterhin ist für die Entwicklung von Lymphknoten und PPs das Vorhandensein von LTi-Zellen (*lymphoid tissue inducer cell*) essenziell. Für die Entstehung der *milky spots* scheinen diese keine Bedeutung zu haben [23].

1.1.2 Die zelluläre Immunabwehr

Die Grundlage der zellulären Immunabwehr sind die Leukozyten, welche neben den Erythrozyten und Thrombozyten zu den drei im Blut präsenten Zelltypen zählen. Anhand der entstammenden hämatopoetischen Linie, histologischen Differenzierungsmerkmalen sowie distinkten Expressionsmustern von Oberflächenantigenen, ist eine Einteilung in Lymphozyten; neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten; Natürliche Killerzellen (NK-Zellen); Natürliche Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen); Monozyten; Dendritische Zellen sowie Mastzellen möglich. Die Lymphozyten lassen sich in B- (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) unterteilen und sind die Grundlage des adaptiven Immunsystems. T-Lymphozyten binden Antigenfragmente an ihren TCR, welche von APCs prozessiert und dargeboten werden, und zählen durch direkte Lyse pathologischer Zellen oder Freisetzung von Zytokinen zur zellvermittelten Immunabwehr. B-Lymphozyten wandeln sich nach Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor und Kontakt zu den T-Zellen zu Plasmazellen um und werden damit zur Bildung von Antikörpern befähigt, was sie zum wesentlichen Bestandteil der humoralen Immunabwehr macht. Beide Zellarten beinhalten weitere Subpopulationen, welche sich hinsichtlich ihrer Funktionalität stark unterscheiden [25]. Der Fokus soll auf der Betrachtung der T-Lymphozyten liegen. Ihr Ursprung liegt in den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes, die eigentlich Entwicklung der T-Lymphozyten beginnt allerdings erst im Thymus. Hier treffen die Vorläuferzellen auf thymische epitheliale Zellen

(*thymic epithelial cells*, TEC) und mesenchymale Fibroblasten, von denen sie wichtige Differenzierungssignale erhalten [26]. Die Differenzierung erfordert das Durchlaufen verschiedener Entwicklungsstadien mit entsprechender Hoch- oder Runterregulation der Oberflächenmarker CD4, CD8, CD44 und CD25. Nach Eintritt der Vorläuferzellen in die kortikomedulläre Junktionszone sind sie zunächst doppelt negativ (DN) für CD4 und CD8. Als DN1 ($CD44^+/CD25^-$) und DN2 ($CD44^+/CD25^+$) erreichen sie den thymischen Cortex und gelangen von dort über das DN3-Stadium ($CD44^-/CD25^+$) in die subkapsuläre Zone [27, 28]. An dieser Stelle erfolgt die Differenzierung zu oder T-Zellen [29]. Nach Komplexierung der TCR -Kette mit CD3 und der invarianten pre-TCR -Kette (pT) wird CD25 runterreguliert (DN4). Die Zellen wandern erneut Richtung Kortex, exprimieren große Mengen von CD4 und CD8 und gehen damit in das DP (doppelt positiv) Stadium über. Nach Umlagerung der TCR -Kette entstehen erstmals DP T-Zellen. Hier bilden die noch naiven Zellen MHC-Rezeptoren (*major histocompatibility complex*) aus, wobei durch negative Selektion all diejenigen Zellen in Apoptose gehen, welche körpereigene Peptide erkennen. Am Ende der Selektion verbleiben weniger als 5 % der ursprünglichen Population. Sie erkennen ausschließlich körperfremde Moleküle, was zur Verhinderung von Autoreaktivität zwingend notwendig ist.

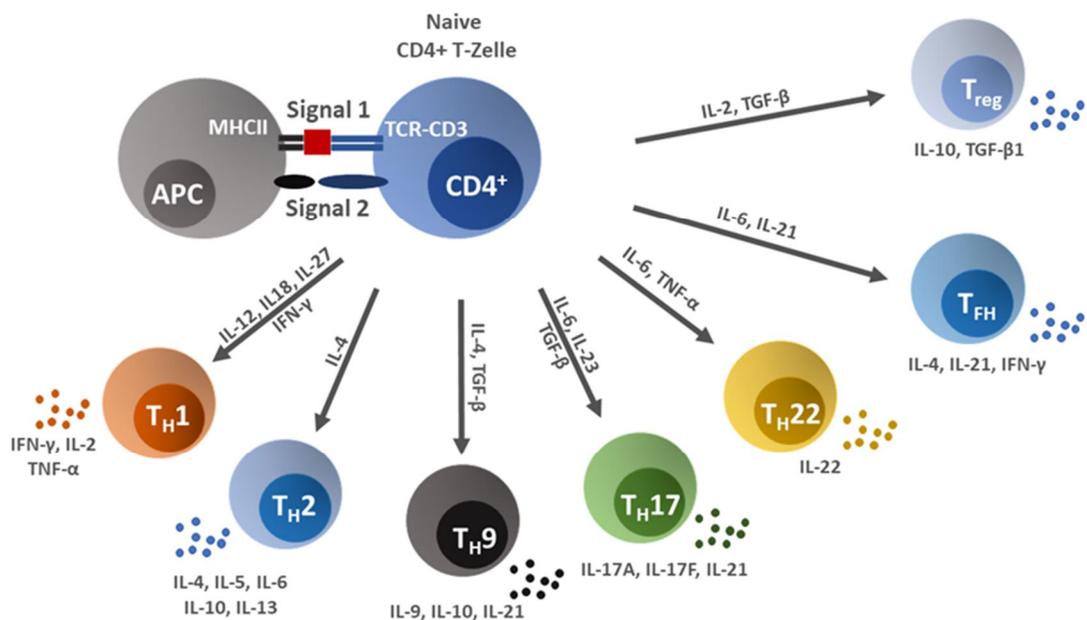


Abb. 2: Überblick der Subgruppen von CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten erfolgt mittels Antigen darbietung von APCs und Bindung des Antigens an MHCII sowie den TCR (Signal 1). Als zweites Signal dienen antigen-unabhängige, costimulatorische Bindungen. Je nach Antigen und vorherrschendem Zytokinmilieu, erfolgt die Differenzierung zu T_{H1}, T_{H2}, T_{H9}, T_{H17}, T_{H22} sowie T_{reg} oder T_{FH}. Die jeweiligen Subgruppen unterscheiden sich u.a. durch die sezernierten Zytokine. Adaptiert nach [30, 31].

Abschließend erfolgt entweder die Hochregulation von CD4 oder CD8 und die T-Zellen verlassen als SP (*single positive*, einfach positiv) CD4- oder CD8-positive Zellen wenige Tage später den Thymus über die Medulla ins Blut [28]. CD8 ist ein Co-Rezeptor, welcher gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor, den auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimierten MHC-I-Komplex bindet. Er wird primär von zytotoxischen T-Zellen exprimiert, welche veränderte körpereigene Zellen erkennen und eine unmittelbare Lyse einleiten können. Dies erfolgt mittels Produktion von Perforinen, Lysozymen oder INF- [22, 32]. CD4-positive Zellen binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor den MHC-II-Komplex, welcher von APCs exprimiert wird. Sie werden als T-Helfer-Zellen (T_H) bezeichnet und lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen. Hierzu zählen die T_{H1} , T_{H2} , T_{H9} , T_{H17} und T_{H22} sowie die folliculären (T_{FH}) und regulatorischen (T_{reg}) T-Zellen [31, 33]. Die Einteilung erfolgt anhand der produzierten Zytokine, exprimierter Oberflächenmoleküle sowie spezifischer Funktionen.

1.1.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten lassen sich anhand ihres TCR in $\alpha\beta$ sowie $\gamma\delta$ T-Lymphozyten unterteilen. Die T-Zellen repräsentieren eine kleine Population, welche bei der Maus nur etwa 1-4% aller Lymphozyten in den SLO und im Thymus ausmachen, in den mukosalen Geweben des Gastrointestinaltraktes, der Epidermis oder der Reproduktionsorgane jedoch stark angereichert sind. Bei 20-40% der IEL im Gastrointestinaltrakt handelt es sich beispielsweise um $\gamma\delta$ T-Zellen [34]. Im Gegensatz zu den B-Zellen und $\alpha\beta$ T-Zellen wurden die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten nicht anhand ihrer Funktion, sondern aufgrund der strukturellen Merkmale entdeckt. Ihr TCR besteht aus einer γ - und einer δ -Kette und ihnen fehlt die T-Zell-typische Expression von CD4 und zumeist auch von CD8 [15, 35, 36]. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren je nach Gewebe spezifische TCR, welche für die jeweilige Subpopulation festgelegt sind [37]. Dies wird durch die sogenannte V(D)J-Rekombination ermöglicht. Auf DNA-Ebene finden sich für die Immunglobuline und TCR kodierende V- (*variable*), D- (*diversity*) und J-Gene (*joining*). Am Ende dieser Sequenz sind die Rekombination-aktivierenden Gene 1 und 2 (*recombination-activating gene*, RAG-1/2) lokalisiert, welche für die Separierung, Kombination und Wiedervereinigung der einzelnen Gensegmente verantwortlich sind und die Entstehung einzigartiger TCR ermöglichen [38]. RAG-1/2-defizienten Mäusen mangelt es daher an reifen T- und B-Lymphozyten [39].

Mausmodelle konnten zeigen, dass die Entwicklung der $\alpha\beta$ T-Zellen im Thymus beginnt und sich unter dem Einfluss modulierender Umwelteinflüsse in der Peripherie fortsetzt. Es wird angenommen, dass dies in drei Stadien abläuft und sich der Weg der $\alpha\beta$ Thymozyten am Übergang vom DN3 zum DN4 Stadium von den $\gamma\delta$ Thymozyten trennt [37]. In der ersten Phase erfolgt eine

intrathymische Differenzierung, welche zur Entwicklung bereits funktionell-kompetenter Zellen sowie solcher mit einem festgelegten TCR-Repertoire führt. Diese Zellen sind in der Lage auf direktem Weg ihr Zielorgan zu erreichen. In einer zweiten Phase erfolgt die weitere Differenzierung in den SLOs unter dem Einfluss anderer Zellpopulationen, wodurch die einzelnen Subklassen von T-Zellen zur Induktion von polyklonalen, Subklassen-spezifischen Immunantworten befähigt werden. In einer dritten Stufe findet die TCR-abhängige Selektion spezifischer Klone statt, welche die T-Zellen mit Memory-T-Zell-Charakteristika ausstattet [35]. Die relevanten Entwicklungsstadien finden also in der Peripherie und nicht im Thymus statt. Anhand von athymischen Mäusen ließ sich zeigen, dass der Thymus für die Differenzierung der T-Zellen entbehrlich ist [40].

Interessanterweise zeigen T-Zellen funktionell wie strukturell Merkmale, welche dem angeborenen wie auch dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden können. Das Fehlen von CD4/CD8 sowie die Möglichkeit, Antigene auch ohne die Expression über MHC-Klasse-I/II zu erkennen, ist dem angeborenen Immunsystem ähnlich. Auch die Entwicklung der T-Zellen ist unabhängig von MHC-Molekülen möglich [41, 42]. Die Abhängigkeit der TCR-Rekombination mittels RAG-1/2 ist hingegen Merkmal des adaptiven Immunsystems und gemeinsam mit den B-Lymphozyten und T-Zellen [38]. Sie werden daher als *innate-like* oder Transitional-Zellen bezeichnet [43]. Sie besitzen die Fähigkeit, Antigene auch ohne vorherige Prozessierung zu erkennen, und gelten als essenzielle Zellen in der primären Abwehr gegen invasive Pathogene, vor allem in den frühen Lebensphasen. Sie binden zelluläre MHC und nicht-MHC Oberflächenmoleküle, lösliche Proteine und Peptide, Phospholipide, Prenylpyrophosphate und Sulfatide [44]. Diese Antigene werden im Wesentlichen über fünf Rezeptorklassen erkannt. Dazu zählen der TCR, costimulatorische Rezeptoren (CD27, CD28), Zytokinrezeptoren (u.a. IL2R, IL7R, IL15R), NK-Rezeptoren wie NKG2D (*natural-killer group 2, member D*) und inhibitorische Rezeptoren (PD-1 (*programmed cell death protein 1*), BTLA (*B- and T-lymphocyte attenuator*)) [36, 43]. Bislang konnte den T-Zellen Bedeutung in der raschen Elimination von Bakterien, Erkennung und Lyse infizierter oder entarteter Zellen, Entwicklung von Autoimmunität sowie die Modulation angeborener und adaptiver Immunantworten nachgewiesen werden. Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie KGF1 und KGF2 sind sie an der Regeneration verletzten Epithels beteiligt [45-47]. Im Darm ist hierbei zusätzlich die Interaktion mit Kommensalen des Gastrointestinaltraktes notwendig, welche die Freisetzung protektiver Faktoren nach mukosaler Schädigung durch die T-Zellen ermöglicht. Andererseits werden einer IL-17 produzierenden

Subpopulation, den T17-Zellen, prokarzinogene Einflüsse zugesprochen, welche u.a. auf der Stimulation von Angiogenese in bereits tumorös verändertem Gewebe beruhen [48].

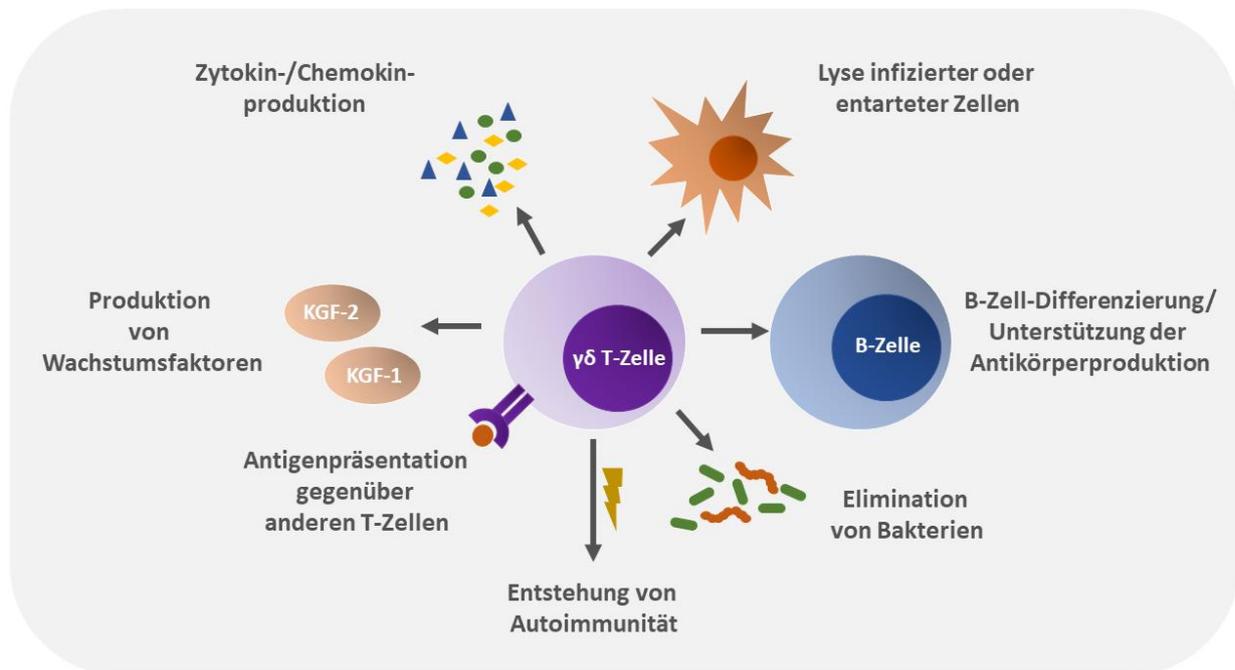


Abb. 3: Funktionen von T-Zellen

Übersicht der Funktionen von T-Zellen. Adaptiert nach [43, 49].

1.2 Mechanismen der Lymphozytenmigration und Rezirkulation

Die Migration und Rezirkulation von T- und B-Lymphozyten durch den Blutstrom, SLO sowie extralymphatische Gewebe, ist essenziell für die Aufrechterhaltung der immunologischen Barriere unter homöostatischen wie inflammatorischen Bedingungen. Hierbei nutzen Immunzellen unterschiedliche Mechanismen.

1.2.1 Vier-Stufen-Modell der transendothelialen Migration von Leukozyten

Der Austritt von Leukozyten aus dem Blutstrom und die Invasion der Zielgewebe erfordern ein feinabgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle und Chemokine sowie deren Rezeptoren (Vgl. Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). Der Prozess erfolgt anhand von vier Schritten: der rollenden Adhäsion, Aktivierung, festen Adhäsion und der Passage durch die intakte Gefäßwand (Diapedese). Mithilfe von Selektinliganden werden die passierenden Leukozyten reversibel an Selektine (z.B. P- und L-Selektin) gebunden, welche auf den Endothelien der Blutgefäße exprimiert werden. Durch die Scherkräfte des Blutstromes löst sich diese Verbindung jedoch immer wieder, so dass ein Rollen der Zellen entlang des Endothels erfolgt. Die Fließgeschwindigkeit der Leukozyten wird durch die intermittierende Selektinbindung allmählich

reduziert. Dieser Primärkontakt führt zu einer Aktivierung der Leukozyten und zur Expression von Integrinen (z.B. LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*)) unter zusätzlichem Chemokineinfluss. Die Bindung der Integrine an Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) führt letztlich zur irreversiblen Anheftung der Leukozyten an das Endothel. Abschließend erfolgt der zumeist parazelluläre Durchtritt der Leukozyten ins umliegende Gewebe (u.a. mittels JAMs (*junctional adhesion molecules*), ICAM-1 und ICAM-2) [50].

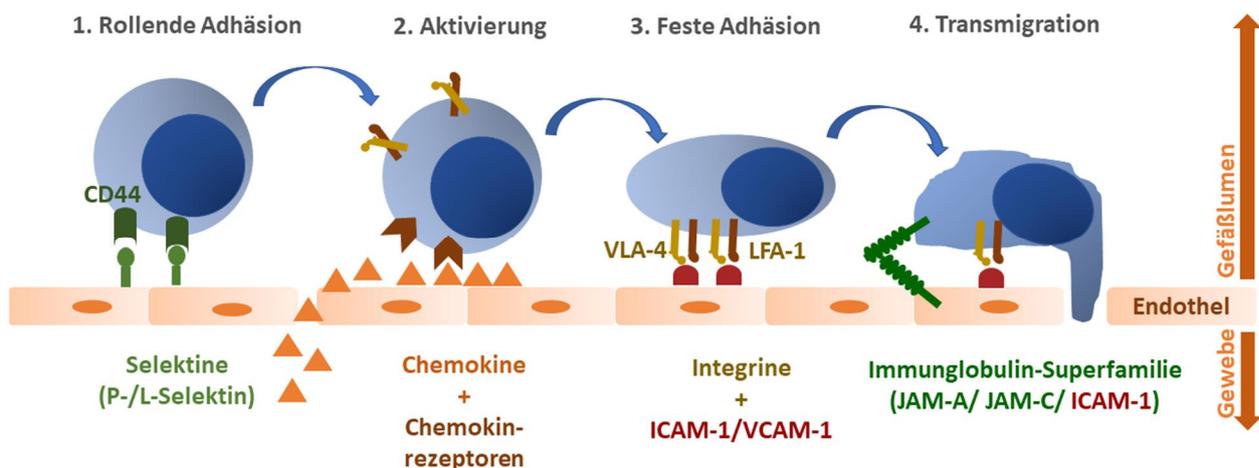


Abb. 4: Vier-Stufen-Modell der Leukozytenmigration

Darstellung der schrittweisen Extravasation von Leukozyten aus dem Blutstrom in umliegende Gewebe. Modifiziert nach [50, 51].

1.2.2 Das Chemokin/ Chemokinrezeptorsystem

Chemokine sind eine Gruppe chemotaktischer Zytokine geringer molekularer Größe (Molmasse 8-14 kDa), welche unter anderem bei der Aktivierung und Rekrutierung von Lymphozyten in ihre Zielgewebe eine essentielle Rolle spielen. Sie lösen eine Wanderungsbewegung (Chemotaxis) von Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten aus, wobei die mit dem korrespondierenden Chemokinrezeptor versehenen Zellen vom Ort niedriger zum Ort hoher Chemokinkonzentration wandern. Auf diese Weise sind sie nicht nur an der Induktion inflammatorischer Prozesse, sondern auch bei der Entwicklung des Immunsystems sowie der Aufrechterhaltung einer immunologischen Homöostase beteiligt [52]. Nahezu jede Zellart ist in der Lage, Chemokine zu sezernieren. Dazu zählen neben den Leukozyten auch Epithel-, Endothel sowie Stromazellen [53]. Die Chemokinrezeptoren werden vorzugsweise von Zellen der hämatopoetischen Linie exprimiert [54].

Die Chemokine lassen sich anhand ihrer biochemischen Struktur in vier Subgruppen einteilen (C, CC, CXC, CX3C), wobei dies auf Grundlage von Anordnung und Anzahl hochkonservierter aminoterminaler Cysteinreste geschieht, welche zur Ausbildung von Disulfidbrücken führen und das Protein somit stabilisieren. Die Nomenklatur beruht auf der Sequenz der ersten zwei von insgesamt vier invarianten Cysteinresten, wobei die C-(XCL1-2) Familie bzw. -Chemokine mit nur zwei Cysteinresten eine Ausnahme darstellen. Chemokine, denen eine Aminosäure (X) zwischen die Cysteinreste eingelagert ist, werden als CXC (CXCL1-17) oder -Chemokine subklassifiziert. Die CC-(CCL1-28) Familie bzw. -Chemokine weisen dementsprechend unmittelbar aufeinanderfolgende, erste zwei Cysteinreste auf. Bei der CX3C-(CX3CL1) Familie bzw. dem -Chemokin ist bislang nur ein Vertreter bekannt, bei welchem drei interponierte Aminosäuren nachzuweisen sind. Das Besondere an diesem Chemokin ist, dass es Bestandteil eines zellulären transmembranären Rezeptors ist, was in der Form sonst nur für CXCL16 bekannt ist [55, 56]. Die humane Variante wird als Fractalkin, die murine als Neurotactin bezeichnet. Beide sind vorzugsweise in neuronalen Geweben vorzufinden [57]. Nach Chemokinfreisetzung wird entweder ein Gradient in löslicher Form, oder immobilisiert durch Bindung an endotheliale

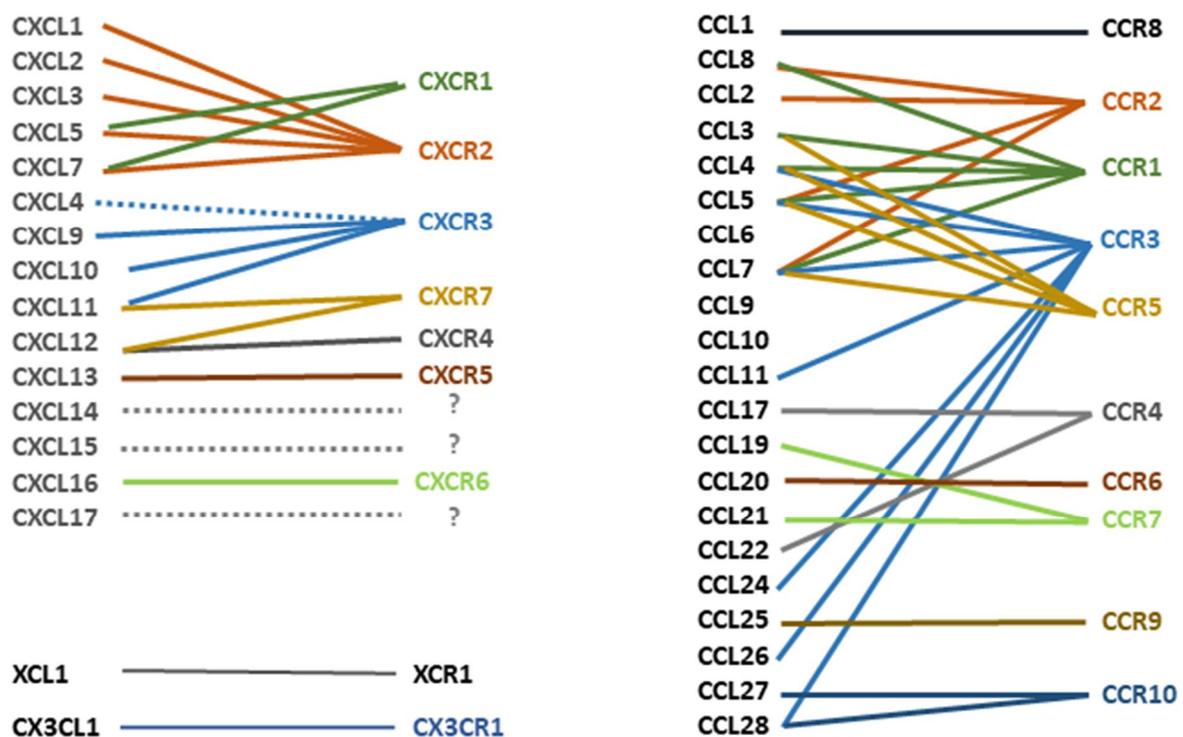


Abb. 5: Chemokine und ihre Chemokinrezeptoren

Vereinfachte Übersicht der Chemokine und Chemokinrezeptoren der Maus. Abbildung adaptiert nach [58, 59].

Glykosaminoglykane (GAGs), oder extrazelluläre Matrix erzeugt. Auf diese Weise können mehrere Chemokine gleichzeitig sezerniert werden und in ihrer lokalen Konzentration gesteigert werden, was die Anreicherung Chemokinrezeptor-tragender Zellen verbessert [53]. Während die Zellen der unspezifischen Immunabwehr lediglich in der Lage sind, den Blutstrom in entzündlich-veränderten Geweben zu verlassen, patrouillieren die Lymphozyten permanent auch durch gesundes Gewebe sowie die SLOs, wobei sie durch das Chemokin-/Chemokinrezeptorsystem zur Extravasation über HEVs befähigt werden. Der Durchtritt der Zellen durch die intakte Blutgefäßwand erfolgt über das zuvor erläuterte Vier-Stufen-Modell der Zellmigration (Vgl. Kapitel 1.2.1.). Die Wirkung der Chemokine wird über ihren spezifischen Chemokinrezeptor vermittelt, wobei es sich zum Großteil um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen handelt. Über die Bindung ihres Liganden wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche zur Zelldifferenzierung, Leukozytendegranulierung, Chemotaxis oder Angiogeneese und Angiostasis führt [54, 55]. Entsprechend der Nomenklatur der Chemokine werden die Chemokinrezeptoren als CXCR1-7, CCR1-10, CX3CR1 bzw. XCR1 bezeichnet. Bis jetzt konnten über 50 Chemokine sowie 18 Chemokinrezeptoren identifiziert werden. CXCR7 wird hierbei nicht mitgezählt, da er nicht zu den klassischen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren zählt. Die im Vergleich zu den Rezeptoren deutlich größere Anzahl von Liganden lässt darauf schließen, dass ein Rezeptor in der Lage ist, mehrere verschiedene Chemokine zu binden, sowie auch einige Liganden mehrere Rezeptoren besetzen können [58]. Während in früheren Arbeiten davon ausgegangen wurde, dass das Bindungsvermögen mehrerer Liganden für den selben Rezeptor mit einer funktionellen Redundanz einhergeht, ist heute bekannt, dass sich auch eine kollaborative oder sogar antagonistische Funktionsweise einstellen kann, welche für die Feinjustierung immunologischer Reaktionen vonnöten ist [60].

1.2.2.1 Homöostatische und inflammatorische Funktionen des Chemokin-/Chemokinrezeptorsystems

Neben der Differenzierung nach strukturellen Merkmalen, lassen sich die Chemokine auch anhand ihrer homöostatischen oder inflammatorischen Funktion klassifizieren. Es handelt sich hierbei um eine vereinfachte Einteilung, da bekanntermaßen auch konstitutiv sezernierte homöostatische Chemokine unter bestimmten Rahmenbedingungen in ihren Expressionsleveln variieren können und vor allem unter chronisch-entzündlichen Bedingungen hochreguliert werden [6, 53].

Homöostatische Chemokine und Chemokinrezeptoren, spielen eine entscheidende Rolle beim *Homing* von Leukozyten zu und innerhalb der SLOs und somit zur Aufrechterhaltung derer Mikroarchitektur. Beim Fehlen dieser lassen sich im Mausmodell Architekturstörungen der SLOs verzeichnen, wobei vor allem die Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 sowie deren Liganden CXCL13 bzw. CCL19/ CCL21 eine entscheidende Rolle spielen [61].

Inflammatorische Chemokine können als Antwort auf proinflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor- (TNF-), INF-), Gewebsverletzung oder auch direkten Pathogenkontakt durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen sezerniert werden. Weiterhin wird ihnen eine Bedeutung in der Entstehung zahlreicher Autoimmunerkrankungen (z.B. Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU), Psoriasis, rheumatoide Arthritis (RA)), Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, chronisch-obstruktive Bronchitis), Transplantatabstoßung sowie bei der Tumorgenese zu teil. Auch das Humane Immunodefizienz-Virus (HIV) nutzt beispielsweise Chemokinrezeptoren als Cofaktor, um die Wirtszellen zu invadieren [62].

Sobald Epithel-, Stroma- oder Immunzellen pathogene Bestandteile detektieren, führt deren Chemokinausschüttung zur Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten oder NK-Zellen und einer frühzeitigen Immunantwort. Weiterhin bewirken diese die Migration aktivierter DCs in die SLOs, wo sie die Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren und zudem regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sowie T-Effektorzellen (T_{eff}) zum Ort der Entzündung locken und die Entzündungsreaktion somit lokal regulieren [63]. Je nach betrachtetem Gewebe und Zelltyp variiert das Chemokin- und Chemokinrezeptorprofil erheblich.

1.2.2.2 Biologische Bedeutung von CXCR3

Der Chemokinrezeptor CXCR3 bindet die Liganden CXCL9 (MIG, *Monokine Induced by Gamma-Interferon*), CXCL10 (IP-10, *Interferon gamma-induced protein 10*) und CXCL11 (I-TAC, *Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*) und spielt vor allem bei der Entstehung inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle. CXCR3 findet sich vorzugsweise auf $CD4^+$ T_H1 -Lymphozyten und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTLs) sowie partiell auf DCs, einigen B-Zell-Subklassen, NK-T-Zellen und NK-Zellen. Er ist somit für das Ablaufen angeborener, wie auch adaptiver Immunantworten, vonnöten. Des Weiteren ist CXCR3 auf humanen IEL und LPL des Dünndarmes und Kolons zu finden. Naive T-Zellen exprimieren CXCR3 hingegen nicht. Die Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 werden auch von nicht-hämatopoietischen Zellen wie SCs, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und anderen

sezerniert. Im Dünn- sowie Dickdarm lässt sich eine Expression von CXCR3 und dessen Liganden unter inflammatorischen, nicht aber unter homöostatischen Bedingungen nachweisen [53, 64, 65]. Wenngleich eine Notwendigkeit von CXCR3 in der korrekten Positionierung von SILTs in der LP des murinen Kolons beschrieben wurde. Die Entstehung der CPs ist CXCR3-unabhängig [11].

Nach DC-induzierter Differenzierung und Aktivierung der T-Zell-Subgruppen zu u.a. T_H1 -Lymphozyten und CTLs, migrieren diese aus den sekundären lymphatischen Geweben unter Hochregulation von CXCR3 in periphere Gewebe ein und sind dort an einer Vielzahl von Infektionen (z.B. Dengue, Herpes simplex-1/2, Malaria, Hepatitis B/C, Borreliose), Tumorerkrankungen (z.B. Nierenzellkarzinom, Melanom, Mammakarzinom) sowie organspezifischen (CED, Typ-1-Diabetes u.a.), wie auch systemischen (Systemischer Lupus erythematodes, RA u.a.) Autoimmunerkrankungen, beteiligt [60]. CXCR3 ist weiterhin für die lymphozytäre Migration ins Peritoneum von Bedeutung. Eine CXCR3-abhängige Migration von T_H1 -Zellen im Rahmen einer akuten Peritonitis konnte im Mausmodell bereits gezeigt werden. Unter Antikörper-vermittelter Blockade von CXCR3 wurden weniger T_H1 -Zellen in das Peritoneum rekrutiert [66]. T-bet, der maßgebliche Transkriptionsfaktor, welcher für die Zuordnung naiver T-Lymphozyten zur T_H1 - sowie CTL-Linie erforderlich ist, führt zu einer direkten Transaktivierung der für CXCR3 kodierenden Gene. Diese enge Korrelation von CXCR3-Expression und T_H1 -/CTL-Differenzierung legt nahe, dass CXCR3 die Migration von Lymphozyten in T_H1 -getriggerten Inflammationen reguliert [60]. Darüber hinaus lässt sich CXCR3 auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen und Monozyten, nachweisen. Letztere sind durch Bindung von CXCL10 in der Lage proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und IL-23 zu sezernieren und somit schon vor der spezifischen Immunantwort mit einer nicht-chemotaktischen Antwort zu reagieren. Dieser Effekt ist für CXCL10, nicht jedoch für CXCL9 und CXCL11 nachgewiesen [67].

T_H1 -Lymphozyten, wie auch CTLs, sind für die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie INF- γ , TNF- α und IL-2 bekannt, welche zu einer Induktion der CXCL9/10/11-Produktion führen, wie auch aus der ursprünglichen Nomenklatur hervorgeht. Die T_H1 -Antwort unterliegt damit einem selbstunterhaltenden Stimulus. Die Freisetzung dieser Chemokine bedarf jedoch weiterer Co-Faktoren, welche für jedes Chemokin spezifisch sind. Auch das Expressionsmaß der einzelnen Liganden auf o.g. proinflammatorische Faktoren zeigt eine große Diversität. Während die CXCL9-Expression beispielsweise eine vollständige Abhängigkeit vom Vorhandensein von INF- γ zeigt, können CXCL10 und CXCL11 auch durch INF- γ / TNF- α bzw. INF- γ und TNF- α induziert werden. Weiterhin zeigen die drei Liganden eine diverse Affinität zum Rezeptor, wobei CXCL11

die höchste und CXCL9 die geringste Affinität aufweist [60]. Funktionellerseits ist bekannt, dass in einigen Entzündungsmodellen das Vorhandensein eines dominanten Liganden Voraussetzung bei der Infektabwehr ist und durch die anderen beiden Liganden nicht kompensiert werden kann. So konnte im Mausmodell während einer Dengue-Infektion beispielsweise gezeigt werden, dass bei vorliegendem CXCL10 KO (*knock-out*) das Vorhandensein von CXCL9 und CXCL11 zur Infektionskontrolle allein nicht ausreichend ist [68]. Weiterhin konnte in murinen Dünndarmtransplantationsmodellen vor allem eine Anreicherung von CXCR3⁺-T-Lymphozyten aufgrund von CXCL10-Anreicherung in der LP im abgestoßenen Gewebe nachgewiesen werden, wobei der Einsatz von CXCL10 KO Transplantaten die Rejektionsreaktion deutlich verzögerte. CXCL9 und CXCL11 schienen hier keinen Einfluss zu haben [69]. Kooperative Effekte konnten am Beispiel der zerebralen Malariainfektion beschrieben werden, in welcher sowohl CXCL9 als auch CXCL10 vorhanden sein müssen, um eine vollständige T-Zell-Infiltration des Gewebes zu ermöglichen. CXCL9 wird hierbei vor allem von Endothelzellen, CXCL10 von Neuronen sezerniert, was als Erklärungsansatz für die fehlende funktionelle Überlappung beider Chemokine dienen könnte [70]. Antagonistische Effekte der Liganden konnten tierexperimentell ebenfalls beschrieben werden. So konnte, bemessen an einem höheren Virustiter in Kornea und Tränenflüssigkeit, bei einer okulären Infektion mit Herpes Simplex Virus-1, eine höhere Suszeptibilität der CXCL10-defizienten Mäusen im Vergleich zu den CXCL9-defizienten Mäusen nachgewiesen werden [71]. Entgegen früherer Annahmen besteht die Bindungskapazität mehrerer Chemokine an einen einzigen Rezeptor somit nicht in einer identischen Affinität mit daraus resultierender uniformer Signalkaskade und konserviertem Wirkungsmuster sowie chemotaktischen Profil. Je nach vorliegendem regulatorischem Element zu einem spezifischen Zeitpunkt sind auch kollaborative sowie antagonistische Effekte messbar.

Mit fortschreitendem Erkenntnisgewinn über den Einfluss von CXCR3 in akuten und chronisch-entzündlichen Prozessen hat sich auch ein gesteigertes Interesse an der Adressierung dieser zu therapeutischen Zwecken entwickelt. Als Beispiel kann hier die Behandlung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen herangezogen werden. In Biopsien von Patienten mit aktiver CU oder MC lassen sich erhöhte Expressionslevel sowohl von CXCR3 als auch dessen Ligand CXCL10 nachweisen, was deren proinflammatorisches Potenzial unterstützt. So konnte in bisherigen Arbeiten eine verminderte Suszeptibilität von CXCR3-KO-Mäusen gegenüber einer chemisch-induzierten Colitis mittels *Dextran sodium sulfate* (DSS) nachgewiesen werden. Eine Inhibition von CXCL10 im Mausmodell ging mit einer Abschwächung des Entzündungsgrades bei einer akuten Colitis einher, weswegen sowohl Rezeptor als auch Ligand als therapeutische

Zielstrukturen für moderne Pharmaka bei CED in Frage kommen [53]. Vergleichbare Ansätze bestehen auch für andere Autoimmunerkrankungen. Erste Studien zum Einsatz neuer Antikörper beim Menschen sind bislang jedoch noch ohne durchgreifende therapeutische Effekte.

1.2.2.3 Biologische Bedeutung von CXCR5

Der Chemokinrezeptor CXCR5 erlangte zunächst unter der Bezeichnung CD185 bzw. Burkitt lymphoma receptor 1 (BLR1) Bekanntheit, da er in besonders hohem Maße auf B-Lymphozyten beim Burkitt-Lymphom nachgewiesen werden konnte [72]. Inzwischen weiß man, dass er unter physiologischen Bedingungen vor allem auf reifen, rezirkulierenden B-Lymphozyten exprimiert wird. Weiterhin ist er auf einzelnen Subgruppen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie einigen T-Zell-Populationen nachweisbar [73, 74]. Gemeinsam mit seinem Liganden CXCL13 (*B-cell attracting chemokine-1*, BCA-1 oder *B-lymphocyte chemoattractant*, BLC), ist er vor allem als homöostatischer Chemokinrezeptor bedeutsam. CXCL13 wird in den B-Zell-Follikeln der SLOs vor allem auf FDCs sowie SZs exprimiert. CXCR5 und CXCL13 sind neben CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21 im Besonderen am Lymphozytenhoming in die SLOs sowie an der Entwicklung lymphatischer Organe und Aufrechterhaltung derer Mikroarchitektur beteiligt, wobei CXCL13 konstitutiv exprimiert wird und die Lymphozyten somit zum Ort lymphatischer Organogenese leitet [7]. Auch bei der Entstehung der CPs des Kolons handelt es sich, im Gegensatz zu den SILTs, um einen CXCL13-abhängigen Prozess [11]. Weiterhin gelangen B-Zellen unter dem Einfluss von CXCL13 in die Peritonealhöhle. Bei Defizienz von CXCL13 wie auch CXCR5 im Mausmodell zeigt sich somit ein ähnlicher Phänotyp mit Fehlen der meisten peripheren Lymphknoten (inguinal, iliakal, sakral, axillär und brachial), einer reduzierten Anzahl von PPs sowie Architekturstörungen der splenischen Lymphfollikel. Die peritonealen B1-Lymphozyten sind unter CXCL13-Defizienz deutlich reduziert [8, 75]. CXCL13 führt ebenso zu einer Induktion der Lymphotoxin (LT)-1/2-Expression ruhender B-Lymphozyten, was wiederum zur Entwicklung von FDCs beiträgt, welche ebenfalls CXCL13 exprimieren und die chemotaktische Aktivität somit unterhalten. Dieses Induktionsmuster lässt sich nicht nur zwischen B-Lymphozyten und FDCs in B-Zell-Follikeln, sondern auch zwischen intestinalen mesenchymalen und lymphatischen Zellen in den PPs nachweisen [6].

Trotz der homöostatischen Eigenschaften von CXCR5 und CXCL13 ist bekannt, dass eine strikte Einteilung der Chemokine und Chemokinrezeptoren nach homöostatischer oder inflammatorischer Funktion rein physiologisch nicht vorgenommen werden kann, da das Expressionsmaß wesentlich von den vorherrschenden zellulären wie stromalen Bedingungen geprägt ist. CXCR5 ist beispielsweise an Immunantworten des angeborenen Immunsystems

beteiligt, welche zu einer frühen Pathogenbeseitigung führen. Hier sind exemplarisch die B1-Zellen des Peritoneums und der Pleurahöhlen hervorzuheben, welche unter CXCR5- oder CXCL13-Defizienz deutlich reduziert sind (s. Kapitel 1.1.1.3). Konsekutiv lässt sich eine Reduktion zirkulierender Antikörper gegen gängige bakterielle Antigene nachweisen [7]. Im Kontext akuter Entzündungen konnte in der Maus zudem eine CXCR5-tragenden Population follikulärer zytotoxischer T-Zellen beschrieben werden, welche selektiv infizierte B-Zellen oder T_{FH} eliminiert [76].

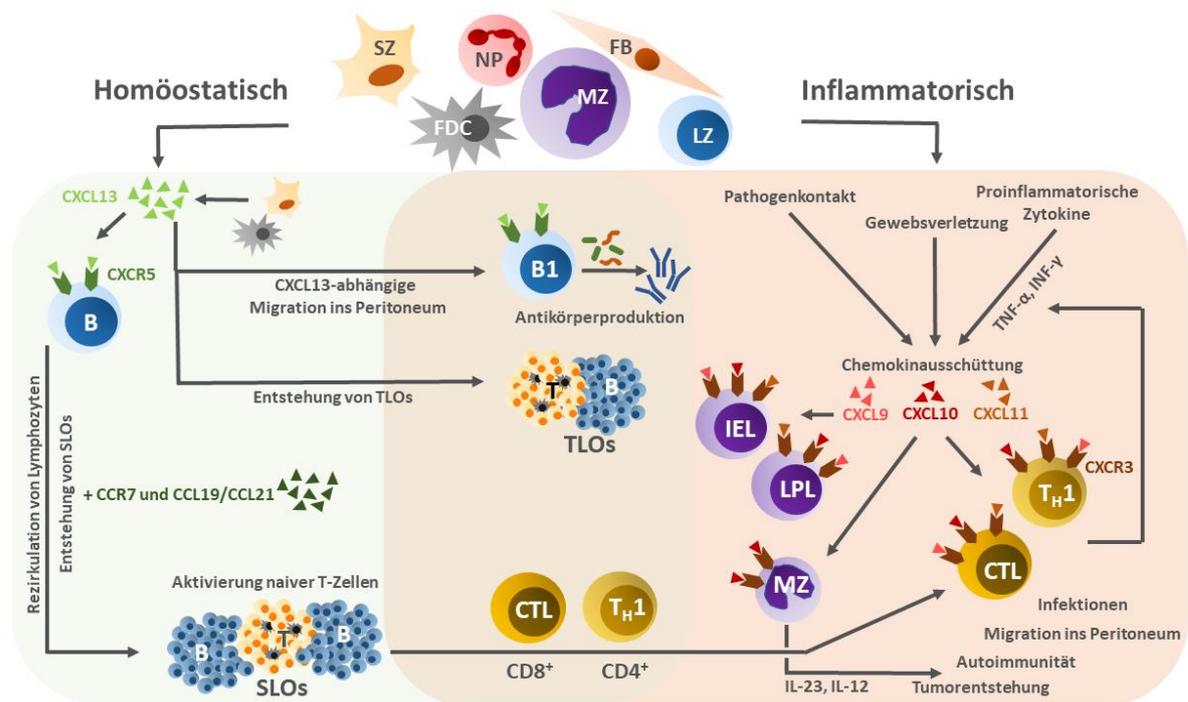


Abb. 6: Homöostatische und inflammatorische Funktionen der Chemokinrezeptoren

Schematische Darstellung homöostatischer und inflammatorischer Funktionen ausgewählter Chemokine und ihrer Rezeptoren. Abkürzungen: B = B-Lymphozyt, CTL = zytotoxischer T-Lymphozyt (*cytotoxic T-lymphocyte*), FB = Fibroblast, FDC = follikuläre dendritische Zelle (*follicular dendritic cell*), IEL = intraepithelialer Lymphozyt, INF = Interferon, LPL = Lamina propria Lymphozyten, LZ = Lymphozyt, MZ = Monozyt, NP = Neutrophiler, SLOs = sekundäre lymphatische Organe, SZ = Stromazelle, T = T-Lymphozyt, TLOs = tertiäre lymphatische Organe.

Weiterhin ist bekannt, dass CXCR5 beim Menschen und in der Maus in einer Vielzahl chronisch-entzündlicher Erkrankungen involviert ist, welche mit der Formierung ektopter Lymphfollikel, so genannter tertiärer lymphatischer Organe (TLOs), einhergehen. Dies führt zur Ausbildung eines proinflammatorischen Mikromilieus, welches die Aktivierung und das Überleben pathogener Lymphozyten unterstützt. Als humane Beispiele sind hier die RA, das Sjögren Syndrom sowie die Helicobacter-assoziierte Gastritis zu nennen. So lassen sich hohe Level von CXCL13 in Helicobacter pylori induziertem MALT sowie gastralen Lymphomen nachweisen [77]. In CXCR5 KO-Mäusen konnte hingegen eine fehlende Entwicklung ektopter Lymphfollikel mit entsprechend

reduzierter chronischer Entzündung im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden [78]. Es bestehen Bemühungen, sich dieses Wissen therapeutisch zu Nutze zu machen. In einem murinen Modell zur Evaluation von Arthritiden, vergleichbar mit der RA beim Menschen, konnte unter CXCR5 KO eine vollständige Resistenz bezüglich der Entstehung einer Kollagen-induzierten Arthritis festgestellt werden, weswegen CXCR5 hier als potentielles Ziel therapeutischer Ansätze diskutiert wurde [79]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte unter Einsatz eines neutralisierenden Anti-CXCL13-Antikörpers im murinen Arthritismodell weiterhin eine signifikante Reduktion der entzündlichen Aktivität anhand klinischer Scores und histopathologischer Befunde nachweisen. Auch ließ sich eine gestörte Architektur der splenischen Lymphfollikel feststellen. Einen Einfluss auf die Generierung tertiärer lymphatischer Gewebe oder auf die Autoantikörperproduktion zeigten sich jedoch nicht. Es ist daher davon auszugehen, dass weitere Mechanismen für die Aufrechterhaltung tertiärer Lymphfollikel und der lokalen inflammatorischen Reaktion verantwortlich sind, welche über das CXCR5/CXCL13-System hinausgehen und dieses bei Funktionsausfall kompensieren können. Das dennoch bessere klinische Auskommen wird als Anti-CXCL13-Effekt auf ebenfalls CXCR5-tragende T-Zell-Subpopulationen gewertet, welche die Entzündungsreaktion modulieren und unterhalten können [79, 80].

1.2.3 Struktur und Funktion von Adhäsionsmolekülen

Adhäsionsmoleküle sind Proteine, welche als integrale Bestandteile der Zellmembran über Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte wichtige Aufgaben bei der Zellmigration, Proliferation und Signaltransduktion erfüllen und darüber hinaus die Integrität von Geweben erhalten. Aufgrund unterschiedlicher struktureller Merkmale lassen sie sich in drei Subklassen einteilen: Integrine, Selektine und Proteine der Immunglobulin-Superfamilie [81].

Integrine sind Heterodimere, welche aus einer α - und einer β -Einheit bestehen. Bei den Säugetieren sind 18 α - und 8 β -Einheiten bekannt, welche sich in der Summe zu 24 Integrinen formieren können. Die Gruppierung der Integrine erfolgt anhand ihrer β -Einheit, wobei nur vier der acht bekannten β -Einheiten auf Leukozyten vorzufinden sind (β 1, β 2, β 3, β 7). Das Haftvermögen beider Bestandteile aneinander wird über ein sog. *Inside-out*- bzw. *Outside-in*-signalling vermittelt. Ersteres besagt, dass die Bindung eines Moleküls an die extrazelluläre Domäne des Integrins zu einer Umlagerung und damit Erhöhung der Avidität der Monomere zueinander führt. Zweiteres repräsentiert die Transduktion der extrazellulären Rezeptorbindung in ein intrazelluläres Signal, was die Dimerisierung wiederum unterstützt [51, 81]. Je nach Integrin binden die Liganden nur an die α -Untereinheit oder an beide. Zu den wesentlichen als Liganden wirksamen Matrixproteinen zählen Kollagen, Laminin, Thrombospondin und Tenascin sowie

Fibronektin, Fibrinogen oder der von-Willebrand-Faktor, wobei letztere erst im Rahmen entzündlicher Prozesse durch Aktivierung von Proteasen freigesetzt werden. Zellulärerseits binden Integrine unter anderem Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, welche auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden [82]. In dieser Arbeit wird genauer auf das α 1- (CD29), α L2- (LFA-1), α 7- und α 4-Integrin (CD49d) eingegangen. Aus den beiden letzteren formiert sich das α 4 β 7-Integrin (*lymphocyte peyer patch adhesion molecule*, LPAM), welches in besonders hohem Maße auf IgA-produzierenden Plasmazellen sowie den Darm besiedelnden CD4⁺ T-Gedächtniszellen exprimiert wird. Über Bindung an MAdCAM-1, welches eine besonders ausgeprägte Expression in HEVs von PPs und mLN sowie auf postkapillären Venolen der LP zeigt, verlassen o.g. Zellsubpopulationen den Blutstrom und invadieren so das intestinale Gewebe. Sie spielen somit eine wichtige Rolle beim Bekämpfen intestinaler Pathogene sowie Initiierung und Aufrechterhaltung von Inflammationen im Gastrointestinaltrakt, einschließlich chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Weiterhin ist das α 7-Integrin als Dimer mit dem α E-Integrin auf zahlreichen IELs und LPLs jedoch nicht auf zirkulierenden Lymphozyten zu finden. Es ist somit für die Retention dieser Zellarten im Darm, aber nicht für deren Rekrutierung vonnöten. Das α 4 β 1-Integrin (*very late antigen-4*, VLA-4) wird auf Lymphozytenpopulationen, wie α 4 β 7-negativen T-Gedächtniszellen, sowie Monozyten exprimiert und bindet an VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, welches unter entzündlichen Bedingungen im Kolon hochreguliert wird. Die Bindung dieses Integrins an seinen Rezeptor ist allerdings weniger spezifisch für das Intestinum und auch in anderen Organen, wie dem zentralen Nervensystem (ZNS), nachzuweisen [51, 83, 84]. Das Integrin LFA-1 ist vorzugsweise auf Makrophagen, Granulozyten, T- und B-Lymphozyten exprimiert und bindet an ICAM-1. Leukozyten können sich auf dieser Art an Endothelien oder extrazelluläre Matrixproteine binden und werden somit zur Zellmigration unter homöostatischen wie inflammatorischen Konditionen befähigt. Durch Bindung an ICAM-1-exprimierende APCs spielt LFA-1 jedoch auch eine Rolle als costimulatorisches Signal in der Aktivierung von T-Zellen [85, 86].

Die Selektine stellen eine Familie aus drei C-Typ Lektinen dar, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie Sialyl-Lewis-X (sLeX)-tragende Glykoproteine oder Glykolipide binden. Die Bezeichnung als C-Typ Lektin beruht auf dem notwendigen Vorhandensein von Calcium für den Bindungsprozess. Die extrazelluläre Lektindomäne bindet an eine homologe Domäne, welche strukturell dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) entspricht. Gefolgt von einem kurzen variablen Abschnitt, einer einzelnen Transmembrandomäne sowie einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Die Selektine werden in P-Selektin, E-Selektin und L-

Selektin eingeteilt [87]. P-Selektin befindet sich in plasmatischen Vesikeln gespeichert, vor allem in Endothelzellen und Thrombozyten, welche dieses nach Aktivierung (durch z.B. Histamine oder Thrombin) an ihre Oberfläche befördern. E-Selektin befindet sich auf Endothelzellen, welche zuvor durch Zytokine wie TNF- oder IL-1 stimuliert wurden. L-Selektine werden konstitutiv auf allen Leukozyten exprimiert. P-Selektin bindet vorzugsweise den P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (*P-selectin glycoproteine ligand 1*, PSGL-1), welcher auf nahezu allen Leukozyten vorzufinden ist und somit die Anheftung und das Entlangrollen von Leukozyten an aktivierten Endothelien oder an Oberflächen-gebundenen Thrombozyten ermöglicht, jedoch auch CD44. E-Selektin bindet zahlreiche Glykoproteine sowie PSGL-1. Zu den relevanten Liganden der L-Selektine gehören ebenfalls PSGL-1 sowie Glykoproteine, welche sich auf HEVs von PPs sowie peripheren Lymphknoten befinden. Diese vermitteln Zell-Zell-Kontakte sowie die Initiierung der zellulären Migration aus dem Blutstrom in ihre Zielgewebe und ermöglichen damit das Leukozytenhoming [6, 51, 81]. Bei der Immunglobulin-Superfamilie handelt es sich um eine

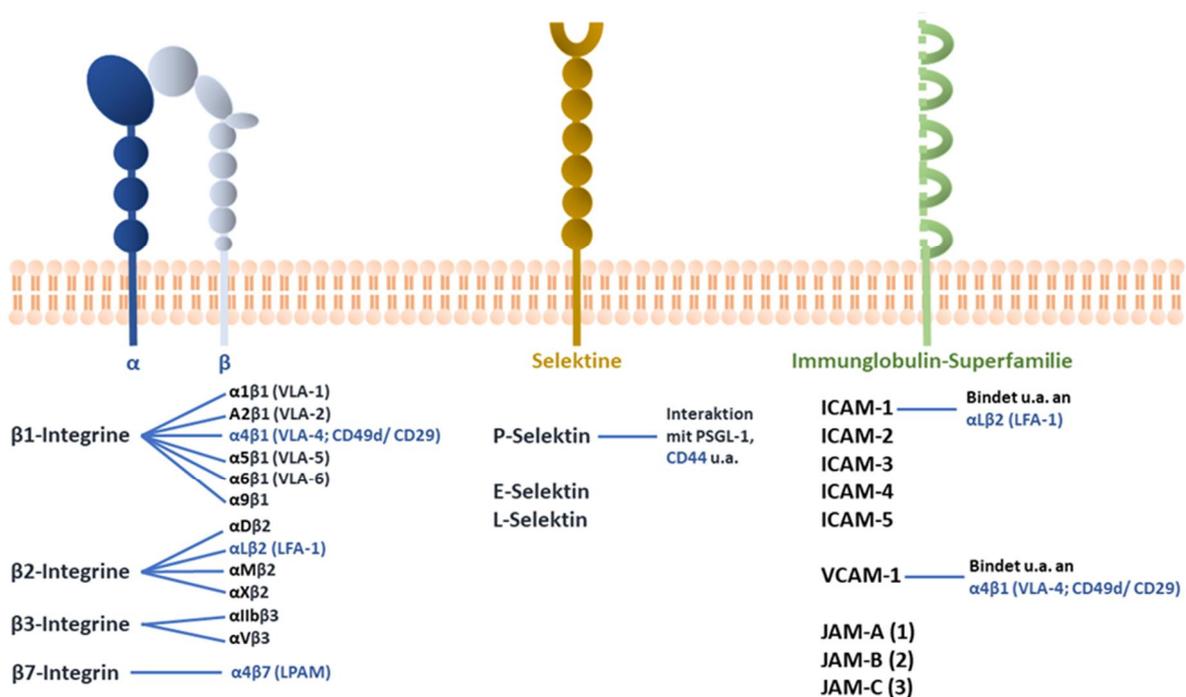


Abb.7: Einteilung zellulärer Adhäsionsmoleküle

Überblick über die drei Klassen von Adhäsionsmolekülen. Abkürzungen: CD (*cluster of differentiation*), ICAM (*intercellular adhesion molecule*), JAM (*junctional adhesion molecule*), LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), LPAM (*lymphocyte peyer patch adhesion molecule*), PSGL-1 (*P-selectin glycoproteine ligand 1*), VCAM (*vascular cell adhesion molecule*), VLA (*very late antigen*) [51, 81].

inhomogene Gruppe von Proteinen, welche in die ICAM-, VCAM- und JAM-Familie eingeteilt werden können und strukturell durch divers konfigurierte, extrazelluläre Immunglobulindomänen charakterisiert sind. Die ICAM-Familie besteht aus fünf Mitgliedern (ICAM1-5), wobei hier vor allem auf ICAM-1 (CD54) eingegangen werden soll, welches unter anderem das Integrin L 2

(LFA-1) bindet. Dies zeigt eine extrazelluläre Domäne bestehend aus fünf Immunglobulinanteilen und ist konstitutiv auf venösen Endothelien sowie auf einigen Leukozyten exprimiert. Mittels Aktivierung durch das inflammatorische Zytokin TNF- α ist ICAM-1 auf nahezu allen Körperzellen nachzuweisen. Die Interaktion zwischen auf Endothelien exprimiertem ICAM-1 und dem leukozytären LFA-1 führt zur Anheftung und Diapedese der Leukozyten. ICAM-2 (CD102) findet sich vorzugsweise auf Blutplättchen und Endothelzellen, ICAM-3 (CD50) auf Leukozyten, ICAM-4 (CD242) auf Erythrozyten sowie ICAM-5 vor allem im zentralen Nervensystem. Zur VCAM-Familie zählt lediglich das VCAM-1 (CD106), welches unter Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen ebenfalls auf zahlreichen Zellarten exprimiert wird und sich sowohl durch seine Bindungskapazität an einige Integrine sowie seine Funktion als Signalmolekül auszeichnet. Hier ist besonders auf das α 1- (CD29) und α 4-Integrin (CD49d) hinzuweisen. Die JAM-Familie besteht aus drei Mitgliedern: JAM-A (JAM1), JAM-B (JAM2) und JAM-C (JAM3). Sie spielen eine Rolle bei der Zellmigration sowie bei der Formierung und Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten wie *Tight junctions*. Eine Expression lässt sich auf Leukozyten, Thrombozyten wie auch Endothelien und Epithelien nachweisen [81]

CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein und ebenfalls an Zell-Zell- wie Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt. Es wird jedoch nicht den o.g. Subklassen von Adhäsionsmolekülen zugeordnet. Es existieren zahlreiche Isoformen, welche sich funktionell unterscheiden und sowohl auf Leukozyten als auch auf vielen anderen Zelltypen nachzuweisen sind. Als Liganden sind extrazelluläre Matrixproteine, wie die Hyaluronsäure, zu nennen. Funktionellerseits spielt es eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität von Geweben sowie bei der Aktivierung und *Homing* von Lymphozyten. Einige Isoformen sind in besonderem Maße auf malignen Zellen nachzuweisen, was CD44 als potentielles Ziel von Tumortherapien auszeichnet [88, 89].

Zusammen mit dem Chemokin-/Chemokinrezeptorsystem spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle beim Anheften von Leukozyten an das Endothel sowie die schrittweise Migration in lymphatische Organe bzw. Orte akuter oder chronischer Inflammation. Die Gewebsspezifität wird durch das vorherrschende Adhäsionsmolekül- bzw. Chemokin-/Chemokinrezeptorprofil bestimmt. In Kenntnis der Bedeutung von Adhäsionsmolekülen bei der Entstehung entzündlicher Erkrankungen des Menschen wurden im letzten Jahrzehnt Pharmaka entwickelt, welche spezifische Adhäsionsmoleküle selektiv binden und damit in ihrer Funktion hemmen [81]. Als Beispiel eines Integrin-Antagonisten kann Vedolizumab (Entyvio®) genannt werden, bei welchem es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen das α 4 β 7-Integrin handelt und die Invasion von Lymphozyten in den Darm somit spezifisch blockiert wird. Der Antikörper

kommt bei mittelschweren bis schweren Verläufen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zum Einsatz, bei denen konventionelle Therapien oder Antikörper gegen TNF- nicht oder nicht mehr wirksam sind [90].

1.3 Pathophysiologische Immunantworten im Darm

Der menschliche Darm wird von über 100 Billionen Mikroorganismen besiedelt, was dem Zehnfachen der Zahl von Körperzellen entspricht. Die den Darm physiologischerseits bewohnenden Organismen werden zusammengefasst als Kommensale bezeichnet. Bislang konnten über 1000 verschiedene Spezies identifiziert werden. Der Großteil dieser Mikroorganismen ist unentbehrlich für physiologisch ablaufende Prozesse wie Nahrungszersetzung und Gewinnung essenzieller Nahrungsmittelbestandteile [91]. Es ist inzwischen bekannt, dass eine gestörte Zusammensetzung unseres Mikrobioms zu Erkrankungen, wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und Adipositas, führen kann [92]. Die eigentliche Herausforderung besteht in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen einer physiologischen Besiedlung und der Abwehr potentiell pathogener, invasiver Mikroorganismen. Eine adaptive Immunantwort auf spezifische Antigene bedarf eines verhältnismäßig großen Zeitaufwandes bis es zu einer klonalen Expansion der passenden Zellpopulation kommt und Pathogene effizient beseitigt werden können. Den Zellen des angeborenen Immunsystems, welche über präformierte Rezeptoren und Mechanismen der Keimelimination verfügen, wird im Darm daher eine besondere Bedeutung zu teil [93]. Deren Organisation im GALT und das Ablaufen intestinaler Immunantworten wird in Kapitel 1.1.1.2 näher beschrieben.

1.3.1. Akute und chronische Dickdarmentzündungen beim Menschen (Kolitis)

Unter eine Kolitis ist eine akute oder chronisch-entzündliche Erkrankung des Dickdarmes (Kolon) zu verstehen. Eine Sonderrolle nimmt die ischämische Kolitis ein, welche durch Minderperfusion des Darmes, z.B. im Rahmen eines Gefäßverschlusses oder nach Reanimation, auftreten kann. Alle drei Formen gehen mit Durchfällen sowie Bauchschmerzen einher. Die akuten Kolitiden sind meist nur vorübergehend bestehende Erkrankungen, welche infektiöser (viral, bakteriell), chemischer (Antibiotika) oder radiogener (Strahlungsfolgen) Genese sein können. Die chronischen Kolitiden treten als Krankheitskomplex der CED auf und lassen sich in Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und die mikroskopische Kolitis unterscheiden [94]. Ist eine sichere Zuordnung zum MC oder CU nicht möglich, hat sich der Begriff der Colitis indeterminata etabliert [95]. MC und CU zeigen eine weltweite Zunahme der Prävalenz und Inzidenz. Es ist von 2,2 Millionen Erkrankten allein in Europa auszugehen [96], der Manifestationsgipfel liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr [97]. In 25% der Fälle tritt die Erkrankung vor dem 20. Lebensjahr

auf [98]. Inzwischen ist auch eine Krankheitszunahme in den Schwellenländern Asiens, Südamerikas und Afrikas festzustellen [99]. Die Erkrankungen zeichnen sich durch schubweises Auftreten von Entzündungen im Darm und begleitenden extraintestinalen Manifestationen aus. Während der MC alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes befallen kann, breitet sich die CU retrograd und kontinuierlich vom Rektum über proximale Dickdarmabschnitte aus. In der Regel ist ein exklusiver Befall des Kolons festzustellen [95]. Histologisch zeigen sich sowohl Merkmale einer akuten (Neutrophileninfiltration) als auch chronischen (Lymphozyteninfiltration, Krypten-/Becherzellverlust) Entzündung. Während die CU auf die Mukosa begrenzt bleibt, zeigt sich beim MC ein transmuraler Prozess mit dem Nachweis von Granulomen, Stenosen und Fisteln [100]. Beide Erkrankungen entstehen durch eine Kombination aus genetischen Faktoren, dem körpereigenen Mikrobiom sowie diversen Umwelteinflüssen, welche zu einer Dysregulation der mukosalen Immunantwort auf endogene pathogene und nicht-pathogene Keime führen [101]. Bislang konnten ca. 150 Gene identifiziert werden, welche unter Verdacht stehen, die Entstehung einer CED zu begünstigen [102]. Die Diagnosestellung ist häufig schwierig, sollte aber immer anhand einer Kombination aus der klinischen Präsentation, Blut- und Stuhluntersuchungen, Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) und Ileokoloskopie, Histologie und ggf. weiterer Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen [98]. Die therapeutischen Strategien haben sich in den letzten Dekaden stark verändert. Während früher nur eine generelle Immunsuppression mittels Kortikosteroiden und Thiopurinen im Vordergrund stand, etablieren sich inzwischen immer mehr Pharmaka, welche direkt in Signaltransduktionswege der Inflammationskaskade eingreifen und diese hemmen. Zielmoleküle sind hier unter anderem der proinflammatorische Tumornekrosefaktor (TNF-) oder Integrine. Eine Inhibition erfolgt mittels monoklonaler Antikörper oder rekombinanter Proteine. Das Ziel aller Therapien ist die Reduktion von Symptomen, eine Verbesserung der Lebensqualität sowie die Vermeidung von Langzeitkomplikationen, welche operative Maßnahmen nötig machen oder maligne Erkrankungen zur Folge haben können [98, 103].

1.3.2 Mausmodelle für entzündliche Darmerkrankungen

Zur Erkenntnisgewinnung der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen und Etablierung neuer Therapiestrategien existieren über 66 Tiermodelle [104]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über eine Auswahl der gängigen Kolutismodelle in der Maus. Keines der Modelle bietet ausschließlich Vorteile für die jeweilige Fragestellung, weswegen die sorgfältige Auswahl des richtigen Modells von großer Bedeutung ist. Dies ist beispielsweise vor dem Hintergrund der multifaktoriellen Pathogenese der CED von Interesse, welche durch kein Modell allein in ausreichender Weise

repräsentiert werden kann, aber auch für die präklinische Testung, neuer potentiell therapeutisch wirksamer Substanzen. Grundsätzlich können die existierenden Modelle in vier verschiedene Ansätze unterteilt werden. Chemisch-induzierte Kolitismodelle, adaptive Transfermodelle, spontane Kolitismodelle sowie genetische Ansätze [105]. Diese Arbeit fokussierte sich auf die Induktion einer chemischen Kolitis mittels Dextran Sodium Sulfat (DSS), einem Polysaccharid, welches klinische wie histologische Charakteristika der CED am Mausmodell imitiert [106]. Das Modell bietet aber auch jenseits der CED-Forschung Merkmale, welche man sich in der Untersuchung intestinaler Immunantworten zu Nutze machen kann. Neben der einfachen

CHEMISCH	ZELLTRANSFER	SPONTAN/ KONGEN	GENETISCH		
			Transgen	Knock-out	
DSS TNBS Essigsäure Oxazolone				MDR1A	Verminderte Intestinale Barriere
	CD45RB ^{High} -Zellen		STAT4 CD40 mAb → Rag ^{-/-}	STAT3	Beeinträchtigte angeborene Immunantwort
Oxazolone				TCRα	Übermäßige Effektorzellantwort
			TGF-RII- dominant negativ	IL-10 Gai2 TGFβ-1 IL2/ IL-2R	Defekt der T-regulatorischen Zellen
	CD8 ⁺ Zellen ECOVA	C3H/HeJBir SAMP/Yit	SOCS1		Andere

Tab. 1: Auswahl von Modellen zur Generierung einer akuten Kolitis

Darstellung einer Auswahl gängiger Kolitismodelle zur Generierung einer Kolitis in der Maus. CD = cluster of differentiation, DSS = Dextran Sodium Sulfat, ECOVA = *E. coli* expressing Ovalbumin-peptide, IL = Interleukin, MDR = multi drug resistance, SOCS = suppressor of cytokine signaling, STAT = signal transducer and activator of transcription, TCR = t cell receptor, TGF = transforming growth factor, TNBS = Trinitrobenzolsulfonsäure, Adaptiert nach [104, 105].

Handhabung (orale Administration im Trinkwasser) liegen die Vorteile der Substanz in der raschen Inflammationsinduktion und der hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Anhand des Applikationsrhythmus und der Dosierung lassen sich akute wie chronische Entzündungen auslösen. Das Modell ist erstmals 1990 durch Okayasu und Kollegen etabliert worden [107]. Die konkreten Mechanismen für die Wirksamkeit der Substanz sind nicht ganz klar, es ist jedoch davon auszugehen, dass über eine Schädigung der epithelialen Barriere intestinale Mikroben und assoziierte Antigene in subepitheliale Kompartimente des Darmes vordringen können und somit eine akute Entzündung generiert wird [108]. Der Erfolg der Methode hängt dabei nicht nur von

der Anzahl der Versuchstage (5-10 Tage, in dieser Arbeit 5-7 Tage) und Konzentration (empfohlen 1-5%, in dieser Arbeit 3%) der Substanz im Trinkwasser, sondern auch vom molekularen Gewicht ab. Nur DSS mit einem molekularen Gewicht von 40-50 kDa penetriert die epitheliale Barriere in ausreichendem Maße und führt somit zu der gewünschten Gewebszerstörung. Bereits ein Tag nach DSS-Administration lässt sich eine veränderte Expression von *tight junctions* (auch Schlussleisten, Zonula occludens), wie Occludinen und Claudinen, nachweisen, was die Permeabilität des Darmes erhöht [109]. Auch die das Epithel schützende Mucusschicht ist unter DSS-Applikation vermindert, was ebenfalls zur Beeinträchtigung der epithelialen Barriere führt. Im Kolon ist hier insbesondere MUC2 zu nennen, welches von den Becherzellen produziert wird und sich als sekretorisches Muzin in Form einer viskösen, gelartigen Schicht auf die Epithelzellen legt. Mäuse mit einer MUC2-Defizienz weisen einen Verlust der intestinalen Mucusschicht mit vermehrtem Nachweis von Bakterien in den Krypten sowie in unmittelbarem Epithelkontakt auf und zeigen schwerere Entzündungsreaktionen unter DSS-Applikation [109-111]. Weiterhin beeinträchtigt DSS die mikrobielle Balance, was mit dem Untergang protektiver Spezies und entsprechender Proliferation potentiell proinflammatorischer Mikroben einhergehen kann. Entsprechend konnten im Mausmodell für einige probiotisch wirksame Substanzen protektive Effekte hinsichtlich der epithelialen Barriere nachgewiesen werden, welche durch Modulation der *tight junctions* zu einer Reduktion der Gewebedurchlässigkeit führen [109]. Der Entstehung einer Entzündung unter DSS liegen somit komplexe Mechanismen zugrunde, welche das Ablaufen intestinaler Immunantworten auf verschiedenen Ebenen beeinflussen können.

1.4 Aufgabenstellung

Chemokinrezeptoren beeinflussen die Rekrutierung von Immunzellen während akuter Immunantworten. Für die Chemokinrezeptoren CXCR5, aber auch CXCR3, ist eine Bedeutung in der Modifikation homöostatischer wie inflammatorischer Prozesse im Darm bekannt. Zellulärerseits spielen T-Zellen mittels vielfältiger Effektorfunktionen während akuter intestinaler Entzündungen eine besondere Rolle. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von CXCR5 und CXCR3 auf den Verlauf einer akuten Kolitis sowie die Rekrutierung und Funktionalität von T-Zellen in Abhängigkeit dieser Chemokinrezeptoren betrachtet werden. Ergänzend sollte die Bedeutung des peritonealen Mikromilieus für die gewebspezifische Rekrutierung von T-Zellen im Rahmen akuter Kolitiden untersucht werden. In diese Überlegungen wurden weitere Adhäsionsmoleküle mit einbezogen, welche das Wanderungsverhalten von T-Zellen in der akuten Kolitis möglicherweise beeinflussen. Als methodische Grundlage dienten Beobachtungen unter nativen wie akut-entzündlichen Bedingungen, welche mittels DSS-Kolitis am Mausmodell generiert wurden. Folgende Fragestellungen sollten hierbei näher betrachtet werden:

1. Beeinflusst der Chemokinrezeptor CXCR5 den Verlauf einer DSS- induzierten Kolitis und die Rekrutierung von T-Zellen in den Darm?
2. Lassen sich Unterschiede hinsichtlich gewebspezifischer Rekrutierung der KO T-Zellen vs. Wt T-Zellen unter homöostatischen wie inflammatorischen Konditionen feststellen?
3. Inwiefern hat der inflammatorische Chemokinrezeptor CXCR3 Einfluss auf die gewebspezifische Rekrutierung von T-Zellen?
4. Zeigen sich Unterschiede im Regenerationsvermögen von adoptiv-transferierten CXCR5 KO T-Zellen vs. Wt T-Zellen im *Rescue*-Versuch von T-Zell KO-Mäusen?
5. Wird das Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen auf T-Zellen und deren Migrationsverhalten unter dem Einfluss des peritonealen Mikromilieus moduliert

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Medien

ACK-Lysepuffer	8,29 g NH ₄ Cl, 1 g KHCO ₃ , 37,2 mg Na ₂ EDTA, ad 1 l H ₂ O, pH 7,3
FACS-Puffer	PBS, 2 % FKS, 0,01 M EDTA pH 8,0
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , ad 1l H ₂ O, pH 7.2
RPMI-Medium	500 ml RPMI 1640 Medium, 50 ml FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml 200 mM Glutamin, 500 1 50 mM - Mercaptoethanol für primäre Mauslymphozyten

2.1.2 Chemikalien

Abbott GmbH	Isofluoran (Florene)
Biochrom KG	FKS, PBS (10x) w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Dako	Hämatoxylin
GE-Healthcare	Percoll (1,13 g/ml)
Merck	Entellan, 0,5 %-ige Eosin G-Lösung, Formaldehyd
MP Biomedicals	Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) (36-50 kDa)
PAA	DMEM Medium, HBSS (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>) w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , RPMI 1640 Medium, Penicillin/Streptomycin 100x, Seren (Hamster, Maus, Ratte, fetales Kälberserum)
C. Roth	Aceton, Ammoniumchlorid, destilliertes Wasser, 1,4 Dithiothreit (DTT), DMSO, EDTA-Dinatriumsalz-dihydrat, Essigsäure, Ethanol, Histofix (4 %-ige säurefreie, phosphatgepufferte Formaldehyd-lösung), Kaliumhydrogencarbonat, L-Glutamin, - Mercaptoethanol, Natriumchlorid, Toluol
Sigma-Aldrich	EDTA-tetranatriumsalz-dihydrat, Tryptanblau-Lösung (0,4 %)

2.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Wirt	Markierung	Hersteller
Primärantikörper			
β7-Integrin	Ratte	Biotin	Biolegend
γδ-TCR	Armenischer Hamster	APC, FITC, PE	Biolegend
CD29	Armenischer Hamster	Biotin	Biolegend
CD3	Armenischer Hamster	APC, FITC, PE	Biolegend
CD4	Ratte	FITC, PE, PerCP	Biolegend
CD44	Ratte	PE	Biolegend
CD45	Ratte	PE	Biolegend
CD45R (B220)	Ratte	APC, PerCP	Biolegend
CD45.1	Maus	FITC	Biolegend
CD45.2	Maus	Pacific Blue	Biolegend
CD49d	Ratte	Biotin	Biolegend
CD8	Ratte	PerCP	Biolegend
LFA-1	Ratte	PE	BD Biosciences
Sekundärantikörper			
Streptavidin		PE	Biolegend
Isotypenkontrollen			
hamsterIgG	Hamster	APC, Biotin, FITC, PE	Biolegend
mausIgG2a	Maus	FITC, Pacific Blue	Biolegend
ratttelgG2a	Ratte	Biotin, FITC, PE, PerCP	Biolegend
ratttelgG2b	Ratte	APC, Biotin, FITC, PE	Biolegend

Tab. 2: Antikörper für die Durchflusszytometrie

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH

Beckman Instruments GmbH

Becton-Dickinson

Reinluftbank für die Zellkultur

Zentrifugen (GS-6KR und J2-MC)

Durchflusszytometer (FACS Canto, FACS

Aria I, II und III), BD FACS Flow 5 ml

Polystyrol-Rundboden-Röhrchen (mit oder

ohne Cell Strainer), Einfrierboxen,

Einwegspritzen (5, 10, 20, 50 ml), sterile 15

ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen, Zellsiebe

(40 μm, 70 μm, 100 μm)

Vortex Genie 2

Bender & Hobein AG

Biozym	Pipettenspitzen
Braun AG	Kanülen, Einmalspritzen
Buchner Laborservice	Bakterien-Schüttler
Corning Incorporated	Reagenz-Reservoir aus Polystyren,
Eppendorf	Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml
Feather	Microtommesser N35H
Greiner Bio-One	Mikrobiologische Zellkulturschalen Ø 35 mm, 60 mm, 100 mm, serologische Pipetten, Plastik Pasteurpipetten
Heraeus	Brutschränke, Kühlzentrifuge Multifuge 4KR, Multifuge X3F3
IKA Labortechnik	Magnetrührer, MS3 Vortexer
Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH	Schütteltisch ST5
Innovatis	CASY® Cell Counter TTC, CASYton
Integra Biosciences	Pipetman
Kimberley-Clark Professional	Kimtech Science Wischtücher
Liebherr Comfort	Kühlschrank 4°C
Linde	Stickstofftonne
LO-Laboroptik GmbH	Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe)
McCormick Scientific	Paraplast zur Gewebeeinbettung in Paraffin
Menzel Gläser	Objektträger SuperFrost®Plus
Mettler Toledo	Analytische Feinwaage, Pipettenspitzen (Rainin), pH-Meter Seven Easy
Microm international	Microtom HM 355S, Microtommesser, Paraffineinbett-station EC350-1, Paraffin- Einbettkassetten (TurboFlow Kassetten)
Millipore	Nylonnetz
Nunc GmbH	Einfrierröhrchen Cryotube 2 ml, Nalgene öMr. Frostyö 1°C freezing Container, 96 well
Pechiney Plastic Packaging	Mikrotiterplatten mit Deckel
C. Roth	Parafilm
Sänger	Deckgläser, Glaspasteurpipetten, Magnetrührstäbchen
	Einmalhandschuhe

Sartorius

Schott

Schreiber GmbH

Thermo Scientific

VWR International GmbH

Carl Zeiss Mikroskopie

Tischwaage

Bechergläser, Erlenmeyerkolben,
Glaspipetten, Glasflaschen, sonstige
Glasgeräte

Chirurgische Instrumente

Tiefkühlschränke (-86°C)

Petrischalen

AxioCamColor Digitalkamera für die
Mikroskopie, Axiophot Photomikroskop, Axio
Imager M2m Apotom2.0

2.1.5 Software

Adobe

Illustrator CS3

Becton Dickinson

FCAP Array v1.0.1

Flowjo

Flowjo 8.8.2

GraphPad Software, Inc.

GraphPad Prism 5

Microsoft

Excel, Word, PowerPoint

Thomson Reuters

Endnote X7.8

Zeiss

AxioVision 4.5.1.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von primären mononukleären Zellen

2.2.1.1.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus der Milz

Milzen wurden frisch entnommen und in ein kleines Kunststoffschälchen (Durchmesser 60 mm) überführt, welches mit 3 ml FACS-Puffer gefüllt war. Mit Hilfe eines Spritzenstempels wurden die Milzen vorsichtig zerdrückt, bis keine größeren Gewebstücken verblieben waren. Anschließend wurde das Lysat mittels 10 ml Pipette aufgenommen und über ein Nylonnetz (40 µm) in ein 15 ml Tube überführt. Das Schälchen und darin enthaltene Gewebsreste wurden 2-3 mal mit je 3 ml FACS-Puffer gespült und mit dem Primärlysat der Milz zusammengeführt. Es erfolgte die Zentrifugation des Zelllysats (5 Minuten (min), 300 x g, Raumtemperatur (RT)), Abkippen des Überstandes und anschließende Erythrozytenlyse des erhaltenen Zellpellets (Vgl. Kapitel 2.2.1.1.2.).

FACS-Puffer: PBS, 2% FKS, 0,01M EDTA: pH 8,0

2.2.1.1.2 Erythrozytenlyse

Zum Erhalt einer reinen Splenozytensuspension erfolgte die hypotone Lyse der Erythrozyten mittels Lysepuffer. Dazu wurde das Milzzellpellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert, auf 5 ml aufgefüllt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml FACS-Puffer wurde der Vorgang unterbrochen und das Lysat für 5 min, 300 x g, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Zellpellet in zwei weiteren Waschsritten mit jeweils 15 ml FACS-Puffer von Restbeständen des Lysepuffers befreit (Jeweils Zentrifugation für 5 min, 300 x g, RT) und schließlich in FACS-Puffer resuspendiert.

Lysepuffer: 8,29 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 37,2 mg Na₂EDTA, ad 1 l H₂O, pH: 7,3

2.2.1.1.3 Isolierung von Knochenmarkszellen

Murine Femuren und Tibiae wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und mit Hilfe eines Skalpell beidseitig eröffnet. Eine Kanüle mit angefügter 10 ml Spritze mit sterilem DMEM wurde in die Knochenmarkshöhle eingeführt, das Knochenmark herausgespült und in einem 50 ml Röhren gesammelt. Die so gewonnenen Knochenmarkszellen wurden zur Vereinzelung über ein

Nylonsieb (20 µm) gegeben und anschließend mittels Neubauer-Zählkammer (Vgl. Kap. 2.2.1.1.6) gezählt. Sollten die Knochenmarkzellen unmittelbar intravenös appliziert werden, wurden sie zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Alternativ wurden die Zellen pelletiert (10 min, 1200 rpm, 4°C), mittels 5 ml Einfriermedium resuspendiert und in speziellen Einfrierbehältnissen à je 1 ml bei -80°C tiefgefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben in einen Stickstoffbehälter überführt.

Einfriermedium: 90% FKS, 10 % DMSO (Dichte: $2,7 \times 10^7$ /ml)

2.2.1.1.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Peritoneum

Zur Durchführung einer Peritoneallavage wurden die Versuchstiere nach erfolgter Isofluranüberdosierungsnarkose in Rückenlage fixiert. Haut und Fell wurden unter manuellem Zug eröffnet und das Peritoneum mittels Präparationsschere perforiert. Es erfolgte die schrittweise, intraperitoneale Injektion von 3-4 ml FACS-Puffer mittels 1 ml Kolbenhubpipette und Spülung des gesamten Bauchraumes. Anschließend wurde das injizierte Volumen wieder aufgenommen und in ein 15 ml Reagenzglas überführt. Der Vorgang wurde in zwei bis drei Durchgängen wiederholt. Die Zellsuspension wurde mittels Zentrifugation pelletiert (5 min, 300 x g, RT) und in FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.1.1.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Kolon

Kolon- und Zökumpräparate wurden frisch von der Maus entnommen, in drei bis vier Stücke zerteilt und der Kot mit Hilfe einer Pinzette ausgestrichen. Die einzelne Darmstücke wurden der Länge nach eröffnet und in einem Plastikschälchen (100 mm) mit FACS-Puffer gespült. Anschließend wurden die Darmstücke sehr fein zerschnitten, in 50 ml Reagenzgläsern mit 20 ml HBSS/EDTA/DTT gesammelt und für 15 min bei 37°C kräftig geschüttelt. Nach Absinken der Darmstücke wurde der Überstand abpipettiert und zur Isolation der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) aufbewahrt. Erneut wurden die Darmstücke in 20 ml HBSS/EDTA/DTT aufgenommen und der zuvor beschriebene Vorgang wiederholt. Der Überstand des zweiten Durchlaufs wurde mit dem ersten vereint. Anschließend wurden die Kolonstücke zweimal mit 20 ml Medium gewaschen und die Überstände ebenso gesammelt. Die Gesamtheit der *gepoolten* Überstände wurde für 10 min, 300 x g, RT zentrifugiert. Die Zellpellets wurden zur Dichtegradientenzentrifugation in 5 ml einer 40% Percoll-Lösung resuspendiert und auf 5 ml einer 100% Percoll-Lösung geschichtet. Nach Zentrifugation (25 min, 1200 x g, RT, ohne Bremse) konnte der Leukozytenring aus der Interphase mittels Glaspipette entnommen und in ein neues 15 ml Reagenzglas überführt werden, welches anschließend auf 15 ml mit Medium aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden zentrifugiert

(10 min, 300 x g, RT) und der Überstand verworfen. Der Vorgang wurde weitere zweimal wiederholt, das gewaschene Zellpellet abschließend in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert.

HBSS/EDTA/DTT: HBSS (w/o Mg/Ca), 8 % FKS, 5 mM EDTA, 1mM DTT

Medium: RPMI 1640, 10 % FKS, 2mM Glutamin, 50 nM β -Mercaptoethanol

100 % Percoll-Lösung: 9 Teile Percoll (Dichte 1,13 g/ml), 1 Teil 10-fach PBS

40 % Percoll-Lösung: 4 Teile 100 % Percoll-Lösung, 6 Teile Medium (ohne β -Mercaptoethanol)

2.2.1.1.6 Ermittlung von Zellzahl und Vitalität

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe zweier Verfahren. Zur manuellen Bestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwandt. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 0,4 %-igem Trypanblau versehen, womit vitale Zellen als nicht gefärbt detektiert werden konnten. Unter Auszählung der 4 Großquadrate und Einbeziehung des Verdünnungsfaktors errechnete sich die Zellzahl folgendermaßen:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Zellen} : 4) \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für durchflusszytometrische Messungen wurde die Zellzahl der zu färbenden Zellsuspension elektronisch mittels Casy-Zellzählgerät (Innovatis) ermittelt und anschließend die optimale Menge an Zellen eingesetzt.

2.2.1.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich verschiedene Zellpopulationen zu differenzieren. Das Prinzip beruht darauf, dass Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper spezifische Antigene binden und sie damit sichtbar machen können.

Die behandelten Zellsuspensionen werden vom Durchflusszytometer zunächst angesaugt, wobei die Zellen zu einer Streuung des auf sie einwirkenden Lichtes führen. Anhand des Vorwärtsstreulichtes (*Forward Scatter*, FSC) werden sie nach Größe, mit Hilfe des Seitwärtsstreulichtes (*Sideward Scatter*, SSC) nach Granularität eingeteilt und dargestellt. Kleine Zellen mit einer geringen Granularität können so als Lymphozyten detektiert werden. Eine weitere Spezifizierung erfolgt nun über die Markierung zellspezifischer Antigene mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Verschiedene Laser und optische Filter regen die Farbstoffe zur Lichtemission in ihrem spezifischen Spektralbereich an und können somit detektiert

werden. Die Erfassung, graphische Darstellung und Bearbeitung der Daten erfolgt über eine Verbindung des Durchflusszytometers mit einem Computer.

Zur Imm fluoreszenzfärbung erfolgte die Überführung der untersuchten Zellen (je nach Versuch bis zu 1×10^6 Zellen) in Mikrotiterplatten. Zunächst wurden die Zellen in 200 μ l Blocking-Puffer (FACS-Puffer/5% Serum) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 300 x g, 4°C) erfolgte die Resuspension in 100 μ l eines in FACS-Puffer verdünnten Antikörpers für 20 min auf Eis. Biotinylierte Antikörper wurden anschließend mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Streptavidin für 20 min auf Eis inkubiert. Zwischen allen Inkubationsschritten erfolgten je 2 Waschschr itte mit 300 μ l FACS-Puffer. Abschließend konnten die gefärbten Zellen in 300 μ l FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer FACS Canto (Becton Dickinson) gemessen werden. Eine Sonderrolle nimmt das *red fluorescent protein* (RFP) ein, welches im Genom entsprechender Tiere integriert ist und RFP-positive Zellen im roten PE-Kanal des Durchflusszytometers detektierbar macht.

2.2.1.2.1 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Milzzellen wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel Durchflusszytometrie) gewonnen. Mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper wurde die gewünschte Zellpopulation detektiert und mit einer Reinheit von 99% aus Gesamtsplenozyten isoliert. Die Zellsortierung erfolgte in 100% FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) mit Hilfe des FACS Aria I, II oder III (Becton Dickinson).

2.2.1.2.2 Gating-Strategie von T-Zellen in der Durchflusszytometrie

Insofern nicht anders beschrieben, wurden T-Zellen mit Hilfe nachfolgender *Gating*-Strategie in der Durchflusszytometrie identifiziert. Zunächst wurden die Lymphozyten anhand des FSC und SSC als kleine Zellen mit geringer Granularität aus dem gesamten Zelllysate ermittelt. Zellen, welche in der Immunfluoreszenzfärbung gegen CD3 und den TCR hochpositiv für beide Marker waren, entsprachen den T-Zellen. Nur in einigen wenigen Versuchen wurde die T-Zell-Population zusätzlich als B220-negativ oder CD4-negativ definiert.

2.2.2 Tierexperimentelles Arbeiten

C57Bl/6 Wildtyp (CD45.2⁺), kongene C57Bl/6 Ly5.1 (CD45.1⁺), CXCR5 KO (CD45.2⁺), CXCR5 CXCR3 KO (CD45.2⁺), C57Bl/6-RFP (CD45.2⁺) sowie KO (CD45.2⁺) Mäuse stammten aus der Zucht der Arbeitsgruppe, die in der Tiereinrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin durchgeführt wird.

Alle Versuchstiere wurden entsprechend nationaler Richtlinien unter spezifischen, pathogenfreien Bedingungen in der Tiereinrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin gehalten. Jegliches tierexperimentelle Vorgehen erfolgte unter Einhaltung der geltenden Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Tiertötungen und Tierversuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (Berlin) (O 0369/09; G 0371/05 und G 0183/07) genehmigt.

2.2.2.1 Generierung stabiler gemischter Knochenmarkschimäre

Sieben bis neun Wochen alte C57Bl/6 Wt-Mäuse (CD45.1⁺) wurden letal bestrahlt (9,25 Gy) und das hämatopoetische Kompartiment anhand intravenöser Injektion mit $2-3 \times 10^7$ Knochenmarkszellen rekonstituiert. Die Knochenmarkszellen wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 2.2.1.1.3) von acht bis zwölf Wochen alten Wt-RFP (CD45.2⁺) sowie entweder CXCR5 KO (CD45.2⁺) oder CXCR5 CXCR3 KO (CD45.2⁺) Mäusen gewonnen und im Verhältnis 1:1 miteinander kombiniert. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte 10-14 Wochen nach Transfer.

2.2.2.2 Gewichtsermittlung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden vor jeder Behandlung mit DSS sowie 1-2x täglich während jedes Versuchstages unter DSS-Exposition gewogen. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse an der Schwanzspitze gegriffen, in ein Becherglas überführt und anschließend auf einer Tischwaage gewogen.

2.2.2.3 Induktion einer DSS-vermittelten Kolitis

Zur Induktion einer akuten chemischen Kolitis erfolgte die Applikation von 3% Dextran-Natriumsulfat (DSS) im Trinkwasser. Dazu wurden 7,5 g DSS mit 250 ml Leitungswasser vermischt und unter ständigem Rühren gelöst. Das mit DSS-angereicherte Trinkwasser erhielten die Tiere aller Versuchsgruppen für 5-7 Tage. Ab einem Gewichtsverlust von $\times 20\%$ wurden die Tiere getötet.

2.2.2.4 Intraperitoneales Priming

Gesamtsplenozyten (CD45.2⁺) wurden wie zuvor beschrieben gewonnen (Kapitel 2.2.1.1.1) und die Zellzahl anschließend mittels manueller Zählung an der Neubauer-Zählkammer bestimmt (Kapitel 2.2.1.1.5). $1 \times 10^8/\mu\text{l}$ Splenozyten wurden daraufhin pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 300 μl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde den Mäusen (CD45.1⁺) intraperitoneal injiziert. Nach erfolgtem Priming konnten die Zellen durch Peritoneallavage zurückgewonnen werden.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Das Kolon der Versuchstiere wurde frisch entnommen, in 1 cm lange Stücke zerteilt, von Kot befreit und zusätzlich in PBS gespült. Anschließend wurden die Gewebsstücke in 15 ml Röhrchen in Histofix (4%ige säurefreie, phosphatgepufferte Formaldehydlösung) für mindestens 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entwässerung der Darmstücke mit Alkoholhaltigen-Lösungen aufsteigender Konzentration (30%, 50 %, 70%, 80 %, 90%, 100%) für je eine Stunde. Nach Austauschen der 100%igen Ethanollösungen und Inkubation für 30 Minuten in frischem Ethanol, wurden die Stücke zur Entfernung des Alkohols für eine Stunde in Toluol geschwenkt, welches anschließend durch frisches ersetzt und nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation entfernt wurde. Die Präparate wurden nun in 60°C heißes Paraffin überführt, wobei dieses nach ca. 15 Stunden ausgetauscht wurde, um potentielle Toluol-Reste zu entfernen. Nach 3-4 Stunden erfolgte ein dritter Wechsel des mit Toluol kontaminierten Paraffins, worin die Präparate für weitere 2-3 Stunden verblieben. Abschließend konnten die Stücke in Paraffin gegossen und bei RT gelagert werden. Nach vollständiger Aushärtung wurden mittels Mikrotom 5 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt, welche auf beschichtete Objektträger gezogen und anschließend für mehrere Stunden bei 37°C getrocknet wurden.

2.2.3.2 Anfertigung von Übersichtsfärbungen mittels H&E

Die angefertigten Gewebsschnitte wurden mit Hilfe eines Färbeautomaten (Microm international) mit Hämatoxylin und Eosin (H&E-Färbung) eingefärbt. Die H&E-Färbung dient im mikroskopischen Bild zur Unterscheidung verschiedener geweblicher Strukturen und zählt zu den Standardverfahren in der Entwicklung von Übersichtsfärbungen. Hämatoxylin ist selbst positiv geladen und bindet entsprechend negativ geladene Zellkerne, Desoxyribonukleinsäuren (DNA) sowie an die Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Eosin ist hingegen negativ geladen und bindet an positiv geladene Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum, Kollagen und Keratin [112]. Für die praktische Anwendung bedeutete dies, dass die Gewebsschnitte zunächst zwei Mal für 2 min in Xylol, für 2 min in 100 %-igem Ethanol, für je 1 min in 96 %-, 80 %- und 70 %-igem Ethanol rehydriert und anschließend in Leitungswasser gespült wurden. Es folgte die Färbung mit Hämatoxylin-Lösung (Dako) für 3 min. Die Schnitte wurden daraufhin für 10 min in Leitungswasser gebläut und anschließend in Eosin G-Lösung (Merck) überführt, worin sie für 10 min belassen wurden. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser wurden die Schnitte mittels Inkubation in 80 %-, 96 %-, 100 %-igem Ethanol

für jeweils eine Minute und Xylol für zwei Minuten dehydriert. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die Beschichtung mit Entellan und Eindeckung mit einem Deckgläschen.

Eosin-Lösung: 150 ml 0,5 %-ige Eosin G-Lösung, 30 ml 1 M HAc, 120 ml H₂O

2.2.3.3 Histologische Begutachtung und Krankheitsscore

Zur Bestimmung des Krankheitsgrades mit DSS behandelte Tiere erfolgte die Evaluierung anhand eines Krankheitsscores. Grundlage dessen war die histologische Begutachtung des Kolons unter Beurteilung der Schwere und Ausdehnung entzündlicher Zellinfiltrate sowie die Erfassung epithelialer und mukosaler Architekturstörungen. Dies erfolgte mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Christoph Loddenkemper (damals Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin). Anhand der erhobenen Befunde konnte ein Score (0-6 Punkte) errechnet werden. Dieser beruhte auf den Veröffentlichungen von Erben und Kollegen [113].

2.2.4 Statistik

Die Daten wurden als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler angegeben und mittels der Software GraphPad Prism Version 5.0 statistisch ausgewertet. Zum Vergleich der Überlebensverteilung zweier Versuchsgruppen erfolgte eine Analyse mittels Mantel-Cox Test. Experimente deren Ergebnisse im Vergleich verschiedener Versuchstiere eine große Streuung aufwiesen, wurden nach vorheriger Testung auf Normalverteilung je nach Ergebnis mittels One Sample t-Test oder Wilcoxon Signed-Rank Test ausgewertet (Abb. 8A). Alle Übrigen Analysen erfolgten wie anhand des in Abb. 8B dargestellten Flussdiagramms, wobei standardmäßig eine zweiseitige Testung vorgenommen wurde. Ein Signifikanzwert von $P < 0.05$ wurde als obere Grenze zur statistischen Signifikanz definiert.

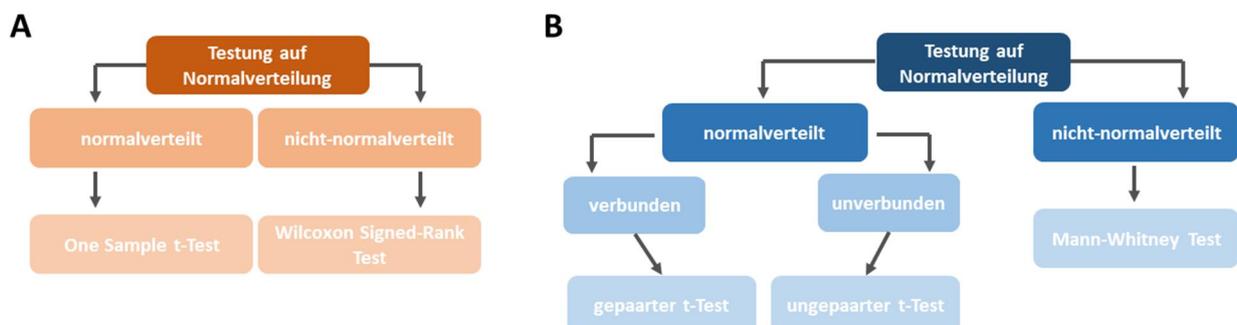


Abb. 8: Flussdiagramme zur Zuordnung statistischer Test

3. ERGEBNISSE

3.1 Bedeutung der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CXCR3 für die organspezifische Rekrutierung von $\gamma\delta$ T-Zellen während einer akuten Kolitis

3.1.1 CXCR5 Knock Out-Mäuse zeigen eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber einer akuten DSS-Kolitis

Der Chemokinrezeptor CXCR5 übernimmt im Menschen wie in der Maus wichtige Funktionen in der Regulation von Immunantworten, welche den gesamten Organismus betreffen können. Neben seiner Funktion in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Organe, ist er auch für die Rezirkulation von Lymphozyten durch die peripheren Gewebe von Bedeutung [7]. Der Austritt von Immunzellen aus dem Blutstrom in die intestinale Mukosa ist ebenfalls ein chemokinabhängiger Prozess [114]. Im Mausmodell konnte der Einfluss von CXCR5 auf die Ausbildung ektooper Lymphfollikel und den Verlauf einer chronischen Gastritis bereits näher charakterisiert werden [78]. Es wurde daher vermutet, dass CXCR5 auch für die Einwanderung von Immunzellen in das Kolon von Bedeutung sein könnte. Indirekt könnte CXCR5 auch den Verlauf einer durch DSS-Exposition vermittelten Kolitis durch seine Funktion in der Aufrechterhaltung funktioneller lymphatischer Strukturen während einer akuten Entzündung beeinflussen.

Als Ausgangspunkt dieser wissenschaftlichen Arbeit diente daher die Induktion einer akuten DSS-Kolitis in Wildtyp- (Wt) sowie CXCR5 KO-Mäusen. Nach Applikation von 3% DSS im Trinkwasser über sieben Tage entwickelten alle Tiere eine akute Entzündung des Kolons. Während sich 80 % der Wt-Tiere nach DSS-Entzug erholten, mussten sämtliche KO-Tiere vier bis acht Tage nach DSS-Applikation aufgrund eines Gewichtsverlustes von $\times 20\%$ sowie blutigen Diarrhoen getötet werden (Abb. 9A). Als weitere Parameter zur Beurteilung des klinischen Zustandes der Tiere dienten tägliche Gewichtskontrollen sowie die makroskopische Beurteilung von Kotbeschaffenheit und Fellstruktur (nicht gezeigte Daten). Die histologische Beurteilung des intestinalen Gewebes erfolgte nach Aufarbeitung der Tiere. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Christoph Loddenkemper (damals Charité ó Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin). Die histopathologische Untersuchung erfolgte anhand der Kolonpräparate von Wt- und KO-Tieren, welche nach Paraffineinbettung in 5 μm dünne Schnitte überführt und mittels Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt wurden (Vgl. Kapitel 2.2.3.2).

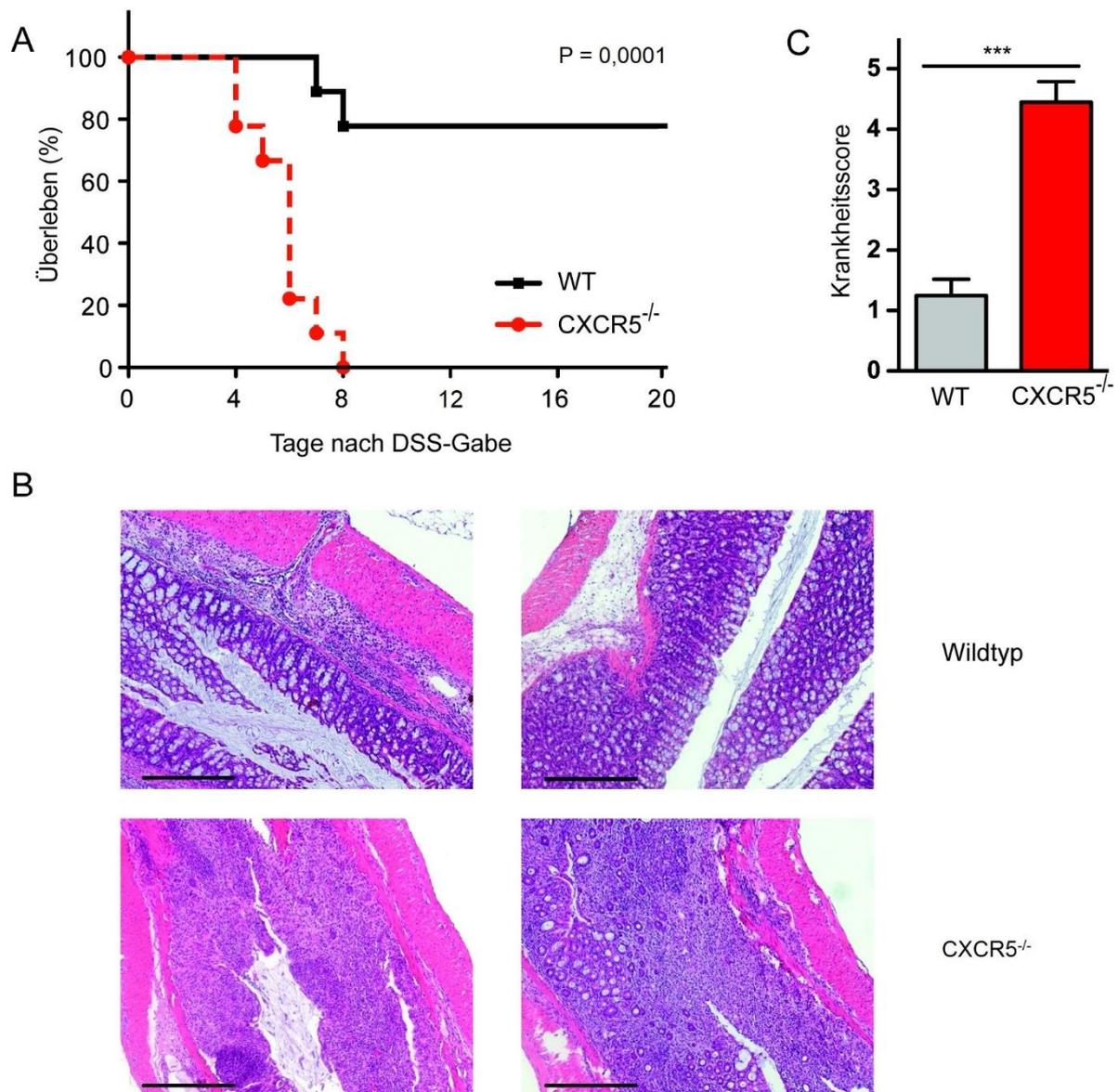


Abb. 9: Höhere Empfindlichkeit von CXCR5^{-/-} Mäusen bei einer akuten DSS-Kolitis im Vergleich zu Wt-Mäusen.

(A) Wt (n=8) und CXCR5^{-/-} Mäuse (n=10) wurden in einem akuten chemisch-induzierten Kolitis-Modell für sieben Tage mit 3% DSS im Trinkwasser behandelt. Die Grafik erfasst das Überleben der Versuchsgruppen in Prozent nach DSS-Entzug in zwei unabhängigen Versuchen. Tiere mit einem Gewichtsverlust von $\times 20\%$ wurden getötet. $P=0,0001$; Mantel-Cox Test. (B) In Paraffin eingebettete Kolonpräparate von Wt (Tag 10-20 nach Induktion) und KO-Mäusen (Tag 5-8 nach Induktion) wurden 5 μm dünn geschnitten, mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und mikroskopisch beurteilt. Vergrößerung: $\times 100$. Maßstabsbalken: 200 μm . (C) Es erfolgte die Zuordnung der Wildtyp (n=8) und CXCR5^{-/-} Mäuse (n=10) zu einem Krankheitsscore (0-6, [113]), bestehend aus Schwere und Ausdehnung entzündlicher Zellinfiltrate sowie Störungen der epithelialen und mukosalen Architektur, $P<0,001$; Mann-Whitney Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel \pm SEM.

Die mikroskopische Auswertung zeigte im Fall der KO-Tiere vier bis acht Tage nach DSS-Entzug deutliche Anzeichen einer Inflammation mit entzündlichen Zellinfiltraten, einem Verlust von Epithelzellen sowie einer verringerten Anzahl von Becherzellen (Abb. 9B). Die mikroskopischen Parameter wurden in einem Krankheitsscore zusammengefasst [113]. Für die KO-Tiere ließen sich signifikant höhere Werte feststellen, gleichbedeutend mit einer höheren Vulnerabilität gegenüber DSS-Exposition (Abb. 9C). Der schwerwiegendere Krankheitsverlauf der KO-Tiere im Versuch konnte somit als elongierte Entzündungsreaktion im Rahmen der chemisch-induzierten Kolitis und einer insuffizienten Regeneration nach DSS-Entzug im Vergleich zu den Wt-Tieren gewertet werden.

3.1.2 Verringerte Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon von CXCR5^{-/-} Mäusen

In Kenntnis des CXCR5 KOPhänotyps während einer akuten Kolitis wurde weiter hypothetisiert, dass die CXCR5-abhängige Rekrutierung von Lymphozyten in das entzündete Kolon auch für Zellpopulationen relevant sein könnte, welche für ihre regenerativen Kapazitäten in der Heilung verletzter oder entzündeter Gewebe bekannt sind. Im Kolon sind hierfür die $\gamma\delta$ T-Zellen von besonderer Bedeutung. Sie sind in epithelialen Geweben stark angereichert und somit an vorderster Front um Immunantworten generieren und regulieren zu können. Im Speziellen bedeutet dies die Produktion von Wachstumsfaktoren wie KGF-1 und KGF-2, zur Stimulierung epithelialer Reparaturvorgänge sowie die Bindung von Antigenen ohne vorherige Prozessierung durch APCs und folglich rascher Generierung von lokalen Immunantworten [34, 45].

Zur Klärung des gravierenden Unterschiedes in der Entzündungsintensität von Wt-Mäusen gegenüber CXCR5 KO-Mäusen bei einer akuten Entzündung entwickelte sich die Fragestellung, ob eine mangelnde Präsenz von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon als Erklärungsansatz des beschriebenen Phänotyps herangezogen werden könnte. Hierzu wurde das Kolon beider Mausstämmen unter homöostatischen wie entzündlichen Bedingungen entnommen, um aus dem Gesamtlisat die IEL zu isolieren (Vgl. Kap. 2.2.1.1.5). Die Kolitisinduktion erfolgte durch Gabe von 3% DSS im Trinkwasser für sieben Tage. Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte daraufhin der prozentuale Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten IEL von Wt und CXCR5 KO-Tieren erfasst und vergleichend gegenübergestellt werden (Vgl. Kap. 2.2.1.2.3). Sowohl unter homöostatischen (Abb. 10A), als auch unter entzündlichen Bedingungen (Abb. 10B) zeigte sich eine deutlich verringerte Frequenz von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon der KO-Tiere.

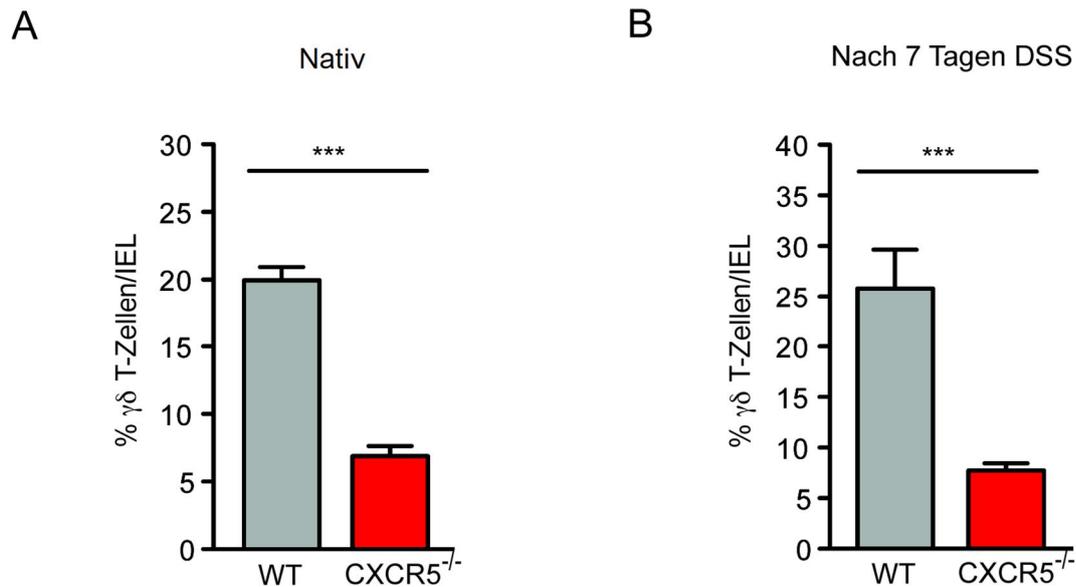


Abb. 10: CXCR5^{-/-} Mäuse zeigen eine verringerte Frequenz von intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon verglichen zu Wt-Mäusen unter homöostatischen wie auch akut-entzündlichen Bedingungen. Gating-Strategie in Kapitel 2.2.1.2.3. beschrieben. **(A)** Prozentuale Erfassung der $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten intraepithelialen Lymphozyten (IEL) im Kolon vor DSS-Gabe (je n=9). P < 0,001; ungepaarter t-Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM. **(B)** Prozentuale Erfassung der $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten IEL im Kolon an Tag 7 der DSS-Gabe (je n=6). P<0,001; ungepaarter t-Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

3.1.3 Mausmodell zur Generierung stabiler gemischter Knochenmarkschimäre

Wie bereits beschrieben, führt CXCR5 KO im Mausmodell zu einer Beeinträchtigung der Architektur der SLOs, einhergehend mit fehlenden peripheren Lymphknoten, einer reduzierten Anzahl von PPs sowie einer gestörten Organisation primärer splenischer Lymphfollikel [7]. Auch die Entwicklung der CPs des Kolons geschieht in Abhängigkeit des CXCR5-Liganden CXCL13 [11]. Um zu eruieren, ob ein genereller Entwicklungsdefekt des lymphatischen Gewebes ursächlich für den beobachteten Phänotyp und den Mangel an $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon der CXCR5 KO-Mäuse war, wurde ein Mausmodell entwickelt, in welchem das Verhalten von CXCR5 KO und Wt-Zellen gemeinsam in einem Organismus beobachtet werden konnte. Hierzu wurden sieben bis neun Wochen alte kongene Mäuse (CD45.1⁺) letal bestrahlt (9,25 Gy). Bei CD45 handelt es sich um ein transmembranäres Protein, welches ubiquitär auf sämtlichen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen und somit auch auf allen Leukozyten exprimiert wird [115]. Aufgrund des Vorliegens zweier alleler Varianten (CD45.1 und CD45.2), welche sich durchflusszytometrisch differenzieren lassen, wird es routinemäßig zur Abgrenzung von Zellpopulationen in murinen Experimenten mit Knochenmarkszelltransfer verwendet [116]. Die Rekonstitution erfolgte mittels intravenöser Injektion von gemischten Knochenmarkszellen in die murine Schwanzvene, welche aus den Femuren und Tibiae von Wt-RFP (*red fluorescent protein*)

(CD45.2⁺) oder CXCR5 KO Tieren (CD45.2⁺) gewonnen und anschließend zu gleichen Anteilen vermischt wurden (Abb. 11). Auf diese Weise konnten die transferierten Zellen mittels immunfluoreszierender Färbung gegen CD45.2⁺ von den Zellen des Empfängerorganismus abgegrenzt werden.

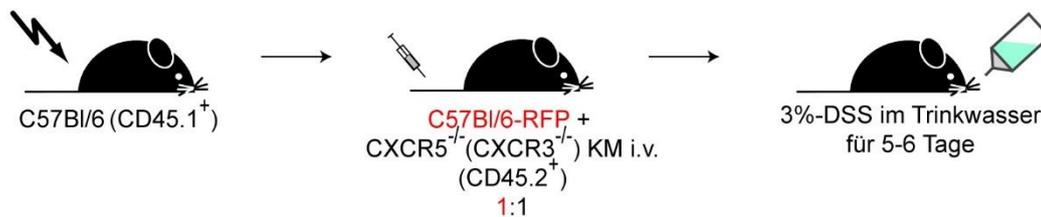


Abb. 11: Mausmodell zur Generierung stabiler gemischter Knochenmarkschimäre

Sieben bis neun Wochen alte kongene C57Bl/6 Mäuse (CD45.1⁺) wurden letal (9,25 Gy) bestrahlt. Anschließend erfolgte die intravenöse Injektion von 2-3 x 10⁷ gemischten Knochenmarkszellen von acht bis zwölf Wochen alten C57Bl/6-RFP und CXCR5^{-/-} bzw. CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} (CD45.2⁺) Mäusen. Nach 10-14 Wochen erfolgte die Gabe von 3% DSS im Trinkwasser für fünf bis sechs Tage zur Generierung einer akuten Kolitis.

Zusätzlich wurde für diesen Versuchsaufbau der inflammatorische Chemokinrezeptor CXCR3 in die Beobachtungen mit einbezogen. Es ist bekannt, dass CXCR3 und seine Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 an einer Vielzahl entzündlicher Prozesse beteiligt sind und unter anderem eine proinflammatorische Komponente in der Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen darstellen [53]. Die Hochregulation von CXCR3, welche im Rahmen einer akuten Entzündung stattfindet, ermöglicht einer Vielzahl von CD4⁺ wie CD8⁺ Lymphozyten den Übertritt aus dem Blutstrom in die Epithelien von Dünn- wie Dickdarm sowie in die Lamina propria [60, 64]. Bisherige Arbeiten konnten eine verminderte Empfindlichkeit von CXCR3^{-/-}-Mäusen gegenüber DSS-Exposition nachweisen [53]. Zur Bedeutung von CXCR3 hinsichtlich der intraepithelialen Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen existieren jedoch keine Daten. Daher erfolgte die Generierung einer zweiten Versuchsgruppe, welche Tiere beinhaltete, die mit gemischtem Knochenmark von Wt-RFP (CD45.2⁺) und CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-}DKO (*double knock-out*) Mäusen (CD45.2⁺) rekonstituiert wurden. Hierzu wurde erneut das Knochenmark von Wt-RFP (CD45.2⁺) sowie CXCR5^{-/-} und CXCR3^{-/-} (CD45.2⁺) Mäusen gewonnen. Das Knochenmark wurde zu gleichen Anteilen vermischt (50% Wt, 50% KO) und anschließend in zuvor letal bestrahlte C57Bl/6 (CD45.1⁺) Rezipienten transferiert. 10-14 Wochen nach Knochenmarkstransplantation erfolgte die Aufarbeitung der nativen Tiere oder die vorherige Gabe von 3% DSS im Trinkwasser für fünf bis sechs Tage zur Induktion einer akuten Kolitis mit anschließender Präparation (Abb. 11).

3.1.3.1 Reduzierte intraepitheliale Anreicherung von CXCR5^{-/-} γδ T-Zellen und CXCR5^{-/-} CXCR3^{-/-} γδ T-Zellen unter homöostatischen Bedingungen

Es erfolgte zunächst die Aufarbeitung der unbehandelten knochenmarkschimären Tiere mittels Entnahme des Kolons und Isolation der IEL (Vgl. Kapitel 2.2.1.1.5). Die Donorzellen konnten durchflusszytometrisch mittels immunhistochemischer Färbung gegen CD45.2 detektiert werden. Eine Unterscheidung in Wt und KO Zellen war aufgrund einer Integration von RFP in das Wt-Genom möglich, welches sich im PE-Kanal des Durchflusszytometers nachweisen lässt. Eine repräsentative *Gating*-Strategie ist in Abb. 12 dargestellt.

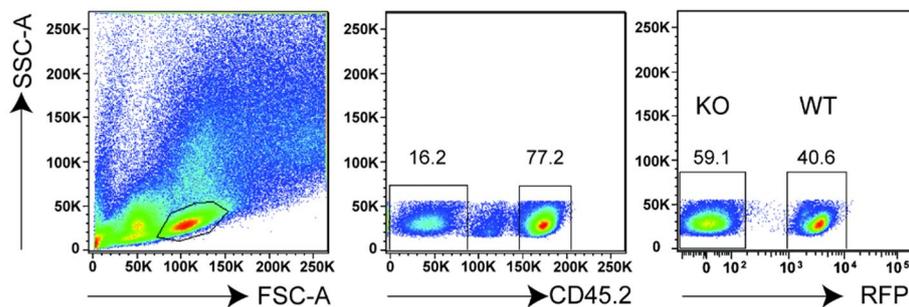


Abb. 12: Repräsentative *Gating*-Strategie zur Differenzierung von Wt und CXCR5^{-/-} Zellen des Kolons in stabilen gemischten Knochenmarkschimären

Mittels SSC und FSC wurden die Lymphozyten an den gesamten IEL identifiziert. Die CD45.2 positiven Zellen konnten im zweiten Schritt als die während der Knochenmarksrekonstitution injizierte Zellen definiert werden. Mit Hilfe des PE-Kanals des Durchflusszytometers, welcher ebenfalls rot-fluoreszierende Zellen erkennt, wurden die mit RFP-markierten Wt Zellen von den nicht RFP-markierten CXCR5^{-/-} unterschieden. KO = *knock-out*. WT = Wildtyp.

Mittels fluoreszierender Antikörper gegen CD3 und den γδ-TCR konnte der prozentuale Anteil der γδ T-Zellen an den gesamten IEL definiert werden. Unter homöostatischen Bedingungen konnte ein prozentual verringerter Anteil von CXCR5^{-/-} γδ T-Zellen wie auch CXCR5^{-/-} CXCR3^{-/-} γδ T-Zellen im Kolon nachgewiesen werden (Abb. 13A-B). Der CXCR3 KO schien unter nicht-entzündlichen Bedingungen hier jedoch von wenig zusätzlicher Relevanz gewesen zu sein, was in der vorrangig inflammatorischen Funktion des Chemokinrezeptors zu begründen ist. Eine statistische Testung erfolgte aufgrund der sehr geringen Fallzahlen nur teilweise, weswegen die dargelegten Ergebnisse eher als Tendenz im Kontext der aufgestellten Hypothese zu sehen sind.

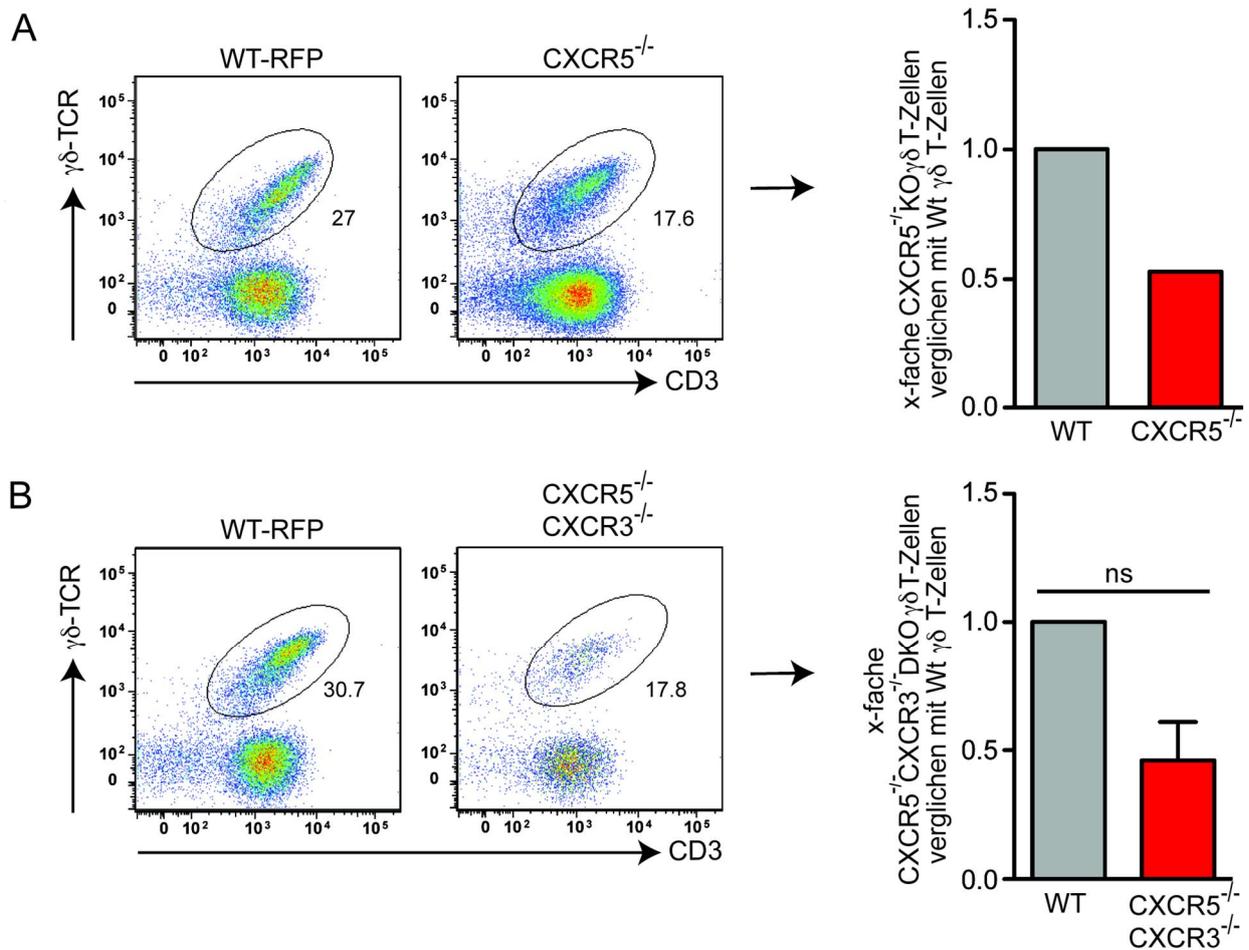


Abb. 13: CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen und CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraepitheliale Anreicherung unter homöostatischen Bedingungen

(A) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des Einzel-KO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt IEL wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-} IEL wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=2). Keine statistische Testung erfolgt. (B) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des DKO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt IEL wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} IEL wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=3). P=0,07; One Sample t-Test. ns = nicht signifikant. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

3.1.3.2 Verminderte intraepitheliale Anreicherung von CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen sowie CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen während einer akuten Kolitis

Der unter 3.1.3.2 erläuterte Versuchsaufbau wurde im nächsten Schritt unter inflammatorischen Konditionen durchgeführt. Nach Induktion einer akuten Kolitis mittels DSS-Gabe für fünf bis sechs Tage erfolgte die Aufarbeitung der Tiere mit Entnahme des Kolons und der anschließenden

Isolation der IEL (Vgl. Kapitel 2.2.1.1.5). Die durchflusszytometrische Darstellung und Abgrenzung der $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten IEL erfolgte wie zuvor beschrieben.

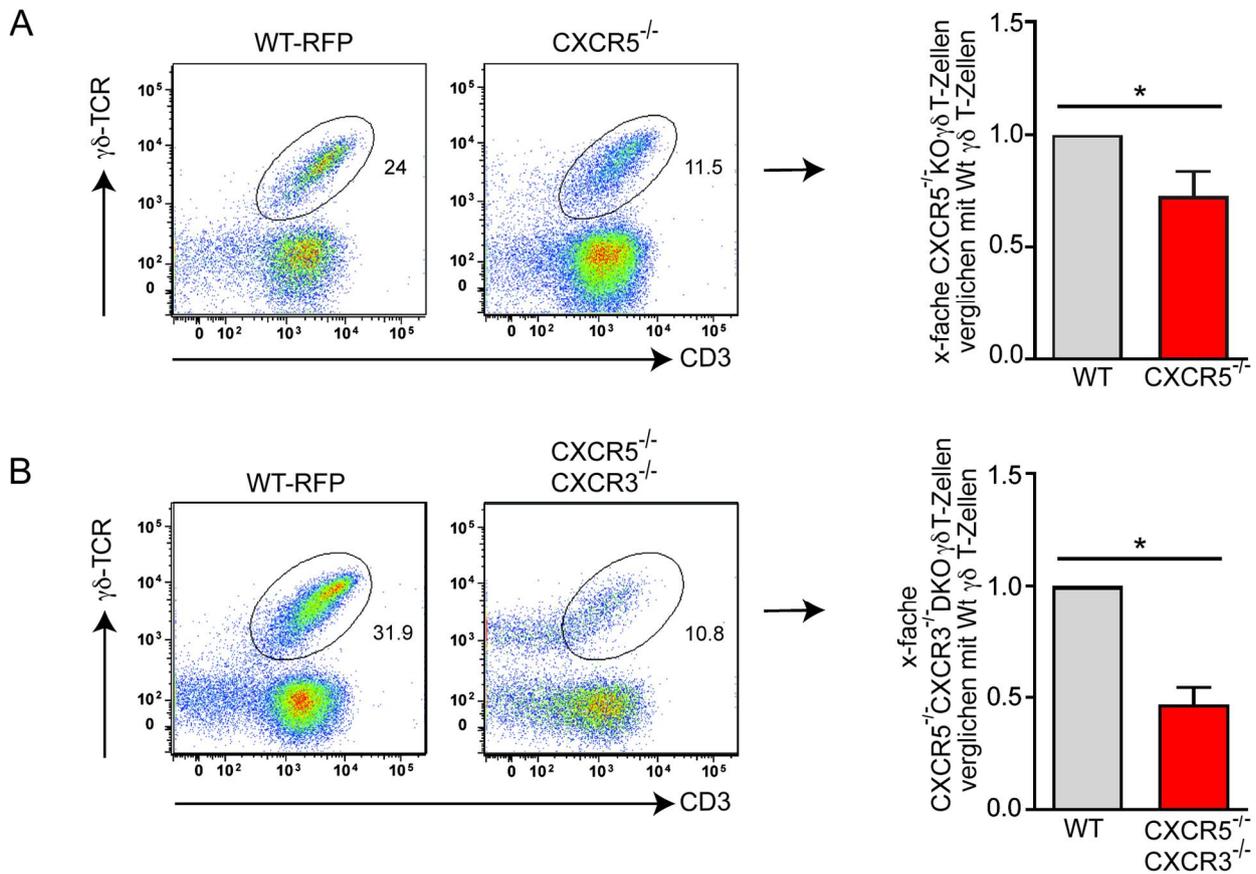


Abb. 14: CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen und CXCR5^{-/-} CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraepitheliale Anreicherung während einer akuten Kolitis im Vergleich zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen

(A) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des Einzel-KO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt IEL wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-} IEL wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=7). P=0,02; Wilcoxon Signed-Rank Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM. (B) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des DKO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt IEL wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-} CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-} CXCR3^{-/-} IEL wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=7). P=0,02; Wilcoxon Signed-Rank Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

Unter entzündlichen Bedingungen konnte auch in diesem Modell ein prozentual verringerter Anteil von CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon nachgewiesen werden (Abb. 14A). Das Ergebnis konnte in einem zweiten unabhängigen Experiment bestätigt werden (nicht gezeigte Daten). Eine noch stärkere Reduktion der intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen konnte bei Tieren beobachtet werden, welche CXCR5-CXCR3-defiziente Knochenmarkszellen erhalten hatten (Abb. 14B), was in der

zumindest partiellen Abhängigkeit von zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Lymphozyten begründet zu sein schien, für die Einwanderung in das entzündete Epithel des Kolons CXCR3 zu benötigen. Dieser Zusammenhang wurde in der aktuellen Literatur für CD4⁺ T-Zellen bereits beschrieben [117]. Für die CXCR3-abhängige intraepitheliale Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen existierten bislang keine Daten.

3.1.3.3 CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen keine, CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung unter homöostatischen Konditionen verglichen zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Zirkulation von Lymphozyten durch sekundäre lymphatische Organe führt nach Antigenerkennung und Aktivierung zur Invasion ihrer Zielgewebe. Je nach Aktivierungsort erlangen die naiven Zellen strukturelle und funktionelle Kapazitäten, um diese Zielorgane zu erreichen. Hierbei spielen Chemokinrezeptoren, aber auch Selektine und Integrine eine entscheidende Rolle. Nach Aktivierung von B-Lymphozyten in den peripheren Lymphknoten exprimieren diese beispielsweise andere *Homing*moleküle (CXCR3, CXCR4, P-Selektin) als B-Lymphozyten, welche in den PPs der intestinalen Mukosa aktiviert wurden (CCR9, $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin). Dieses *Priming* erfolgt nicht nur in den klassischen SLOs, sondern auch in der Peritonealhöhle. So ist bekannt, dass der Aufenthalt spezifischer B-Lymphozyten (B1-Zellen) in der Peritonealhöhle Plasmazellen generiert, welche $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin exprimieren und zur IgA-Sekretion befähigt werden. Dies ermöglicht ihnen eine effizientere Invasion der Dünndarmmukosa und damit die Modulation intestinaler Immunantworten [20]. Die Migration von B-Lymphozyten in die Peritonealhöhle ist hierbei ein CXCR5-abhängiger Prozess, so dass CXCR5-Defizienz eine verminderte peritoneale Anreicherung dieser Zellen zur Folge hat [7]. Anhand von CXCR5 KO-Mäusen konnte selbiges unter homöostatischen Bedingungen auch für CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden [4]. Die Auswirkungen einer akuten Kolitis wurden in diesem Zusammenhang bislang nicht untersucht. In Kenntnis des peritonealen *Primings* der B1-Zellen stellte sich somit die Frage, ob dies auch für die das Kolon invadierende $\gamma\delta$ T-Zellen stattfindet und eine CXCR5-Defizienz mit folglich verminderter Anreicherung im Peritoneum dazu führt, dass relevante Differenzierungsschritte unterbleiben, welche für das *Homing* in das intestinale Epithel vonnöten sind. Diese Hypothese diente als Erklärungsansatz für den deutlich schwereren Krankheitsverlauf der CXCR5^{-/-} KO Tiere während einer akuten Kolitis wie zuvor beschrieben. Die Bedeutung von CXCR3 war in diesem Kontext unklar. Weiterhin

bezogen sich frühere Publikationen lediglich auf Inflammationen im Dünndarm, während in diesem Versuchsaufbau die akute Kolitis im Mittelpunkt des Interesses stand.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Wt und KO $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Lymphozyten im Peritoneum unter homöostatischen Konditionen. Die Gewinnung der gesamten intraperitonealen Lymphozyten erfolgte mittels Peritoneallavage (2.2.1.1.4). Die Abgrenzung der Donorzellen im Empfängerorganismus sowie die Differenzierung der Wt-Zellen von den KO-Zellen erfolgte anhand der in Abb. 15 dargestellten *Gating*-Strategie.

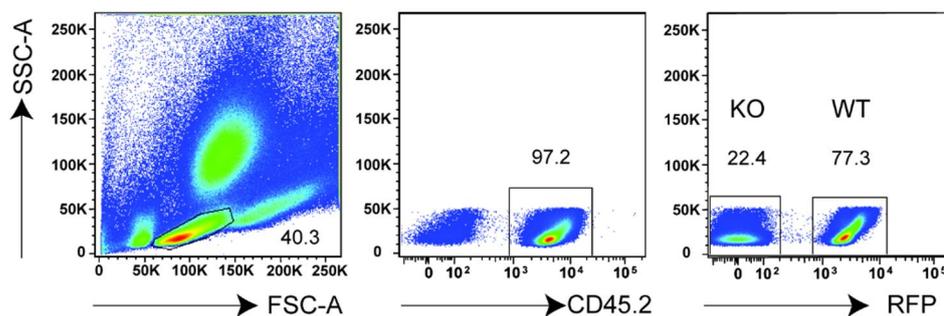


Abb. 15: Repräsentative *Gating*-Strategie zur Differenzierung von Wt und CXCR5^{-/-} Zellen des Peritoneums in stabilen gemischten Knochenmarkschimären

Mittels SSC und FSC wurden die Lymphozyten an den gesamten peritonealen Zellen identifiziert. Die CD45.2 positiven Zellen konnten im zweiten Schritt als die während der Knochenmarksrekonstitution injizierten Zellen definiert werden. Mit Hilfe des PE-Kanals des Durchflusszytometers, welcher ebenfalls rot-fluoreszierende Zellen erkennt, wurden die mit RFP-markierten Wt Zellen von den nicht RFP-markierten CXCR5^{-/-} unterschieden. KO = *knock-out*. WT = Wildtyp.

Die Analyse der peritonealen CD45.2⁺ Lymphozyten zeigte eine Minderanreicherung der CXCR5^{-/-} Zellen im Vergleich zu den Wt-Zellen (22.4 % vs. 77.3 %). Diese war jedoch nicht in einem inhomogenen Verhältnis der zur Knochenmarksrekonstitution injizierten Zellsuspensionen zu begründen. Stattdessen kann postuliert werden, dass für einige Lymphozytensubpopulationen CXCR5-abhängige Migrationsrouten in das Peritoneum bestehen.

Die Darstellung der $\gamma\delta$ T-Zellen erfolgte mittels immunfluoreszierender Färbung gegen CD3 sowie den $\gamma\delta$ -TCR, mit anschließender durchflusszytometrischer Darstellung (15A-B). Unter homöostatischen Bedingungen konnte im Modell knochenmarkschimärer Mäuse keine überzeugende Reduktion bezüglich der peritonealen Anreicherung von CXCR5^{-/-} T-Zellen im Vergleich zu den Wt-Zellen nachgewiesen werden. Hingegen konnten für die CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-}

T-Zellen verminderte Frequenzen im Peritoneum verglichen zu den Wt Zellen festgestellt werden. Aufgrund teils sehr geringer Tierzahlen, welche ursächlich in der Komplexität der

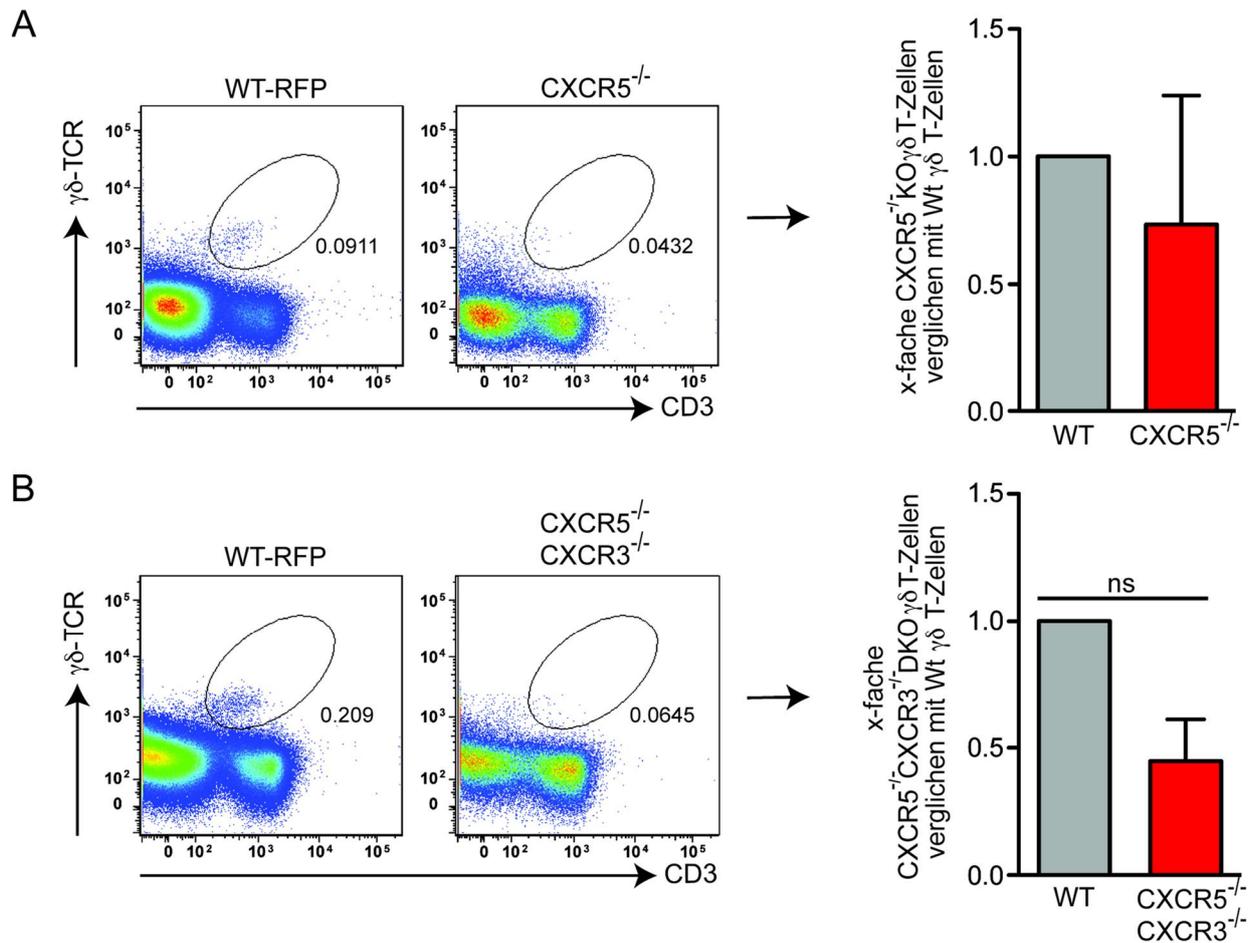


Abb. 16: CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen keine, CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung unter homöostatischen Bedingungen

(A) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des Einzel-KO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt Zellen des Peritoneums wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-} Zellen des Peritoneums wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=2). Keine statistische Testung erfolgt. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

(B) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des DKO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt Zellen des Peritoneums wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} Zellen des Peritoneums wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=3). P=0,08; One Sample t-Test. ns = nicht signifikant. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

Generierung der Versuchstiere zu sehen war, erfolgte nur teilweise eine statistische Testung, weswegen trotz der sichtbaren Tendenz noch keine Signifikanz der Ergebnisse erzielt werden konnte (Abb. 16A-B).

3.1.3.4 CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen, jedoch nicht CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen, zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung unter inflammatorischen Konditionen verglichen zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen

Um das zelluläre Verteilungsmuster der Wt gegenüber den KO $\gamma\delta$ T-Zellen unter inflammatorischen Konditionen untersuchen zu können, wurde eine akute DSS-Kolitis wie zuvor beschrieben induziert. Der übrige Versuchsaufbau wurde wie in Kapitel 3.1.3.3. erläutert durchgeführt.

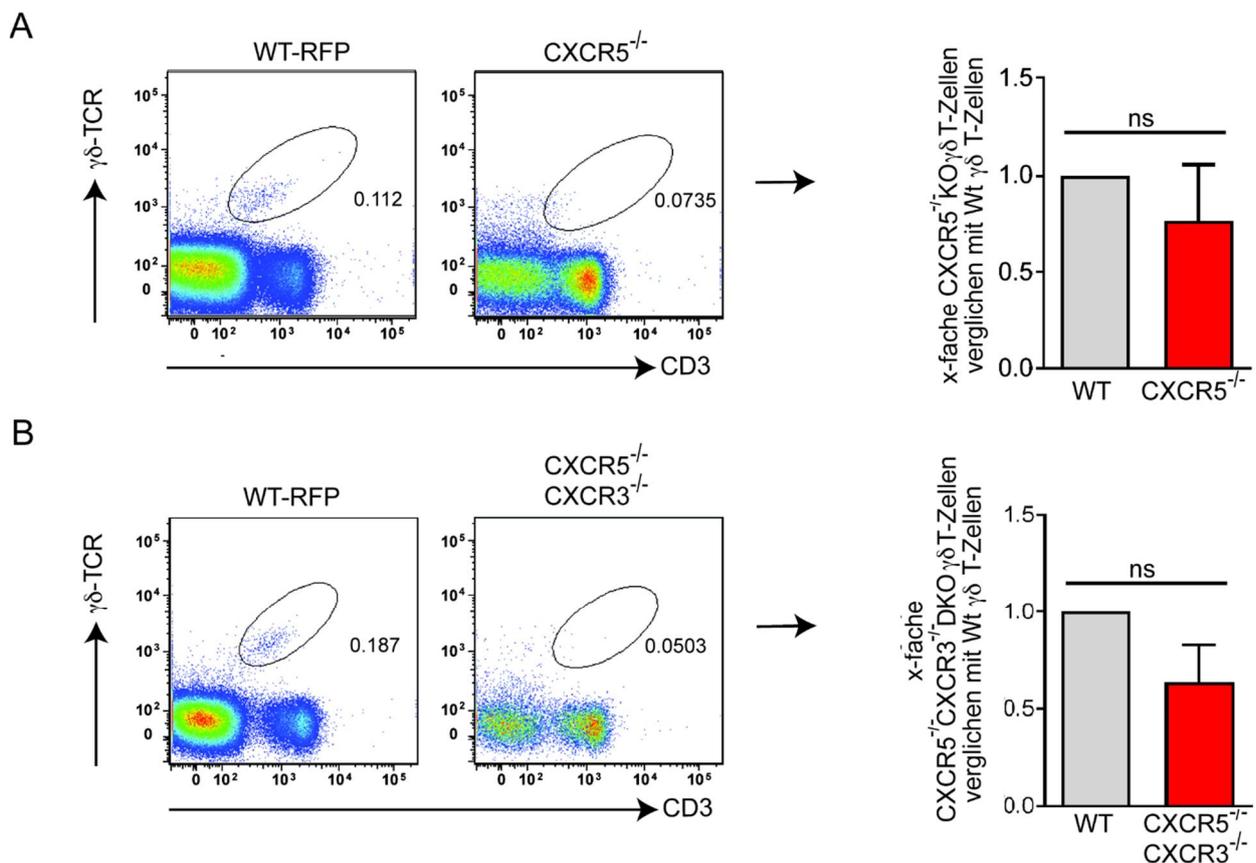


Abb. 17: CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} sowie CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen, zeigen eine reduzierte intraperitoneale Anreicherung während einer akuten Kolitis

(A) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des Einzel-KO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt Zellen des Peritoneums wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-} Zellen des Peritoneums wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=7). P=0,3; Wilcoxon Signed-Rank Test. ns = nicht signifikant. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM. (B) Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ mittels durchflusszytometrischer Analyse identifiziert. Darstellung repräsentativer Blots des DKO. Aus den Werten der prozentualen Anteile der Wt $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten Wt Zellen des Peritoneums wurde der Mittelwert bestimmt und gleich 1 gesetzt. Die Frequenzen der CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-} Zellen des Peritoneums wurden in Bezug auf den Wt-Mittelwert transformiert und als x-fach verringert oder erhöht gegenüber den Wt-Werten quantitativ dargestellt (n=6). P=0,12; One Sample t-Test. ns = nicht signifikant. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

Die Einzel-KO-Mäuse zeigten unter entzündlichen Bedingungen eine tendenziell verminderte Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Peritoneum, auch wenn hier keine statistische Signifikanz erzielt werden konnte (Abb. 17A). In einem zweiten, nicht abgebildeten Versuch ließ sich dieses Ergebnis aber nicht bestätigen. Anhand der DKO-Mäuse konnte hingegen eine verminderte intraperitoneale Anreicherung von $CXCR5^{-/-}CXCR3^{-/-}$ $\gamma\delta$ T-Zellen während einer akuten Kolitis nachgewiesen werden, was die unter homöostatischen Bedingungen gefundenen Ergebnisse somit unterstützte (Abb. 17B).

3.1.4 Rescue-Versuche von $\gamma\delta$ KO-Mäusen während akuter Dickdarmentzündungen

3.1.4.1 Rescue von $\gamma\delta$ KO-Mäusen mittels intravenöser Injektion von Wt $\gamma\delta$ T-Zellen

Die modulatorischen Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen im Rahmen einer akuten Kolitis sind unbestritten. Teils kontrovers diskutiert wurden jedoch immer wieder ihre sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Kapazitäten. So lassen sich in Gewebe und Blut von Patienten mit CED beispielsweise erhöhte Frequenzen von $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisen [118, 119]. Experimentell lässt sich weiterhin eine $\gamma\delta$ T-Zell-abhängige Induktion entzündlicher Darmerkrankungen in immunodefizienten Mäusen beobachten. Auf der anderen Seite lässt sich mit Hilfe diverser Modelle zur Erforschung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, äquivalent zum humanen Phänotyp in der Maus, eine Aggravierung akuter Kolitiden unter $\gamma\delta$ T-Zell-Defizienz oder Depletion nachweisen. Die verstärkte Entzündungsreaktion geht dabei mit einer erhöhten Mortalität der betreffenden Tiere einher [120]. In den zuvor beschriebenen Ergebnissen konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber DSS-induzierter Entzündung mit reduzierten Frequenzen von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon assoziiert ist.

Um die Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen im Rahmen einer akuten Inflammation nun weiter zu betrachten, wurde das phänotypische Verhalten von Wt-Mäusen und $\gamma\delta$ KO-Mäusen unter DSS-Applikation vergleichend betrachtet. $\gamma\delta$ KO-Mäuse verfügen entsprechend über keinerlei $\gamma\delta$ T-Zellen. Für eine dritte Versuchsgruppe wurden Lymphozyten aus Milzen von vier bis fünf Wt-Mäusen gewonnen und vermengt. Mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD3 und den $\gamma\delta$ -TCR konnten die Wt $\gamma\delta$ T-Zellen detektiert und anschließend mittels *fluorescence-activated cell sorting* von den übrigen Lymphozyten isoliert werden (Vgl. Kapitel 2.2.1.2.2). Fünf $\times 10^5$ Wt $\gamma\delta$ T-Zellen wurden nach vorheriger subletaler Bestrahlung von $\gamma\delta$ KO-Mäusen in die murine Schwanzvene injiziert. Die Bestrahlung war notwendig, um der vergleichsweise kleinen Zellpopulation Nischen zu schaffen, welche ihr funktionelles Überleben im Darm verbessern

sollten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden auch die Wt und $\gamma\delta$ KO-Mäuse ohne intravenöse Zellinjektion in äquivalenter Dosis bestrahlt.

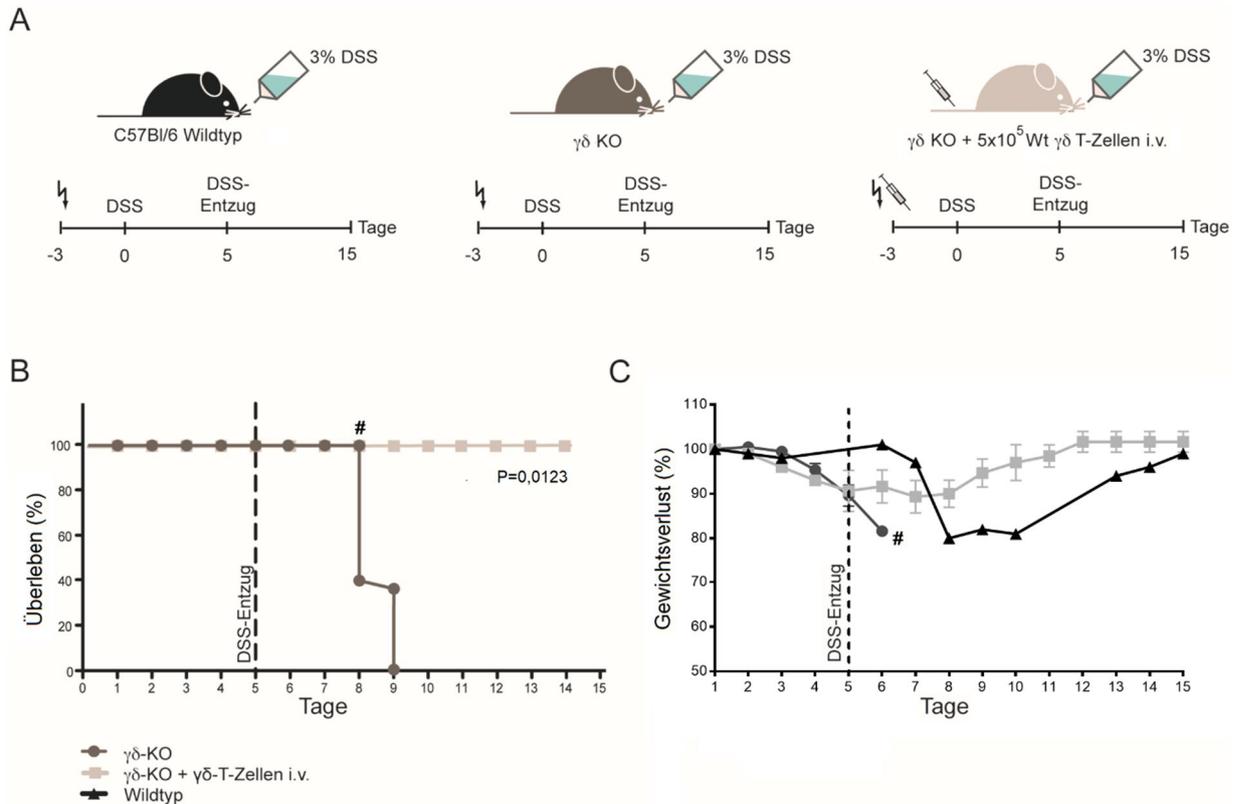


Abb. 18: Rescue von $\gamma\delta$ KO-Mäusen unter einer akuten DSS-Kolitis

(A) Wildtyp C57Bl/6 Mäuse, $\gamma\delta$ KO-Mäuse sowie $\gamma\delta$ KO-Mäuse denen 5×10^5 Wt $\gamma\delta$ T-Zellen i.v. injiziert wurden, wurden mit 3% DSS im Trinkwasser behandelt. Alle Tiere wurden 3 Tage zuvor subletal für 53 Sekunden mit 4,5 Gy bestrahlt. Anschließend erfolgte die i.v. Injektion von per FACS-Sorting gewonnenen $\gamma\delta$ T-Zellen in einer Versuchsgruppe mit $\gamma\delta$ KO-Mäusen. Tägliche Gewichts- und Stuhlkontrolle zur Feststellung der Krankheitsprogression wurden durchgeführt. Nach 5 Tagen erfolgte der DSS-Entzug sowie weiterhin tägliche Gewichts- und Stuhlkontrollen während der Regenerationsphase. (B) Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil überlebender $\gamma\delta$ KO-Mäuse (n=5) und $\gamma\delta$ KO-Mäusen + Wt $\gamma\delta$ T-Zellen i.v. (n=3) nach 14 Tagen. # entspricht dem Zeitpunkt, an welchem die Tiere einen Gewichtsverlust $\times 20\%$ aufwiesen und getötet wurden. P=0,0123; Mantel-Cox Test. (C) Abgebildet ist das Gewicht in Prozent (100% entspricht dem Ausgangsgewicht) von $\gamma\delta$ KO-Mäusen (n=5), $\gamma\delta$ KO-Mäusen mit Wt $\gamma\delta$ T-Zellen i.v. (n=3) sowie Wildtypen (n=1) als Kontrolle über 14 Tage. # entspricht dem Zeitpunkt, an welchem die Tiere einen Gewichtsverlust $\times 20\%$ aufwiesen und getötet wurden.

Dies erfolgte in allen drei Versuchsgruppen drei Tage vor DSS-Applikation. Nach DSS-Gabe über fünf Tage wurde das Regenerationsvermögen der drei Mausstämme beobachtet (Abb. 18A). Die Wildtypkontrolle zeigte unter DSS-Applikation zwar ausgeprägte Symptome einer akuten Kolitis mit einem Gewichtsverlust von bis zu 20%, regenerierte sich jedoch spontan nach DSS-Entzug ab dem neunten Versuchstag. Nach 15 Tagen hatte sie ihr Ausgangsgewicht nahezu wiedererlangt (Abb. 18C). Die Wildtypkontrolle überlebte die akute Kolitis somit (nicht dargestellt, Vgl. Kapitel 3.1.1). Die $\gamma\delta$ KO-Mäuse zeigten gleichermaßen einen ausgeprägten Gewichtsverlust, welcher

sich auch nach DSS-Entzug fortsetzte. Dies führte letztlich dazu, dass sämtliche Versuchstiere aufgrund eines letalen Zustandes mit Überschreiten einer Grenze von 20% Gewichtsverlust vorzeitig getötet werden mussten (Abb. 18B-C). $\gamma\delta$ KO-Mäuse, welchen zuvor Wt $\gamma\delta$ T-Zellen intravenös injiziert wurden, verhielten sich phänotypisch hingegen wie Wt-Mäuse und regenerierten sich nach DSS-Entzug vollständig (Abb. 18B-C).

3.1.4.2 *Rescue* von $\gamma\delta$ KO-Mäusen während einer akuten DSS-Kolitis mittels intravenöser Injektion von Wt oder CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen

Über die Funktionalität von Wt und CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen in einer akuten Kolitis konnte bei gleichzeitigem Vorhandensein beider Zellpopulationen in den gemixten Knochenmarkschimären keine Aussage getroffen werden. Um das Verteilungsmuster der CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen sowie deren Einfluss auf den Krankheitsverlauf vergleichend zum Wt untersuchen zu können, wurden die in Kapitel 3.1.4.1 erläuterten *Rescue*-Versuche daher ergänzend unter intravenöser Injektion von Wt oder CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen in $\gamma\delta$ KO-Mäusen durchgeführt. Zunächst wurden die Milzen von vier bis fünf Wt oder CXCR5^{-/-} Mäusen gewonnen und miteinander vermengt. Aus den Gesamtsplenozyten wurden mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) die Wt $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen aufgereinigt. Wie unter Punkt 3.1.4.1 beschrieben, erfolgte die subletale Bestrahlung der $\gamma\delta$ KO-Mäuse zur besseren Integration und Detektion der intravenös injizierten Zellpopulation von 5×10^5 $\gamma\delta$ T-Zellen im Empfängerorganismus.

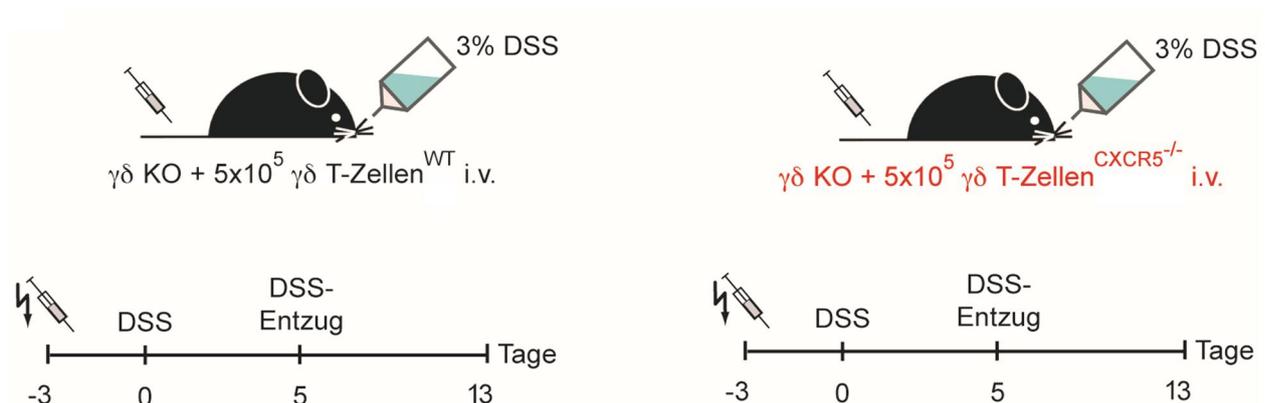


Abb. 19: *Rescue*-Modell von $\gamma\delta$ KO-Mäusen unter einer akuten DSS-Kolitis mittels intravenöser Injektion von Wt oder CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ KO-Mäuse wurden subletal mit 4,5 Gy für 53 Sekunden bestrahlt. 4-5 Stunden später erfolgte die intravenöse Injektion von 5×10^5 Wt $\gamma\delta$ T-Zellen oder 5×10^5 CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen, welche zuvor via FACS-Sorting aus kompletten Splenozytensuspensionen gewonnen wurden. 3 Tage danach begann die Behandlung mit 3% DSS im Trinkwasser sowie tägliche Gewichts- und Stuhlkontrollen zur Feststellung der Krankheitsprogression. Nach 5 Tagen erfolgte der DSS-Entzug.

Drei Tage nach Zelltransfer erfolgte die Behandlung beider Gruppen mit 3% DSS im Trinkwasser für fünf Tage, gefolgt vom DSS-Entzug. Der Krankheitsverlauf wurde für insgesamt 13 Tage ab DSS-Gabe beobachtet (Abb. 19). Anhand täglicher Gewichtsmessungen, Evaluation von Stuhl- und Fellbeschaffenheit sowie Verhaltensweise der Versuchstiere wurde der Allgemeinzustand der Mäuse eingeschätzt (Nicht gezeigte Daten).

Anhand dieses Transferexperimentes konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Wt als auch CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage waren, das Regenerationsvermögen der $\gamma\delta$ KO-Mäuse wiederherzustellen. Die Ergebnisse waren damit konträr zum Verhalten von CXCR5 KO-Mäusen unter einer akuten DSS-Kolitis (Vgl. Kapitel 3.1.1). Auch bezüglich des Gewichtsverhaltens konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Nach einem Gewichtsverlust von bis zu 20% an Tag sieben und acht nach DSS-Applikation hatten die Mäuse beider Gruppen 13 Tage nach Versuchsbeginn bereits wieder 90% ihres Ausgangsgewichtes erreicht. Die Regeneration der $\gamma\delta$ KO-Mäuse, welche CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen injiziert bekamen, lief im Vergleich zu den Wt $\gamma\delta$ T-Zellen mit lediglich geringfügiger Verzögerung ab. Allerdings musste ein Tier, welches CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen erhalten hatte, aufgrund eines Gewichtsverlustes \times 20% vorzeitig getötet werden. Dies war in der Wt Kohorte nicht notwendig (Abb. 20).

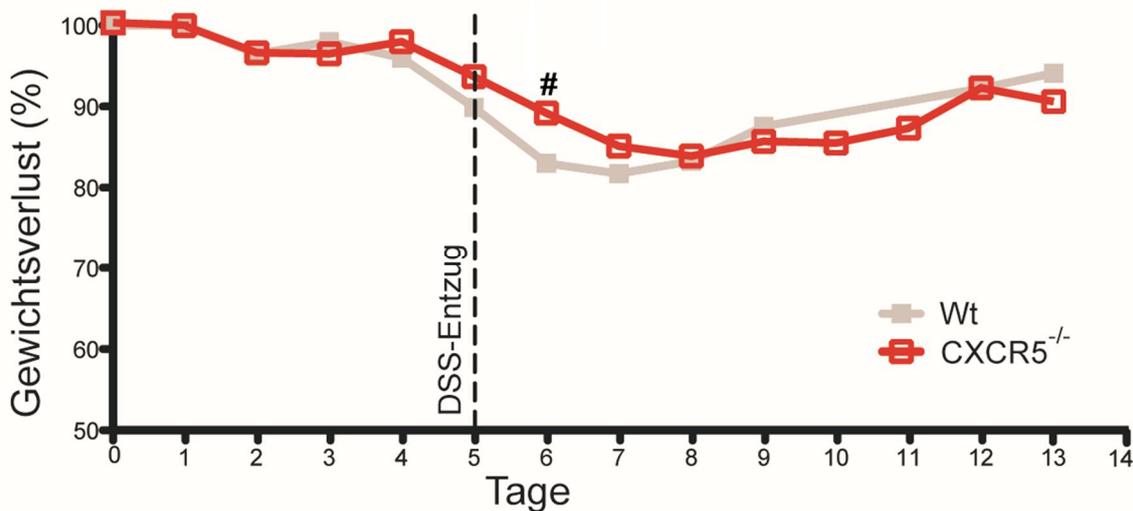


Abb. 20: $\gamma\delta$ KO-Mäuse zeigen nach Injektion von CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen verglichen zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen nur geringe Defizite im Regenerationsvermögen nach einer akuten Entzündung

Abgebildet ist der Mittelwert des Gewichtes in Prozent (100% entspricht Ausgangsgewicht) von $\gamma\delta$ KO-Mäusen mit i.v. injizierten Wt $\gamma\delta$ T-Zellen (n=4) und $\gamma\delta$ KO-Mäusen mit i.v. injizierten CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen (n=8) über 13 Tage. # entspricht einem Tier, welches CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen injiziert bekam und aufgrund eines Gewichtsverlustes von \times 20% an Tag 6 getötet werden musste.

Zur Beurteilung des organspezifischen Verteilungsmusters der Wt und KO $\gamma\delta$ T-Zellen im Empfängerorganismus wurden die Mäuse 13 Tage nach Versuchsbeginn aufgearbeitet und

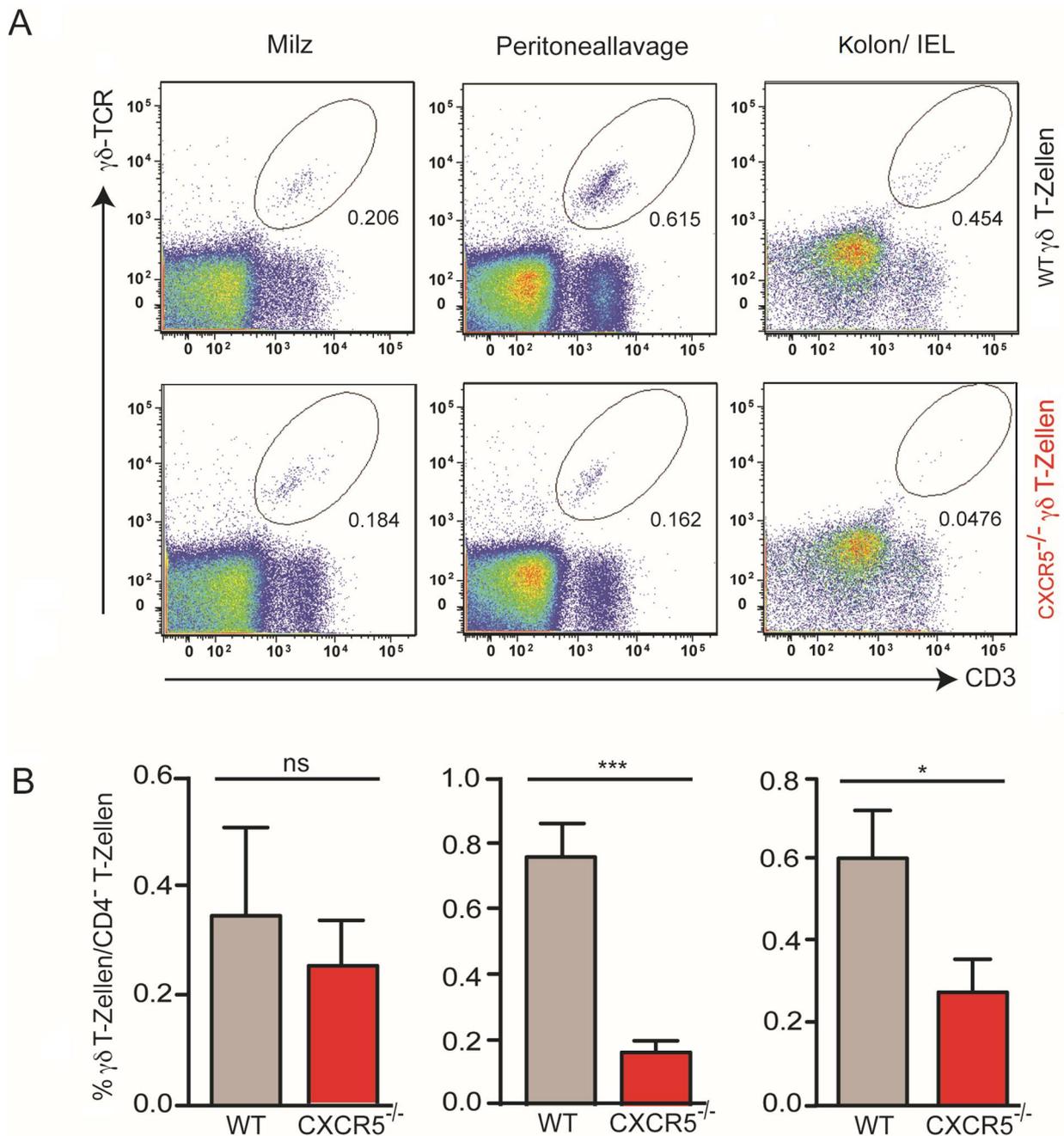


Abb. 21: CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen eine verringerte Anreicherung in Peritoneum und Kolon nach Injektion in $\gamma\delta$ KO-Mäuse verglichen zu Wt $\gamma\delta$ T-Zellen

(A) 13 Tage nach Versuchsbeginn erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von Gesamtsplenozyten, Lymphozyten des Peritoneums sowie IEL des Kolons unter Erfassung des prozentualen Anteils von Wt $\gamma\delta$ T-Zellen und CXCR5^{-/-} $\gamma\delta$ T-Zellen an den Gesamtlmphozyten. Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als CD4⁻CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ definiert. (B) Darstellung des prozentualen Anteils von $\gamma\delta$ T-Zellen (Wt (n=4) vs. CXCR5^{-/-} (n=8)) an den Lymphozyten aus Milz, Peritoneum und IEL. Milz: P=0,58; ungepaarter t-Test. ns = nicht signifikant. Peritoneum: P<0,001; ungepaarter t-Test. Kolon (IEL): P=0,04; ungepaarter t-Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

hinsichtlich des Vorkommens von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz, Kolon (IEL) und Peritoneum untersucht. Das methodische Vorgehen zur Gewinnung der Splenozyten, IEL und gesamten peritonealen Zellen ist in Kap. 2.2.1.1 beschrieben. Alle drei Zellsuspensionen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD3, CD4 und den $\gamma\delta$ -TCR markiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden als $CD4^+CD3^+\gamma\delta\text{-TCR}^+$ definiert (Abb. 20A). Die Hinzunahme von CD4 als weiteres Differenzierungsmerkmal erfolgte zur spezifischeren Abgrenzung der sehr kleinen injizierten $\gamma\delta$ T Zell-Population im Empfängerorganismus (Daten nicht dargestellt). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben eine deutliche Verminderung von $CXCR5^{-/-}$ $\gamma\delta$ T-Zellen in allen drei untersuchten Kompartimenten, wobei der Unterschied im Vergleich zu den Wt Zellen im Peritoneum am deutlichsten zu sehen war (Abb. 20A-B). Dieses Ergebnis unterstützte die in Kapitel 3.1.3.3 und 3.1.3.4 beobachteten Tendenzen und untermauerte den hypothetisierten Einfluss von CXCR5 auf die transperitoneale Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen.

Interessanterweise schien dies für die Regeneration der Tiere, bei sonst regelrechtem Vorhandensein der lymphatischen Strukturen, jedoch nicht von Relevanz gewesen zu sein. Als Erklärungsansatz dient möglicherweise die intravenöse Applikation der Wt und CXCR5 KO $\gamma\delta$ T-Zellen, welche andere Verteilungsmuster zugelassen haben könnte, als dies für $\gamma\delta$ T-Zellen im CXCR5 KO-Organismus der Fall gewesen war. Dies würde auch erklären, warum die Unterschiede hinsichtlich der epithelialen Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen in Wt und CXCR5 KO-Mäusen (Abb. 10) wesentlich deutlicher ausfiel als im Vergleich zu den hiesigen Transferexperimenten.

3.2 Expression von Adhäsionsmolekülen auf $\gamma\delta$ T-Zellen und B-Zellen unter dem Einfluss des peritonealen Mikromilieus als Einflussfaktor der akuten Kolitis

Neben dem Chemokin-/Chemokinrezeptorsystem sind auch Adhäsionsmoleküle für die koordinierte Rezirkulation von Immunzellen durch periphere Gewebe und die SLOs von Bedeutung. Je nach Gewebe, Zelltyp und Milieu variiert das Expressionsmaß von Adhäsionsmolekülen erheblich und beeinflusst somit auch die spezifische Rekrutierung von Lymphozyten an Orte akuter Entzündung. Für das Peritoneum konnte bereits gezeigt werden, dass es modulatorische Eigenschaften besitzt, welche die Expression diverser Integrine verändern kann [20]. Die Migration ins Peritoneum ist hierbei für viele Zellen ein CXCR5/ CXCL13-abhängiger Prozess. Auch $\gamma\delta$ T-Zellen lassen sich im Peritoneum nachweisen und sind unter CXCR5 KO in

ihrer Zahl vermindert, einhergehend mit einer beeinträchtigten intraepithelialen Anreicherung [121]. Da nur ein geringer Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch CXCR5 positiv ist, wurde hypothetisiert, dass die insuffiziente Anreicherung der Zellen im Kolon unter CXCR5 KO nur partiell direkt von dem fehlenden Chemokinrezeptor abhängig ist und viel mehr durch indirekte Effekte verursacht wird, welche beispielsweise durch das Fehlen einer gewebsspezifischen Differenzierung zustande kommen. Es wurde angenommen, dass eine verminderte Migration der Zellen in das Peritoneum zu einer verminderten Prägung des Adhäsionsmolekülbesatzes führen könnte, welcher für die Einwanderung in den Darm als zweiter Schritt vonnöten sein könnte.

3.2.1 Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen auf B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen

In diesem Abschnitt der Arbeit sollten zunächst die Expressionslevel der Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz und des Peritoneums bestimmt werden, von denen eine Bedeutung für die Einwanderung in den Darm bekannt ist. Hierzu zählen CD44, das $\alpha 7$ -Integrin, LFA-1, CD29 und CD49d.

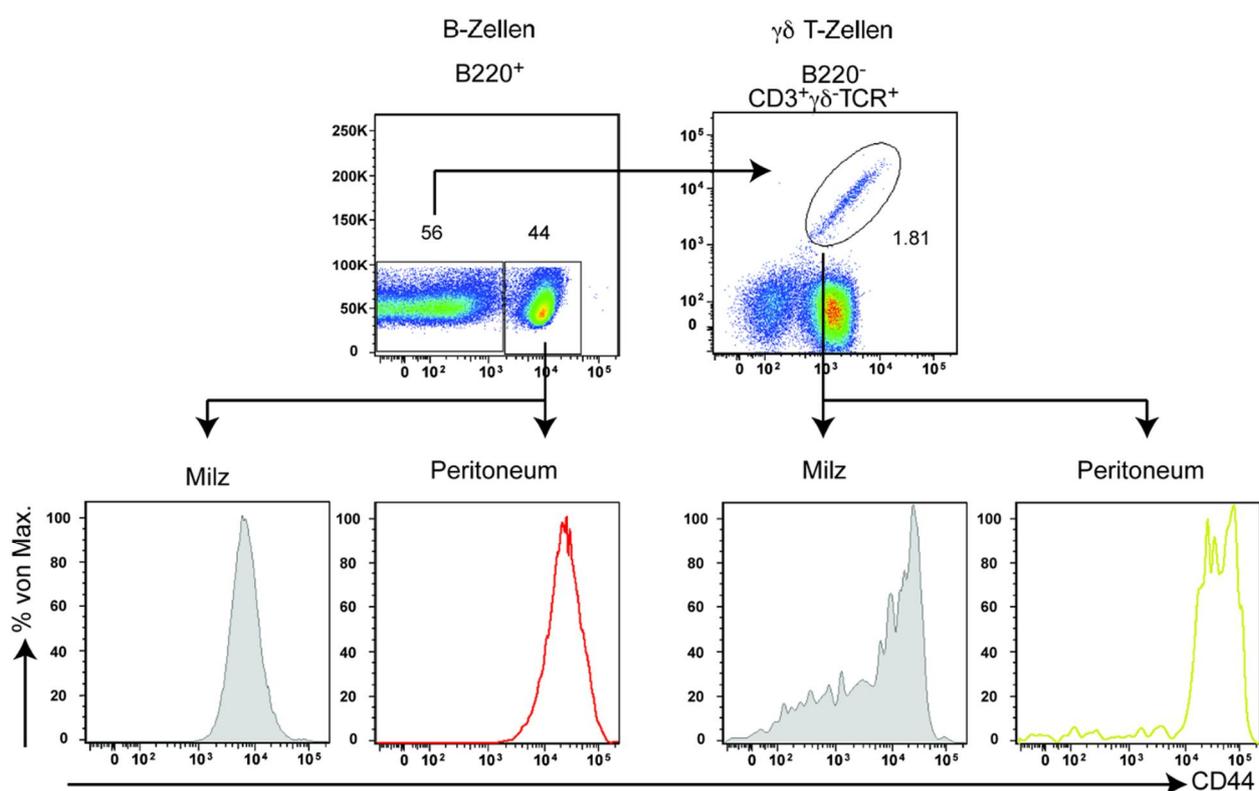


Abb. 22: Exemplarische Gating-Strategie für B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz und des Peritoneums bezüglich der Expressionslevel von CD44

Repräsentative Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse von B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen zur Bestimmung der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle am Beispiel von CD44 mittels histogrammischer Darstellung und Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Gegenübergestellt sind die MFI-Werte von Milz und Peritoneum von B-Zellen bzw. $\gamma\delta$ T-Zellen. B-Zellen wurden als B220⁺ definiert, T-Zellen als B220⁻CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺.

Auf die biologischen Funktionen der einzelnen Parameter, insbesondere im Kontext akuter intestinaler Entzündungen, wurde zuvor bereits eingegangen. Zunächst erfolgte die Gewinnung von B-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Zellen aus Milzen und dem Peritoneum. Das experimentelle Vorgehen bezüglich der Organentnahme bzw. Peritoneallavage aus/in C57Bl/6 Wt-Mäusen ist in Kapitel 2.2.1.1.1 und Kapitel 2.2.1.1.4 näher beschrieben. Die Zellsuspensionen wurden anschließend mittels fluoreszierender Antikörper gegen B220, CD3 und den $\gamma\delta$ -TCR markiert. B-Lymphozyten wurden als B220⁺, $\gamma\delta$ T-Zellen als B220⁻CD3⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ definiert. Eine repräsentative *Gating*-Strategie ist in Abb. 22 dargestellt. Anhand fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen die entsprechenden Adhäsionsmoleküle und Isotypenkontrollen, konnten die Expressionslevel auf splenischen wie peritonealen B-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt und organspezifisch gegenübergestellt werden.

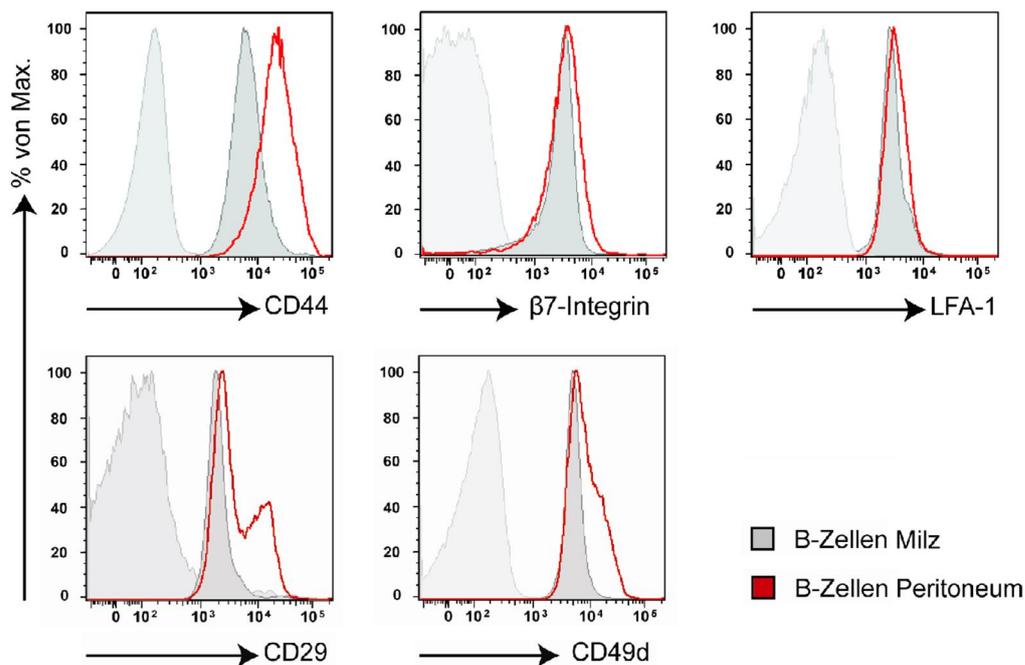


Abb. 23: Übersicht der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen der Milz und des Peritoneums

Exemplarische durchflusszytometrische Analyse von B-Zellen bezüglich der Expressionslevel von CD44, $\beta 7$ -Integrin, LFA-1, CD29 und CD49d mittels histogrammischer Darstellung und Ermittlung der MFI. Gegenübergestellt sind die MFI-Werte aus Isotypenkontrolle (hellgrau), Milz (dunkelgrau) und Peritoneum (rot).

Dies erfolgte durch Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Abb. 22 zeigt eine repräsentative Analyse am Beispiel von CD44. Bezüglich der B-Zellen konnte eine

Hochregulation unterschiedlicher Ausprägung bezüglich aller Adhäsionsmoleküle im Peritoneum verglichen zur Milz festgestellt werden (Abb. 23). Die höchsten Expressionslevel ließen sich anhand der quantitativen Analysen für CD44, CD29 und CD49d nachweisen (Abb. 24). Dies erscheint auch vor dem Hintergrund plausibel, dass CD29 und CD49d zum $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin

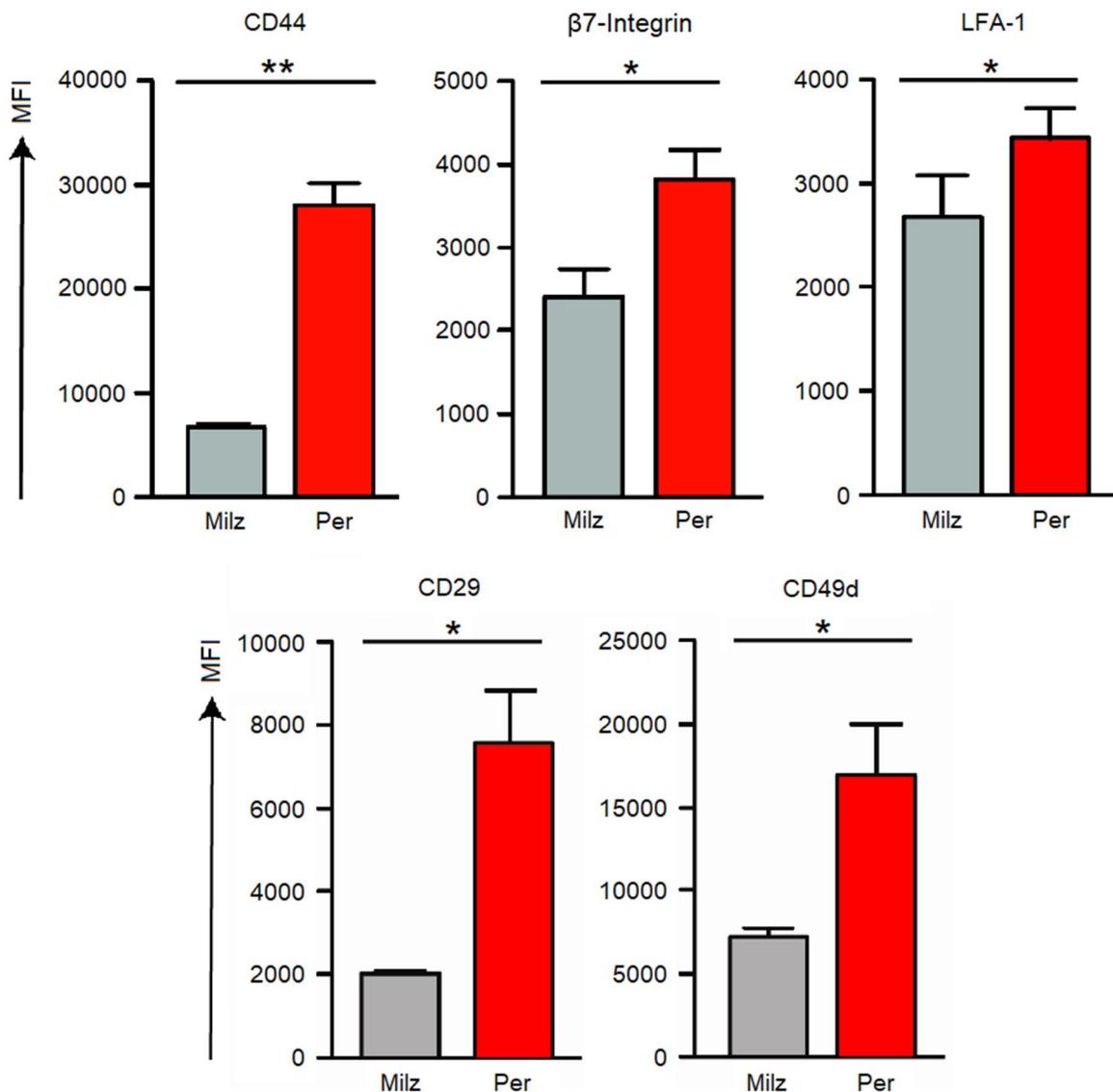


Abb. 24: Quantitative Darstellung der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen der Milz und des Peritoneums

Quantitative Darstellung der Expressionslevel von CD44, $\beta 7$ -Integrin, LFA-1, CD29 und CD49d auf splenischen und peritonealen B-Zellen im Vergleich mittels MFI (n=3-6). CD44: P=0.006. $\beta 7$ -Integrin: P=0.01. LFA-1: P=0.01. CD29: P=0.04. CD49d: P=0.04. Gepaarter zweiseitiger t-Test. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

dimerisieren (VLA-4), welches über Bindung an VCAM-1 während Entzündungen im Kolon von Bedeutung ist [83, 84]. Bezüglich CD29 zeigte sich interessanterweise eine Zweiteilung der Population, wobei ein Teil der B-Zellen keine Expression zeigte und ein anderer Anteil hingegen

hochpositiv für dieses Integrin war (Abb. 23). Die Unterschiede von splenozytären und peritonealen B-Zellen hinsichtlich der MFIs des $\alpha 7$ -Integrins sowie LFA-1 waren vergleichsweise gering (Abb. 24). Im zweiten Schritt erfolgten exemplarische Messungen der MFIs betrachteter Adhäsionsmoleküle auf $\gamma\delta$ T-Zellen. Das experimentelle Vorgehen wurde zuvor bereits beschrieben. Eine Hochregulation auf peritonealen Zellen war für CD44, LFA-1 sowie CD29 zu verzeichnen, eine Runterregulation für das $\alpha 7$ -Integrin sowie CD49d. Bezüglich der zwei letztgenannten Integrine zeigte sich abermals eine sehr inhomogene Expression bezüglich der gesamten $\gamma\delta$ T-Zell-Population.

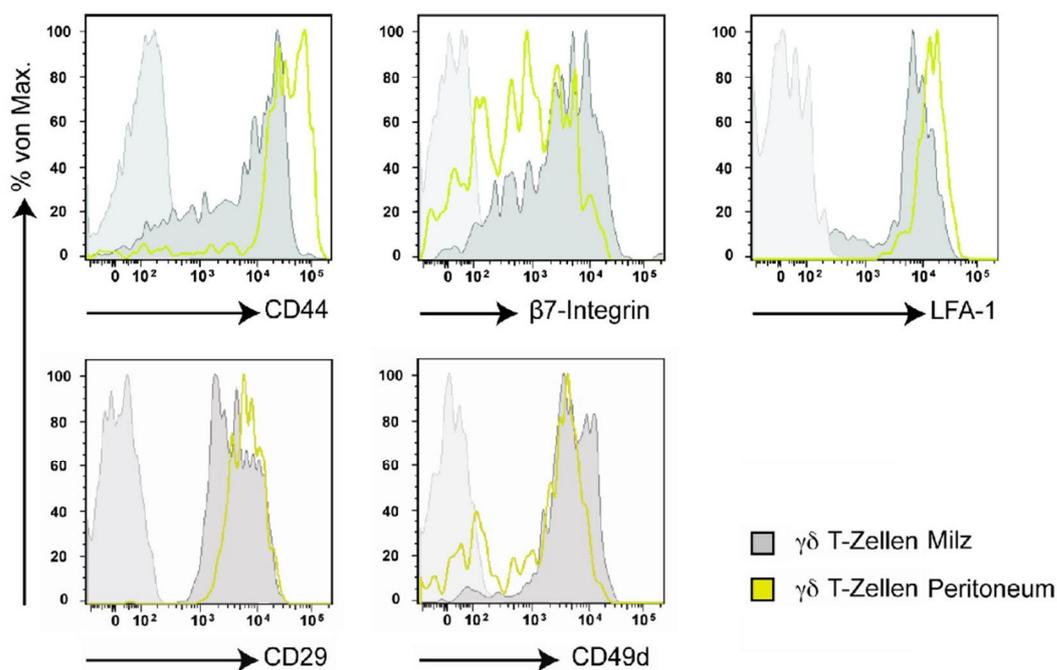


Abb. 25: Übersicht der Expressionslevel verschiedener Adhäsionsmoleküle auf $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz und des Peritoneums

Exemplarische durchflusszytometrische Analyse von $\gamma\delta$ T-Zellen bezüglich der Expressionslevel von CD44, $\alpha 7$ -Integrin, LFA-1, CD29 und CD49d mittels histogrammischer Darstellung und Ermittlung der MFI. Gegenübergestellt sind die MFI-Werte aus Isotypenkontrolle (hellgrau), Milz (dunkelgrau) und Peritoneum (gelb).

Im direkten Vergleich der MFIs mit denen der B-Zellen zeigten sich besonders hohe Expressionslevel von CD44 und LFA-1 auf peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen. CD44 ist, neben seiner Funktion als Aktivierungsmarker, gemeinsam mit dem $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin für die feste Bindung an VCAM-1 bei der Adhäsion von Lymphozyten an die Gefäßwand im Rahmen des Vier-Stufen-Modells der Lymphozytenmigration von Bedeutung [122]. Ähnliche Effekte sind für LFA-1 mittels Bindung an ICAM-1 beschrieben. Durch die Interaktion von ICAM-1-exprimierenden

APCs mit LFA-1-tragenden Leukozyten wird weiterhin ein costimulatorisches Signal zur T-Zell-Aktivierung generiert [85, 86]. Beide Adhäsionsmoleküle sind für das Ablaufen von Entzündungen somit von Bedeutung, auch wenn die Datenlage hierzu nicht so darmspezifisch ist wie beispielsweise für das α 7-Integrin. Eine quantitative Bestimmung auf den $\gamma\delta$ T-Zellen, welche denen der B-Zellen entsprach, wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen, da Messungen dessen bereits in einer anderen Dissertation gezeigt wurden [123]. In der Summe lässt sich jedoch sagen, dass die histographischen Trends den anhand größerer Kohorten erhobenen Daten entsprachen.

3.2.2 Injektion von B-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Zellen splenischen Ursprungs in das murine Peritoneum führt zum intraperitonealen *Priming*

Die unterschiedlichen Messwerte der MFIs auf Zellen der Milz und des Peritoneums warfen die Frage auf, ob das peritoneale Mikromilieu in der Lage ist, B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen splenischen Ursprungs hinsichtlich der Expressionslevel betrachteter Adhäsionsmoleküle zu prägen. Grundlage dieser Überlegung war eine Veröffentlichung von *Berberich und Kollegen*, in welcher dies für B-Lymphozyten bereits nachgewiesen werden konnte. B2-Lymphozyten der Milz und des Peritoneums unterschieden sich hinsichtlich ihres Adhäsionsmolekülbesatzes, wie auch anhand dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Adoptiver Transfer von splenischen B2-Zellen ins Peritoneum führte wiederum zu einer Anpassung des Chemokinrezeptor- und Integrinprofils an den Phänotyp der primär peritonealen B2-Zellen. So konnte beispielsweise eine Hochregulation von CXCR4, CXCR5 und α 7-Integrin nachgewiesen werden. Dieses peritoneale *Priming* ermöglichte es den B-Zellen, effizienter in die Peritonealhöhle zu rezirkulieren sowie folglich die PPs und den Dünndarm zu erreichen [20]. In Kenntnis dessen sollte daher das *Priming*-Potential von $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz eruiert werden. Die B-Zellen dienten an dieser Stelle als Kontrolle.

Hierzu wurden Milzen von jeweils drei bis vier kongenen CD45.2⁺ C57Bl/6 Mäusen entnommen und miteinander vermengt. Aus diesem Lysat wurden die Gesamtsplenozyten aufgereinigt, wie zuvor bereits beschrieben wurde (Vgl. Kapitel 2.2.1.1.1). Die Splenozyten wurden anschließend hinsichtlich der Expressionslevel der zuvor betrachteten Adhäsionsmoleküle mittels fluoreszierender Antikörper markiert und daraufhin die MFI der einzelnen Parameter bestimmt. Die erhobenen Werte wurden als Referenz für die folgenden Messungen herangezogen. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion von 1×10^8 Splenozyten in kongene CD45.1⁺

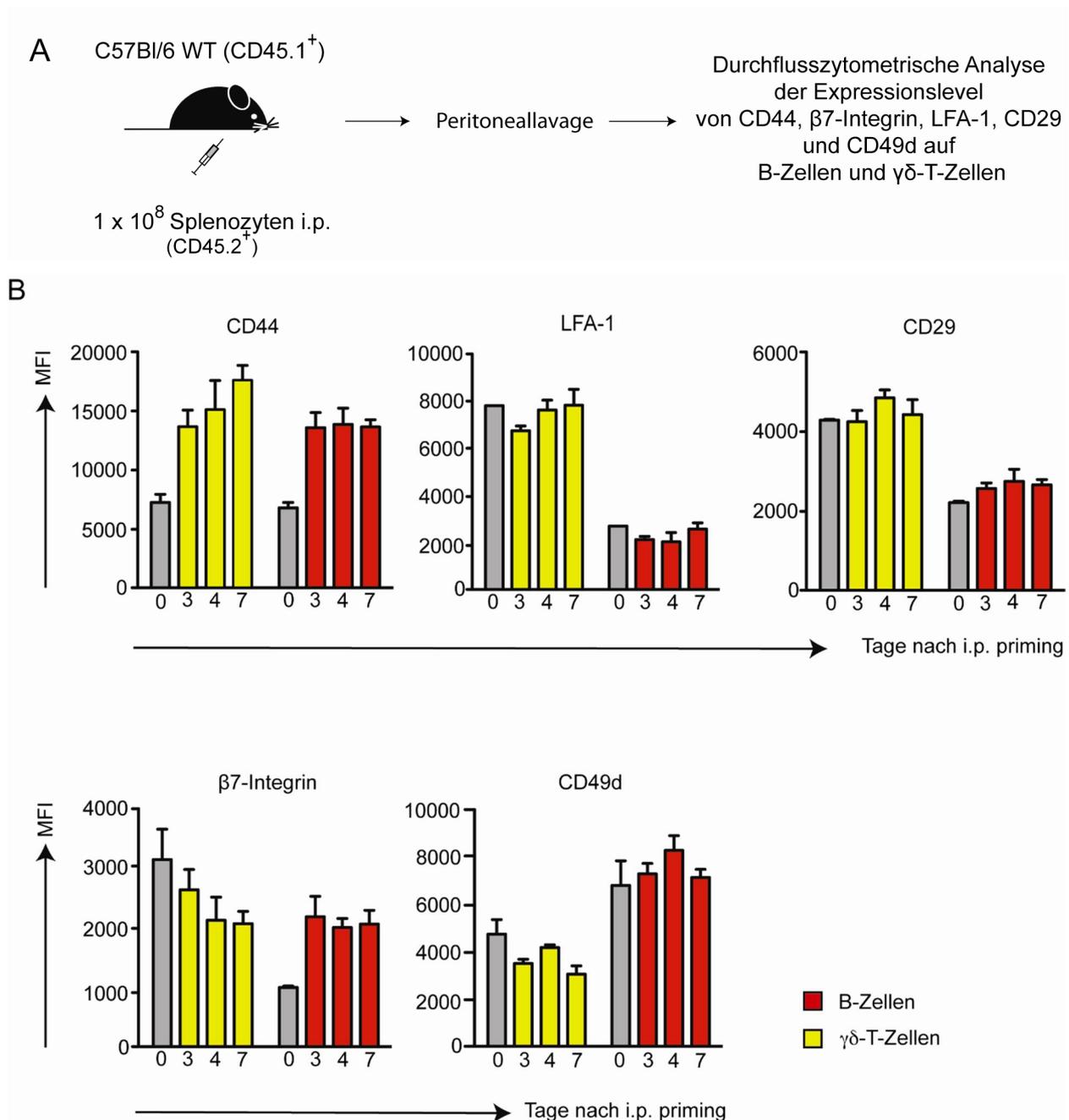


Abb. 26: Intraperitoneale Injektion splenischer B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen führt zum Priming mit Hoch- oder Runterregulation der untersuchten Adhäsionsmoleküle

(A) 1×10^8 aufgereinigte totale Splenozyten (CD45.2⁺) wurden intraperitoneal in kongene C57Bl/6 Mäuse (CD45.1⁺) injiziert. Nach Peritoneallavage und Wiedergewinnung der injizierten Zellen, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Expressionslevel von CD44, β 7-Integrin, LFA-1, CD29 sowie CD49d durch Erfassung der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von intraperitoneal geprägten B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 3, 4 und 7. Als Referenz dienten naive Splenozyten ohne zuvoriges Priming entsprechend Tag 0 (nicht dargestellt).

(B) Quantitative Darstellung der Expressionslevel von CD44, LFA-1, CD29, β 7-Integrin und CD49d mittels MFI von B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen nach 0 (LFA-1: n=1; CD44, CD29, β 7-Integrin, CD49d: n=2), 3, 4 und 7 (jeweils n=3) Tagen intraperitonealer Prägung. Balken repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM.

C57Bl/6 Mäuse. Nach drei, vier und sieben Tagen erfolgte die Wiedergewinnung der Zellen mittels Peritoneallavage und die durchflusszytometrische Analyse der Expressionslevel von CD44, α 7-Integrin, LFA-1, CD29 und CD49d auf B-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 26A).

Für CD44 zeigte sich eine deutliche Hochregulation der Expressionslevel auf beiden Zellpopulationen nach peritonealem *Priming*. Nur geringfügige Unterschiede waren bezüglich der Expression von LFA-1 und CD29 zu verzeichnen, wenngleich ein geringfügiger Anstieg der MFI zum Trend der in Kapitel 3.2.3. und 3.2.4. gemachten Beobachtungen passte und insbesondere LFA-1 sowohl auf splenischen, als auch peritonealen $\gamma\delta$ T-Zellen hoch exprimiert wird. Bezüglich des α 7-Integrins und CD49d konnte für $\gamma\delta$ T-Zellen eine Runterregulation unter Einfluss des peritonealen Mikromilieus festgestellt werden, während bei den B-Lymphozyten eine Hochregulation beider Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden konnte. Auch dies stimmte mit den Phänotypen peritonealer und splenischer B-Zellen bzw. $\gamma\delta$ T-Zellen ohne zuvoriges *Priming* überein (Abb. 26B). Die Daten beruhen allerdings auf sehr wenigen Tierzahlen, weswegen keine Auswertung mittels statistischer Testung durchgeführt wurde.

In der Summe ließ sich somit bestätigen, dass nicht nur naive B-Zellen sondern auch $\gamma\delta$ T-Zellen in ihren phänotypischen Merkmalen modifizierbar sind und dass die modulatorischen Einflüsse des Peritoneums hierfür von Bedeutung sind. Darüber hinaus ließ sich insbesondere für die $\gamma\delta$ T-Zellen ein Adhäsionsmolekülbesatz nachweisen, welcher sie mit hohen Expressionsleveln von CD44 und LFA-1 zum *Homing* in den Darm prädisponiert. Anhand weiterführender Arbeiten konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass dem Peritoneum entstammende $\gamma\delta$ T-Zellen unter entzündlichen Bedingungen im Kolon nachzuweisen sind und Entzündungsreaktionen somit lokal regulieren können [123].

4. DISKUSSION

Immunzellen organisieren sich in der intestinalen Mukosa innerhalb der SLOs sowie solitär in den epithelialen und subepithelialen Kompartimenten. Die koordinierte Rezirkulation von naiven und Memory-T-Zellen, B-Zellen sowie dendritischen Zellen während akuter Entzündungen erfordert das Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie spezifischer Adhäsionsmoleküle und dem Chemokin-/ Chemokinrezeptorsystem [124]. Der Chemokinrezeptor CXCR5 übernimmt hierbei im Menschen wie in der Maus wichtige Aufgaben. Als homöostatischer Chemokinrezeptor ist er für die Genese von SLOs sowie Aufrechterhaltung derer Mikroarchitektur von Bedeutung [73], beeinflusst jedoch auch das Ablaufen adaptiver Immunantworten und entzündlicher Prozesse. Neben Mechanismen zur Elimination virusinfizierter Zellen mittels CXCR5-tragender, folliculärer, zytotoxischer T-Zellen [76] spielt er auch in der Entwicklung chronischer Entzündungen eine entscheidende Rolle. So handelt es sich bei der Entstehung von TLOs in humanen Autoimmunerkrankungen wie der RA, Helicobacter-assoziiertes Gastritis oder dem Sjögren Syndrom um CXCR5-abhängige Prozesse. Im Mausmodell führt CXCR5 KO zu einer verminderten Bildung von TLOs während einer chronischen Helicobacter pylori Gastritis [78] sowie zu einer Reduktion artikulärer Destruktion in einem Antigen-induzierten Arthritismodell [125].

Eine Subpopulation von T-Lymphozyten, welche in mukosalen Geweben stark angereichert ist und intestinale Immunantworten beeinflusst, sind die T_H17-Zellen. Sie sind in der Lage angeborene und adaptive Immunantworten zu modulieren, für Gewebsheilung benötigte Wachstumsfaktoren zu sezernieren sowie selbst anti- und proinflammatorische Effekte zu vermitteln [43].

4.1 CXCR5 beeinflusst eine akute Kolitis im Mausmodell

In Kenntnis der immunologischen Grundlagen stellte sich die Frage, ob akute Immunantworten im Kolon und die Funktionalität und Rekrutierung von T_H17-Zellen in die Mukosa des Kolons von CXCR5-Expression beeinflusst werden. Mittels Induktion einer DSS-Kolitis in Wildtyp- sowie CXCR5 KO-Mäusen, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass CXCR5 KO-Mäuse deutlich schwerere Entzündungen des Kolons sowie eine verzögerte epitheliale Regeneration im Vergleich zu Wt-Mäusen aufweisen. Diese Beobachtung ging mit einer signifikanten Reduktion intraepithelialer T_H17-Zellen einher. Inwiefern dies auf die Veränderung der anatomischen Struktur lymphoider Organe und deren Funktionalität aufgrund des CXCR5 KO zurückzuführen war oder doch in einer CXCR5-Abhängigkeit von T_H17-Zellen für eine gerichtete Migration in das Kolon unter homöostatischen Konditionen und akuten Entzündungen zu begründen ist, wurde in dieser Arbeit weiter untersucht.

4.1.1 Potentielle CXCR5-abhängige Mechanismen in der Regulation intestinaler Entzündungen

Im Wissen um die Chemokin-abhängige Rezirkulation von Lymphozyten durch Gewebe lymphatischen und nicht-lymphatischen Ursprungs, wurde in dieser Arbeit hypothetisiert, dass das Abfließen einer akuten Entzündungsreaktion im Kolon unter KO des Chemokinrezeptors CXCR5 beeinträchtigt ablaufen könnte. Zur Überprüfung der Hypothese wurde das Verhalten von CXCR5 KO und Wt-Mäusen unter Induktion einer akuten DSS-Kolitis untersucht. Wie erwartet zeigten sich in den KO-Mäusen eine deutlich schwerere Kolitis sowie eine verzögerte Regeneration nach DSS-Exposition im Vergleich zu den Wt-Mäusen. Wie zuvor beschrieben, handelt es sich bei CXCR5 um einen Chemokinrezeptor mit multiplen homöostatischen wie entzündlichen Funktionen, so dass die Interpretation dieses Phänotyps im Gesamtkontext der immunologischen Alterationen unter CXCR5 KO erfolgen muss. In erster Linie sind die lymphatischen Organe des Magen-Darm-Traktes zu diskutieren, welche an der Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase sowie Generierung akuter Immunantworten im Intestinum beteiligt sind. Da die hier vorgestellte Arbeit ausschließlich Ergebnisse aus Mausversuchen darlegt, werden diese, wenn nicht anders ausgewiesen, fortfolgend auch im Kontext der vorliegenden murinen Literatur diskutiert.

Antigene führen im Darm über verschiedene Wege zu einer Immunantwort. Ziel dessen ist u.a. die Bekämpfung potentieller Pathogene, wozu die lokale Produktion von Immunglobulinen notwendig ist. Das MALT des Dün- und Dickdarmes beinhaltet zahlreiche lymphatische Strukturen, welche an diesem Prozess beteiligt und in ihrer Entwicklung zumindest teilweise CXCR5-abhängig sind. Im Dünndarm sind die PPs von besonderer Bedeutung, mit deren Hilfe Antigene luminal durch M-Zellen aufgenommen und anschließend an APCs übergeben werden. Es schließt sich die Antigenprozessierung und Darbietung gegenüber B- und T-Lymphozyten an, welche daraufhin eine spezifische Immunantwort in Gang setzen und die Bildung von Immunglobulinen bewirken. Im Darm werden große Mengen an IgA produziert [10, 126]. Die PPs sind unter CXCR5 KO stark vermindert sowie strukturell verändert und werden durch zirkulierende reife B- und T-Lymphozyten nur eingeschränkt via HEVs erreicht. Da die PPs jedoch nur im Dünndarm nachzuweisen sind und in dieser Arbeit eine akute Kolitis induziert wurde, lassen sich diese Daten nicht auf den hier im Fokus stehenden Dickdarm übertragen. Das angewandte Modell der DSS-Kolitis induziert eine akute Entzündung im Kolon unter Aussparung des Dünndarmes, so dass nicht davon auszugehen ist, dass die alterierte Struktur und Funktion der PPs zum KO-Phänotyp beigetragen hat. Als Äquivalent zu den PPs können im Kolon die *colonic*

patches (colonische Plaques, CPs) herangezogen werden, welche in ihrer Organisation und Funktion den PPs entsprechen. Sie bestehen aus einigen wenigen B-Zell-Follikeln, welche von einer T-Zell-Zone umgeben sind. Die Muscularis mucosae ist im Bereich der CPs unterbrochen, so dass ein unmittelbarer Kontakt zum intestinalen Epithel besteht und eine Antigendarbietung durch im Epithel lokalisierte APCs ermöglicht wird. Die Entstehung der CPs erfolgt wie die der PPs in Abhängigkeit von CXCL13 sowie CXCR5 [11, 12]. Bereits die primären Entwicklungsschritte, welche in der Zusammenlagerung von CXCR5⁺ LTi (*lymphoid tissue inducer*)-Zellen und CXCL13⁺ LTo (*lymphoid tissue organizer*)-Zellen bestehen, tragen zur Ausbildung von sowohl CPs als auch PPs bei [12]. Das Vorhandensein von B- und T-Zell-Zonen legt nahe, dass CPs ebenso wie PPs an der lokalen Produktion von Immunglobulinen beteiligt sein dürften. Unter Schädigung der epithelialen Barriere durch DSS-Applikation und vermehrtem Eindringen bakterieller Antigene in die intestinale Mukosa lässt sich im Rahmen eines CXCR5 KO und entsprechend insuffizienter Entstehung von CPs somit vermuten, dass mangels lokaler Antikörperproduktion auch die bakterielle *Clearance* deutlich eingeschränkt sein dürfte, was eine akute Kolitis aggravieren und prolongieren könnte. Diese Ausführungen bleiben auf Basis der hier erhobenen Daten jedoch hypothetisch. Die vermutete bakterielle Translokation wurde beispielsweise nicht direkt nachgewiesen. Histologischerseits wurde in dieser Arbeit weiterhin nur die allgemeine Gewebebeschaffenheit unter DSS-Induktion betrachtet. Spezifische Untersuchungen, welche einen Mangel an CPs unter CXCR5 KO nachweisen könnten, fehlen. Auch wurden in dieser Arbeit keine Daten erhoben, welche eine direkte Beeinträchtigung von Immunantworten beweisen, wie beispielsweise die Messung lokaler Antikörper- oder Zytokinlevel. Anhand der zu diesem Thema vorliegenden Literatur lässt sich jedoch sagen, dass CXCR5 KO, je nach Lokalisation der Infektion und Pathogen, eine Beeinträchtigung der Antikörperproduktion zur Folge haben kann. So zeigte sich unter Infektion mit *Helicobacter pylori* Antigen ein deutliche Reduktion der IgG und IgA-Level im Serum von CXCR5 KO verglichen zu Wt-Mäusen [78]. Selbiges konnte unter oraler Infektion von Wt- und CXCR5 KO-Mäusen mit *Salmonella enterica* gezeigt werden [127]. Eine Infektion mit VSV (*vesicular stomatitis virus*) führte jedoch zu vergleichbaren IgG und IgM-Leveln zwischen Wt- und KO-Tieren [128]. Die genannten Arbeiten beschreiben allerdings vorrangig Infektionen, welche ihren Wirkungsort im Dünndarm oder Magen haben. Inwiefern lassen sich diese Daten nun jedoch auf Immunantworten im Kolon übertragen? Bezüglich eines CXCR5-abhängigen Mangels an CPs und folglich verminderter Antikörperproduktion im Rahmen einer Kolitis existieren keine Daten. Dass das Kolon an der lokalen Produktion von Immunglobulinen und insbesondere IgA beteiligt ist, steht allerdings außer Frage. Dies findet auch jenseits von CPs statt. Eine Ressource zur IgA-Sekretion

im Kolon stellen beispielsweise die sogenannten IgA ASCs (*IgA Ab-secreting cells*) dar, welche in der LP nachzuweisen sind. Ihre Rekrutierung und Funktionalität ist ein Chemokin-abhängiger Prozess. So ließ sich für CCL28 KO-Mäuse eine deutliche Reduktion der IgA ASCs in der LP sowie eine deutliche Reduktion der fäkalen IgA-Level nachweisen. Eine DSS-Kolitis verlief in CCL28 KO-Mäusen deutlich schwerer im Vergleich zum Wt [129]. Darüber hinaus konnten die so genannten *caecal patches*, welche den CPs des Appendix vermiformis entsprechen, als relevante Quelle für IgA-Sekretion im Kolon definiert werden [130]. Das Kolon verfügt also wie der Dünndarm über verschiedene immunologische Strukturen, welche zur Antikörperproduktion befähigt sind. Auch die follikelinterne Organisation weist CXCR5-abhängige Mechanismen auf, welche humorale Immunantworten beeinflusst. In den SLOs sind beispielsweise CD4⁺ CXCR5⁺ T-Zellen zu finden, welche unter Runterregulation von CCR7 in die Keimzentren der B-Zell-Follikel einwandern und hier costimulatorische Signale wie ICOS (*inducible costimulator*) und CD154 aussenden, was die Antikörperproduktion residenter B-Zellen unterstützt. Sie werden deswegen auch als follikuläre T-Helfer-Zellen (T_{FH}) bezeichnet [131]. Sobald die T_{FH} zu Memory T-Zellen werden, erfolgt die Runterregulation von CXCR5, sodass sie die B-Zell-Follikel verlassen können, wie jüngst auch durch Takebe und Kollegen beschrieben wurde [132]. Unter CXCR5 KO findet dieser Zell-Zell-Kontakt vermindert statt. Es ist anzunehmen, dass auf Grundlage dessen die humorale Immunantwort durch die B-Zellen beeinträchtigt abläuft und andererseits Differenzierungsschritte in der Entwicklung von T_{FH} zu T-Gedächtniszellen ausbleiben. Vor dem Hintergrund der Daten konnten Obermeier und Kollegen eine signifikante Reduktion von T-Zellen in der Mukosa nachweisen [133].

Neben dem MALT als Ort humoraler Immunantworten ist natürlich auch die Milz an der Bildung von Immunglobulinen beteiligt. Trotz der CXCR5-abhängigen Aufrechterhaltung der splenischen Mikroarchitektur, konnte in der Maus gezeigt werden, dass die Marginalzonen B-Zellen, welche zu den wichtigsten Quellen von natürlichen Antikörpern zählen, um die splenischen T-Zell-Zonen im CXCR5 KO deutlich angereichert sind. CXCR5 KO-Mäuse ohne zuvorige Immunisierung weisen entsprechend ähnlich hohe Titer an IgM, IgG und IgA im Serum wie Wildtypen auf [7, 73]. Voigt und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass sich in Abwesenheit von CXCR5 im Bereich der PALS ein Mikromilieu bildet, welches die Co-Lokalisation von FDCs und B-Zellen ermöglicht und die Affinitätsreifung und Proliferation von B-Zellen somit dennoch stattfinden kann [134]. Die Antikörperproduktion ist unter CXCR5-Defizienz somit nicht als grundsätzlich eingeschränkt zu beurteilen, sondern ist maßgeblich von dem Ort der Antigenaufnahme abhängig. Luminalwärts über den Blutstrom absorbierte Antigene, welche primär in die Milz gelangen und

hier von residenten DCs prozessiert werden, scheinen eher zu einer kompetenten Immunantwort zu führen [126]. Wertet man diese Daten nun im Kontext des CXCR5 KO-Phänotyps während einer DSS-Kolitis, ist zu mutmaßen, dass ein Defekt in der lokalen Immunglobulinproduktion zumindest partiell für den schwereren Krankheitsverlauf verantwortlich war.

Neben der defizitären Produktion von Immunglobulinen aufgrund von Architekturstörungen lymphatischer Strukturen des Kolons ist auch die Organisation innerhalb von Lymphfollikeln in Abhängigkeit von CXCR5 als potentieller pathophysiologischer Mechanismus zu evaluieren. OX40 (CD134) ist ein Oberflächenmolekül, welches u.a. die Expression von CXCR5 auf CD4⁺ T-Zellen induziert. Obermeier und Kollegen konnten zeigen, dass unter Antagonisierung von OX40 eine chronische DSS-Kolitis deutlich milder verlief. Mit Hilfe eines Anti-OX40-IgG konnte eine Runterregulation von CXCR5 verzeichnet werden, welche mit einer Akkumulation von T-Zellen in der Mantelzone von Lymphfollikeln und einer deutlichen Reduktion von CD4⁺ Zellen in der intestinalen Mucosa einherging. Es wurde hypothetisiert, dass eine CXCR5-Runterregulation auf CD4⁺ Zellen zu einer verminderten Invasion in folliculäre Keimzentren führe, womit eine weitere Differenzierung und Rezirkulation in die Mukosa beeinträchtigt sein könnte [133]. CXCR5 KO müsste anhand dieser Daten somit zu einer verminderten Entzündungsreaktion führen. Da in dieser Arbeit jedoch selektiv ein Signalweg gehemmt wurde und die übrigen lymphatischen Strukturen intakt waren, kann gemutmaßt werden, dass der in dieser Arbeit beobachtete Phänotyp nicht durch ein lokales, sondern systemisches Geschehen beeinflusst wurde. In der Summe scheint CXCR5 somit auf verschiedenen Ebenen Einfluss auf das erfolgreiche Ablaufen von Immunantworten im Kolon zu nehmen. Insbesondere für die B-Zellen ist dies in der Literatur schon vorbeschrieben. Die Bedeutung von T-Lymphozyten, und im speziellen $\gamma\delta$ T-Zellen, in diesem Kontext ist bislang nur wenig untersucht und wurde in dieser Arbeit näher beleuchtet.

4.1.2 Die Bedeutung von CXCR5 und CXCR3 für $\gamma\delta$ T-Zell-regulierte lokale Immunantworten und intestinale *Repairmechanismen*

Wildtypmäuse, denen über wenige Tage DSS verabreicht wurde, entwickelten eine akute Kolitis, welche mit blutigen Diarrhoen sowie einem deutlichen Gewichtsverlust einherging. Sobald die Behandlung beendet wurde, waren die Wt-Tiere fast ausnahmslos in der Lage, sich zu regenerieren. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten in der Regenerationsphase nur noch minimale, in der Mukosa verstreute Zellinfiltrate, sowie eine geringfügige Hyperplasie der Epithelien. Gegenteiliges konnte für CXCR5 KO-Mäuse beobachtet werden. In der histologischen Begutachtung der Kolonpräparate von CXCR5 KO-Mäusen ließen sich vier bis acht Tage nach

DSS-Entzug immer noch deutliche Anzeichen der Inflammation nachweisen. Neben entzündlichen Zellinfiltraten von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, war ein Verlust von Epithel- und Becherzellen sichtbar. Der Regenerationsprozess schien insgesamt nur unzureichend stattfinden zu können, was letztendlich mit einer höheren Vulnerabilität der CXCR5 KO-Mäuse gegenüber des gesetzten Entzündungsreizes einherging. Im Wissen um die Abhängigkeit lymphozytärer Migration vom Chemokin/ Chemokinrezeptorsystem und die regenerativen Kapazitäten von $\gamma\delta$ T-Zellen in epithelialen Geweben, wurde hypothesiert, dass ein Mangel an $\gamma\delta$ T-Zellen in der Mukosa des murinen Kolons der KO Maus hiermit im Zusammenhang stehen könnte.

$\gamma\delta$ T-Zellen sind in Epithelien bekanntermaßen stark angereichert und machen unter den IEL des Darmes der Maus 20-40% aus [34]. Über den Einfluss von CXCR5 auf die Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon während einer akuten Entzündung ist wenig bekannt. Die Expression von CXCR5 auf Subpopulationen muriner $\gamma\delta$ T-Zellen wurde zwar bereits beschrieben, betrifft jedoch nur einen sehr geringen Anteil aller Zellen [74]. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im CXCR5 KO der Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen an den gesamten IEL unter naiven wie entzündlichen Bedingungen deutlich vermindert war. Dies war auch unter Anwendung eines knochenmarkschimären Mausmodells reproduzierbar, welches CXCR5 KO und Wt Zellen in einem Wt Organismus sichtbar machen konnte, ohne die Architekturstörungen aufzuweisen, welche in der CXCR5 KO Maus vorzufinden sind. Ein Mangel an intraepithelialen $\gamma\delta$ T-Zellen wurde erst bei Bestehen einer akuten Inflammation von klinischer Bedeutung, da CXCR5 KO-Mäuse bis zur Induktion einer akuten DSS-Kolitis keine Anzeichen für eine intestinale Entzündung zeigten (i. S. eines generell niedrigeren Körpergewichtes, Diarrhoen, Hämatochezie, reduzierten Allgemeinzustandes).

Der dargelegte Phänotyp unter CXCR5 KO und der nachgewiesene Mangel intraepithelialer T-Zellen im Kolon warf die Frage auf, welche intestinal ablaufenden Vorgänge zumindest teilweise von T-Zellen abhängig sind und im Falle eines Mangels während einer akuten Entzündung somit beeinträchtigt stattfinden. Die epitheliale Disruption, welche durch eine akute DSS-Kolitis verursacht wird, erfordert zum Einen eine intakte humorale Immunantwort, um die Translokation potentieller Pathogene zu kontrollieren, und zum Anderen funktionstüchtige Mechanismen zur Gewebshheilung. Auf beide Vorgänge können T-Zellen Einfluss nehmen.

Bezüglich unterstützender Effekte in der lokalen Antikörperproduktion liegen Daten zu humanen wie auch murinen T-Zell-Populationen vor, wobei sich diese nicht ausschließlich auf intestinale

Immunantworten beziehen. Untersuchungen an humanen PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) konnten beispielsweise eine CXCR5-tragende Gruppe von im Blut zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen identifizieren, welche die costimulatorischen Moleküle ICOS und CD40L exprimiert und weiterhin IL-2, IL-4 und IL-10 sezerniert. Dies führt in vitro zum Einen zur Unterstützung der B-Zell-vermittelten Antikörperproduktion und zum Anderen vermutlich zur Modulation von Immunreaktionen durch Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 [135]. So konnte durch Chen und Kollegen beispielsweise gezeigt werden, dass selbige Subpopulation von humanen T-Zellen an der CD4⁺T_{FH}-abhängigen Antikörperproduktion gegenüber H9N2 Influenza-Viren beteiligt ist [136]. Kürzlich wurde eine CXCR5-exprimierende Subpopulation muriner T-Zellen identifiziert, welche CXCR5 auf CD4⁺ Zellen in Lymphfollikeln aktiviert und darüber hinaus ihre Differenzierung zu T_{FH} unterstützt. In KO-Mäusen konnten folglich eine beeinträchtigte Bildung von Keimzentren, eine ineffiziente T_{FH}-Differenzierung sowie reduzierte Spiegel Ovalbumin (OVA)-spezifischer Immunglobuline nach Stimulation mit OVA nachgewiesen werden [74]. Anhand dieser Daten konnte erstmals der direkte Einfluss von murinen T-Zellen auf humorale Immunantworten bewiesen werden. Die Fähigkeit zur Regulation lokaler Immunglobulinproduktion bringt jedoch nicht nur antiinflammatorische Effekte mit sich. Bekanntermaßen verfügen T-Zellen auch über proinflammatorische Eigenschaften und scheinen an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein. Die Bildung von Autoantikörpern ist in TCR $\delta^{-/-}$ Mäusen, denen es aufgrund fehlender TCR δ -Ketten auch an $\gamma\delta$ T-Zellen mangelt, beispielsweise beeinträchtigt [74]. In bereits erwähntem Mausmodell für Lupus entwickelten KO-Mäuse ferner eine mildere Glomerulonephritis und wiesen verringerte Titer Lupus-assoziiierter Autoantikörper im Serum auf [74]. Über die Bedeutung von CXCR5 auf die Entwicklung einer T-Zell-abhängigen Autoimmunität lässt sich zum aktuellen Stand der Wissenschaft jedoch keine Aussage treffen.

Im Kontext der hier dargestellten Ergebnisse konnte somit postuliert werden, dass die intestinale Antikörperproduktion unter CXCR5 KO und aufgrund des lokalen Mangels an $\gamma\delta$ T-Zellen eingeschränkt abläuft und eine erfolgreiche Immunantwort gegenüber Pathogenen, welche das Epithel nach DSS-induzierter Disruption leichter penetrieren können, nur unzureichend stattfindet. Einschränkend ist zu erwähnen, dass nicht sicher ist, inwiefern die Daten auf das MALT des Kolons übertragbar sind, da sich die Untersuchungen von Rezende und Kollegen beispielsweise auf die jeweiligen drainierenden Lymphknoten bezogen (z.B. inguinal) [74]. Darüber hinaus wurden die Immunglobulinspiegel in KO und Wt in dieser Arbeit nicht bestimmt. Dies könnte in aufbauenden Projekten von weiterem Interesse sein.

Neben direkten und indirekten Einflüssen auf das Ablaufen adaptiver und angeborener Immunantworten, sind T-Zellen in der Lage KGF-1 und KGF-2 zu produzieren, welches an der Regeneration verletzter Epithelien beteiligt ist [45-47]. In durch DSS zerstörten Epithelien lassen sich im Wt große Mengen an KGF-bildenden T-Zellen nachweisen. KO-Mäuse, welche über keinerlei T-Zellen verfügen, weisen unter DSS eine verzögerte Gewebshheilung auf. Wt-Mäuse zeigen nach DSS-Entzug im Gegensatz zu KO-Mäusen eine ausgeprägte epitheliale Proliferation [137]. Unter CXCR5 KO sind die intraepithelialen T-Zellen vermindert und die Regenerationskapazität betreffender KO-Mäuse nach DSS-Exposition deutlich reduziert. In dieser Arbeit durchgeführte Transferexperimente zeigten, dass CXCR5^{-/-} T-Zellen ebenso wie Wt T-Zellen, welche KO-Mäusen intravenös injiziert wurden, unter DSS-Gabe gleichermaßen zu einem *Rescue* betreffender Tiere in der Lage waren. Nur ein Tier, welches KO T-Zellen erhalten hatte, musste aufgrund eines kritischen Gewichtsverlustes $\times 20\%$ getötet werden. Insgesamt ließ sich in einer kleinen Kohorte von vier Wt gegenüber acht KO-Tieren jedoch eine leichte Retardierung in der Regenerationskapazität der mit KO T-Zellen behandelten Tiere feststellen. Weiterhin waren in allen drei untersuchten Kompartimenten (Milz, Peritoneum und Kolon) signifikant weniger KO T-Zellen nachzuweisen. Die größere Empfindlichkeit von CXCR5 KO-Mäusen gegenüber DSS-Exposition lässt sich somit nicht ausschließlich auf den Mangel an residenten T-Zellen im Kolon zurückführen. Es ist jedoch höchst wahrscheinlich, dass eine insuffiziente intraepitheliale Anreicherung die immunologischen Defizite des CXCR5 KO-Phänotyps aggraviert. Um eine definitivere Aussage treffen zu können, wäre es notwendig gewesen, die erhobenen Daten mit größeren Versuchstierzahlen zu untermauern, was aufgrund des engen zeitlichen Rahmens für das Durchführen dieser medizinischen Doktorarbeit jedoch nicht erfolgen konnte.

Im Modell knochenmarkschimärer Mäuse bezogen wir den Chemokinrezeptor CXCR3 mit in die Betrachtungen ein, welcher primär in inflammatorische Prozesse involviert ist. Er bindet an die Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 und findet sich u.a. auf den IEL und LPL des Dünndarmes sowie des Kolons unter inflammatorischen, nicht aber unter homöostatischen Konditionen [65]. Seine Liganden werden durch IFN- induziert, was den proinflammatorischen Charakter stützt [117]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten, dass CXCR5-CXCR3-DKO eine noch deutlichere Beeinträchtigung der intraepithelialen Anreicherung von T-Zellen unter homöostatischen wie entzündlichen Bedingungen zur Folge hatte. Über das klinische Bild betreffender Mäuse konnte anhand dieses Versuchsaufbaus keine Aussage getroffen werden, da die Tiere entweder im naiven Zustand oder zum Zeitpunkt maximaler Entzündungsaktivität unter

DSS aufgearbeitet wurden und darüber hinaus KO und Wt Zellen in einem Wt Organismus ansässig waren. Auch über die biologische Bedeutung dessen kann zu diesem Zeitpunkt daher nur spekuliert werden. Geht man davon aus, dass T-Zellen im Epithel unter DSS-Gabe vorzugsweise antiinflammatorische und regenerierende Funktionen übernehmen, führt ein zusätzlicher Mangel aufgrund von CXCR3 KO mutmaßlich zu einer Aggravierung des beobachteten Phänotyps. In der aktuellen Literatur gibt es wenig Daten für den Zusammenhang von CXCR3 und T-Zellen. Es konnte eine Population residenter Gedächtnis T-Zellen in der Maus identifiziert werden, welche in den mLNs lokalisiert ist und unter dem Einfluss von IL-17A orale Zweitinfektionen mit *Listeria monocytogenes* lokal begrenzen kann. Diese Subpopulation zeigte hohe Expressionslevel von CXCR3, und unter Inhibition von CXCR3 sowie IL-17A war die lymphonodale Bakterienlast deutlich erhöht. Es wurde somit postuliert, dass CXCR3 einen Einfluss auf die intranodale Zirkulation und Funktionalität von T-Zellen hat [138]. Diese Arbeit zeigt die supportive Funktion von CXCR3 bei lokalen Immunantworten und konnte damit einen konträren Effekt im Vergleich zu der meist proinflammatorischen Wirkungsweise von CXCR3 und seinen Liganden beschreiben. In humanen Biopsien der intestinalen Mukosa von CED Patienten beispielsweise sind CXCR3 sowie CXCL9, CXCL10 und CXCL11 überexprimiert. Entsprechend konnte in einem murinen CXCR3 KO Modell eine deutliche Reduktion der Entzündungsaktivität unter DSS-Gabe beschrieben werden, weswegen CXCR3 und seine Liganden auch als potentiell Therapieziel in der Behandlung von CED gelten. Über den Einfluss von CXCR3 auf die intraepitheliale Anreicherung von T-Zellen existieren keine Daten. Es zeigte sich jedoch eine verminderte Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen sowie Neutrophilen im Kolon der CXCR3 KO-Mäuse [117].

Zusammengefasst scheint die Migration von T-Zellen in das Epithel des Kolons durch das Vorhandensein von CXCR5 und CXCR3 beeinflusst zu werden, wobei diese Arbeit zumindest für CXCR5 auch eine funktionelle Relevanz zeigen konnte. Da nur ein geringer Anteil von T-Zellen die genannten Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche trägt, ist eine fehlende Expression dieser als alleiniger Erklärungsansatz für das Verhalten von CXCR5 KO-Mäusen während einer akuten Entzündung jedoch unzureichend. In der Annahme, dass insbesondere CXCR5 für gewebsspezifische Differenzierungsschritte der T-Zellen von Relevanz sein könnte, soll im Folgenden weiter auf mögliche Rezirkulationsstrategien der Zellen eingegangen werden. Die verminderte Anreicherung von T-Zellen unter CXCR5 KO im Peritoneum, wie anhand der vorgenommenen Transferexperimente gezeigt werden konnte, dient dabei als Grundlage für die weiteren Ausführungen.

4.2 Das Peritoneum als Prägungsort für das intestinale *Homing* von $\gamma\delta$ T-Zellen

Auch wenn das Peritoneum nicht zu den klassischen SLOs zählt, übernimmt es wichtige Funktionen in der Generierung und Regulation von Immunantworten. Einige Lymphozytensubpopulationen nutzen CXCR5 für die Migration ins Peritoneum [49]. So lässt sich unter CXCR5 KO in der Maus eine deutliche intraperitoneale Reduktion von B1-Zellen nachweisen [7], welche eine entscheidende Rolle in der raschen Antikörperproduktion gegenüber bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen spielen [21]. Berberich und Kollegen konnten zeigen, dass die Bedeutung des Peritoneums weiterhin darin besteht, Lymphozyten mit phänotypischen Merkmalen zu versehen, welche sie sekundär zur Rezirkulation in periphere Gewebe prädisponiert. Splenische B-Zellen zeigen nach Aufenthalt im Peritoneum eine Hochregulation intestinaler *Homing*moleküle, wie dem $\alpha 7$ -Integrin, mit folglich effizienterer Migration in den Dünndarm [20]. In Kenntnis dieser Daten wurde in der vorliegenden Arbeit hypothetisiert, dass $\gamma\delta$ T-Zellen CXCR5 nur teilweise direkt nutzen, um in das intestinale Epithel zu migrieren, unter dem Einfluss von CXCR5 jedoch eine gewebspezifische Differenzierung innerhalb des Peritoneums erfahren, welche sie zur Migration in das Kolon befähigt. Diese Annahme beruhte auf dem Umstand, dass eben nur ein geringer Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen CXCR5 exprimiert. Die postulierte transperitoneale Rezirkulationsroute lässt sich durch das Vorhandensein von V β 6V α 1⁺ T-Zellen in Peritoneum wie auch Kolon bekräftigen [139, 140]. Es wurde angenommen, dass, ergänzend zur CXCR5-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen selbst, die Migration anderer CXCR5-tragender Zellpopulationen ins Peritoneum beeinträchtigt sein könnte, welche normalerweise phänotypische Modifikationen an den $\gamma\delta$ T-Zellen vornehmen. Dies würde auf Grundlage der hiesigen Hypothese zu einer verminderten Einwanderung von $\gamma\delta$ T-Zellen in das intestinale Epithel beitragen. Entsprechend konnte in dieser Arbeit unter CXCR5 KO eine verminderte Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Kolon nachgewiesen werden. Untersuchungen in knochenmarkschimären Mäusen konnten diese Daten bezüglich der IEL, und tendenziell auch im Peritoneum, bestätigen. Die vergleichsweise geringe Anzahl von Versuchstieren unter entzündlichen sowie unter homöostatischen Konditionen führte dazu, dass insbesondere für die Untersuchungen im Peritoneum keine statistische Signifikanz erzielt werden konnte. Die Komplexität der angewandten Tiermodelle ließ eine Wiederholung der Experimente und Vergrößerung der Versuchsgruppen zur Manifestation der Ergebnisse während dieser Doktorarbeit jedoch nicht zu. Neben methodischen Erklärungsansätzen ist weiterhin zu diskutieren, ob eine Prägung der peritonealen CXCR5 KO $\gamma\delta$ T-Zellen theoretisch auch durch Wt-Zellen stattgefunden haben könnte, welche in den knochenmarkschimären Mäusen gleichzeitig ansässig waren. Dies könnte auch erklären, warum die Unterschiede in Bezug auf intraepitheliale

Wt und KO T-Zellen im Kolon nicht so groß waren, wie im Vergleich reiner Wt- und KO-Mäuse, da eine gewisse peritoneale Prägung noch hätte stattfinden können. Anhand von intravenösem Transfer von CXCR5 KO T-Zellen in KO-Mäuse war jedoch eine signifikante Reduktion von KO Zellen im Peritoneum und Kolon im Vergleich zu Wt-Zellen festzustellen, was dem dargelegten Interpretationsansatz widerspricht. Auch wenn die Hypothese einer peritonealen Prägung von T-Zellen unter dem Einfluss von CXCR5 nicht abschließend bewiesen werden konnte, zeigen die Ergebnisse einen Trend, welcher die Vermutung unterstützt. Ein zusätzlicher KO von CXCR3 verstärkte die verminderte peritoneale Anreicherung von T-Zellen unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen. CXCR3-Expression konnte für murine T-Zellen wie bereits erwähnt schon gezeigt werden [138]. In einer weiteren Arbeit konnte hierauf aufbauend gezeigt werden, dass der Migration von T-Zellen aus dem Peritoneum in den Darm ein Chemokinrezeptor-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt. Hierzu wurden naive sowie mit Pertussistoxin-behandelte Splenozyten intraperitoneal injiziert [123]. Über die Bindung an die Gi -Untereinheit inhibiert Pertussistoxin Signaltransduktionswege, welche durch Chemokinrezeptoren vermittelt werden. Dies konnte beispielsweise für CCR5 beschrieben werden [141]. Anhand dieses Experimentes ließ sich zeigen, dass Pertussistoxin-behandelte Zellen weniger effizient in den Darm einwandern konnten. Die beschriebene Migrationsroute schien somit ein Gi -abhängiger Prozess zu sein. Ob CXCR5 an dieser Stelle eine Rolle spielte, wurde jedoch nicht weiter untersucht und bleibt damit offen.

In der Summe scheint die verminderte intraepitheliale Anreicherung von CXCR5 KO T-Zellen partiell auf der Expression des Chemokinrezeptors selbst sowie ergänzend durch indirekte Effekte zustande zu kommen, welche durch den KO verursacht werden. Die noch nicht signifikanten Ergebnisse erfordern weitere Untersuchungen zur Untermauerung der Hypothese. Der sichtbare Trend in verschiedenen unabhängigen Ergebnissen, führte jedoch dazu, dass die Annahme der Chemokinrezeptor-abhängigen, intraperitonealen Prägung weiter untersucht wurde.

4.2.1 Potentiell bedeutsame Adhäsionsmoleküle für die transperitoneale Migration von $\gamma\delta$ T-Zellen in das entzündete Kolon

Es wurde weiter hypothetisiert, dass das peritoneale Mikromilieu T-Zellen mit phänotypischen Charakteristika ausstattet, welche sekundär die Migration in den Darm erleichtern. Zu den Adhäsionsmolekülen, welche mit dem *Homing* in den Darm assoziiert werden, zählen das $\alpha 7$ -Integrin, CD49d ($\alpha 4$ -Integrin), CD29 ($\alpha 1$ -Integrin), CD44 sowie LFA-1 (αL $\alpha 2$ -Integrin). In dieser Arbeit wurden die Expressionslevel dieser Adhäsionsmoleküle auf T-Zellen der Milz und des Peritoneums zunächst vergleichend bestimmt. Anschließend wurde überprüft, ob ein peritoneales

Priming für T-Zellen nachgewiesen werden kann. Für B-Zellen konnte dies bereits gezeigt werden, weswegen diese als Kontrolle dienen.

Das $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin dimerisiert mit CD49d zum $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin. Über die Bindung an MAdCAM-1 erfolgt die Extravasation von $\alpha 4 \beta 7$ -tragenden Zellarten, woraufhin diese in die intestinale Mukosa migrieren. MAdCAM-1 ist hochselektiv für Dünn- und Dickdarm [84], allerdings auch auf den HEVs der peritonealen *milky spots* nachzuweisen [7]. Die für diese Arbeit erfolgten Experimente konnten bezüglich beider Integrine eine Runterregulation auf T-Zellen des Peritoneums, verglichen zu denen aus der Milz, zeigen, bei jedoch bereits hohem peritonealen Expressionsmaß unter homöostatischen Bedingungen. Die B-Zellen zeigten, wie vorbeschrieben, eine Hochregulation des $\alpha 4 \beta 7$ -Integrins [20]. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich das $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin nur in moderaten Mengen auf naiven T-Zellen, jedoch in deutlich höherem Maße auf Effektor T-Zellen oder Memory T-Zellen nachweisen lässt [84]. Die untersuchte T-Zell-Population wurde hinsichtlich dessen nicht weiter subklassifiziert, es zeigte sich jedoch eine sehr inhomogene Verteilung der Expressionslevel sowohl vom $\alpha 7$ - als auch vom $\alpha 4$ -Integrin, gleichbedeutend mit dem Vorhandensein hoch- wie niedrig-exprimierender Zellen. Unter Induktion einer DSS-Kolitis konnte in anderen Arbeiten wiederum keine weitere Hochregulation von $\alpha 7$ -Integrin und CD49d beschrieben werden [123]. Die Tatsache, dass MAdCAM-1 auch auf den HEVs der *milky spots* exprimiert wird, lässt hypothetisieren, dass T-Zellen das $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin nutzen, um in das Peritoneum zu gelangen und es daraufhin runterregulieren. Dies könnte als Erklärungsansatz für die peritoneal niedrigeren Expressionslevel dienen. Anhand der vorliegenden Literatur lässt sich weiterhin untermauern, dass das $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin für T-Zell-abhängige Immunantworten im Darm auch direkt von Bedeutung zu sein scheint. Rezende und Kollegen konnten beispielsweise eine Subpopulation thymischer T-Zellen nachweisen, welche unter Expression von $\alpha 4 \beta 7$ in die PPs sowie Lamina propria des Dünndarmes einwandern und hier mittels Induktion CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen antiinflammatorische Effekte vermitteln [142]. Aber auch proinflammatorische Wirkungsweisen werden diskutiert. So wurde von Do und Kollegen kürzlich eine Subpopulation von T-Zellen in den mLN sowie Lamina propria und Epithel von Dünn- und Dickdarm beschrieben, welche sich unter entzündlichen Bedingungen hochexpressiv für das $\alpha 4 \beta 7$ zeigte und eine Kolitis durch Induktion von T_H1 und T_H17-Antworten aggravierte. Auch hier variierten die Expressionslevel oben genannter Integrine unter entzündlichen wie naiven Bedingungen, als auch im Vergleich verschiedener T-Zell-Subpopulationen untereinander [143].

CD49d und CD29 dimerisieren zum $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin (VLA-4). CD29 zeigte sich anhand der hier dargelegten Daten auf peritonealen im Vergleich zu splenozytären $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen hoch exprimiert. CD49d ist auf $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen des Peritoneums zwar schwächer nachzuweisen, als auf denen der Milz, bei in der Summe jedoch ähnlich hohen MFIs, verglichen zu CD29. B-Zellen zeigten hohe Expressionslevel beider Integrine. Die immunologische Bedeutung von VLA-4 besteht in der Bindung an VCAM-1, welches im Kolon unter entzündlichen Bedingungen hochreguliert wird. Es ist jedoch weniger darmspezifisch und beispielsweise auch im ZNS nachzuweisen [83, 84]. Über das Expressionsmaß von VLA-4 auf murinen $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen wird in der Literatur wenig beschrieben. Dies gilt insbesondere für Zellen des Darmes. Für humane $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen konnte eine Bedeutung von VLA-4 in der vaskulären Adhärenz an Endothelzellen sowie für die transendotheliale Migration beschrieben werden. Es wurde angenommen, dass es zur Einwanderung in entzündete Gewebe beitragen könnte [144-146]. Hohe Level von VLA-4 konnten weiterhin auf humanen $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen während einer aktiven Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* nachgewiesen werden [147]. In der Summe kann aufgrund der in dieser Arbeit gemessenen hohen Expressionslevel von VLA-4 auf peritonealen $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen vermutet werden, dass ein Einfluss auf akute Entzündungen besteht. Dass dies auch für eine Kolitis der Fall ist, bleibt bei der aktuellen Datenlage jedoch rein hypothetisch.

Die Messung der Expressionslevel von CD44 und LFA-1 zeigte auf $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen des Peritoneums im Vergleich zu allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Markern die höchsten MFIs. Dies war auch im Vergleich zu den MFIs splenozytärer und peritonealer B-Zellen auffällig, welche insbesondere bzgl. LFA-1 deutlich niedrigere Werte zeigten. CD44 ist ein Aktivierungsmarker, welcher auf Effektor T-Zellen und Gedächtnis T-Zellen exprimiert wird [88, 148]. Weiterhin bildet er einen Komplex mit VLA-4 und vermittelte die endotheliale Anheftung von Lymphozyten im Rahmen des Vier-Stufen-Modells der Lymphozytenmigration. Nach oraler Infektion mit *Listeria monocytogenes* lässt sich in murinen mLN eine Subpopulation von $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen nachweisen, welche hochexprimierend für CD44 ist und phänotypische wie funktionelle T_{mem} -Charakteristika aufweist. Zwar existieren auch bereits im naiven Zustand CD44-exprimierende $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zellen, z.B. in den peripheren Lymphknoten, diese unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Expression weiterer Oberflächenmoleküle sowie in der Zusammensetzung ihrer $\alpha \beta$ -TCRs. Nach oraler Zweitinfektion konnte die der mLN entstammende $\alpha 4 \beta 1$ -T-Zell-Population rasch im Blut sowie der Lamina propria des Dünndarmes nachgewiesen werden. Die im Blut zirkulierenden Zellen exprimierten darüber hinaus das $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin, was ihre Einflussnahme auf die intestinale Immunantwort bestärkte. Einschränkend ist zu sagen, dass es sich hierbei um kein universelles

Muster der Pathogen*clearance* zu handeln schien, da oben genannte Population nach oraler Infektion mit *Salmonella enterica* beispielsweise nicht nachzuweisen war. Weiterhin waren die Zellen nicht im intestinalen Epithel zu detektieren [149]. In dieser Arbeit wurde hypothetisiert, dass ein Mangel an intraepithelialen T-Zellen im CXCR5 KO zur Aggravierung einer akuten Kolitis beiträgt. Für IEL im Allgemeinen ist nachgewiesen, dass sie CD44 benötigen, um, nach Transfer in lymphopene Mäuse, in das intestinale Epithel zu migrieren [150]. In einer anderen Arbeit konnte CD44 weiterhin auf intraepithelialen T-Zellen nachgewiesen werden [151].

Das Adhäsionsmolekül LFA-1 bindet an ICAM-1, worüber ebenfalls die Extravasation aus dem Blutstrom ermöglicht wird. Wie die bereits erläuterten Adhäsionsmoleküle, ist LFA-1 somit auch für die Rekrutierung von Lymphozyten in entzündete Gewebe vonnöten [85, 86]. Anhand von ICAM-1 KO-Mäusen konnte eine Bedeutung der ICAM-1/LFA-1 Interaktion für die Rekrutierung von T-Zellen in die Kornea nach epithelialer Abrasion nachgewiesen werden. Es zeigten sich 50,9% weniger T-Zellen verglichen zum Wildtyp. Die epitheliale Wundheilung war entsprechend verlangsamt [152]. Huleatt und Kollegen konnten darüber hinaus den Einfluss von LFA-1 und ICAM-1 auf die Entwicklung des mukosalen Immunsystems des Dünndarmes sowie die intraepitheliale Anreicherung von T-Zell-Subpopulationen zeigen [153].

Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich für LFA-1 und CD44, aber auch für CD29 eine Bedeutung im Migrationsprozess von T-Zellen in das intestinale Epithel vermuten. Die Tatsache, dass sie auf peritonealen T-Zellen deutlich höher exprimiert werden als auf Zellen der Milz, stützt die hypothetischen Überlegungen des Vorliegens einer peritoneal-intestinalen Migrationsroute. Hinsichtlich LFA-1 wurde in einer auf diese Ergebnisse aufbauenden Arbeit eine noch deutlichere peritoneale Hochregulation von T-Zellen gezeigt. Auch diese Arbeit wies vergleichsweise kleine Versuchsgruppen auf, die einheitliche Tendenz unterstützt die Bedeutung von LFA-1 für die Migration von T-Zellen jedoch [123]. Bezüglich des $\alpha 4 \beta 7$ -Integrins, welches klassischerweise als *Homing*molekül für den Darm gilt, zeigt sich zwar eine Runterregulation von $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin auf peritonealen T-Zellen im Vergleich zu splenischen, da MAdCAM-1 jedoch auf den HEVs der peritonealen *milky spots* exprimiert wird, ist zu hypothetisieren, dass T-Zellen dieses Integrin möglicherweise nutzen, um in die Peritonealhöhle einzuwandern und es anschließend herunterregulieren. Auch im Peritoneum existieren weiterhin Subpopulationen, welche stark positiv für $\alpha 4 \beta 7$ sind und somit einen Phänotyp zeigen, welcher prinzipiell zur Migration in den Darm befähigen könnte. Kritisch zur Diskussion stehen dennoch die teils diskrepanten Messungen von Berberich und Kollegen in Bezug auf die B-Zellen im Vergleich zu hiesigen Daten. Während für das $\alpha 7 \beta 1$ -Integrin und $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin in beiden

Arbeiten eine Hochregulation der peritonealen Expressionslevel auf B-Zellen nachzuweisen war, konnten Berberich und Kollegen für das α 2-Integrin (Bestandteil von LFA-1) eine peritoneale Herabregulation und für das α 1-Integrin (CD29) keinen wesentlichen Unterschied zeigen. Insbesondere bzgl. CD29 unterschieden sich die Daten somit deutlich. Ursache dessen sind womöglich im methodischen Vorgehen zu sehen. Berberich und Kollegen injizierten Gesamtsplenozyten zunächst i.v. oder i.p. und gewannen die transferierten Zellen zur Messung der MFIs anschließend aus Milz und Peritoneum wieder [20]. Im Gegensatz dazu wurden die hier dargelegten Ergebnisse auf primär splenischen oder peritonealen Zellen gemessen. Möglicherweise hat dies die Ergebnisse beeinflusst. Welche Bedeutung diese Unterschiede für die Messungen der α 1-T-Zellen hat, lässt sich nur spekulieren. Ein direkter Nachweis peritonealer Migrationsrouten in das entzündete Kolon konnte in dieser Arbeit weiterhin noch nicht erbracht werden, weshalb an dieser Stelle Daten zu erwähnen sind, welche auf den hiesigen Ergebnissen aufbauten. Murine Splenozyten wurden während einer akuten DSS-Kolitis zunächst in das Peritoneum der Versuchstiere injiziert. Anhand der isolierten LPL sowie IEL des Kolons ließen sich α 1-T-Zellen nachweisen, welche der ursprünglich intraperitoneal injizierten Gesamtpopulation entstammten. Intraperitoneal injizierte Lymphozyten ließen sich in einem zweiten Experiment weiterhin zu einem größeren Anteil an den IEL verglichen zu intravenös injizierten Zellen nachweisen [123]. In der Summe konnte somit gezeigt werden, dass das Peritoneum eine entscheidende Rolle in der Migration von α 1-T-Zellen in das entzündete Kolon übernimmt.

4.2.2 Funktionelle und strukturelle Plastizität statt angeborener Konditionierung?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass transferierte α 1-T-Zellen durch den Aufenthalt in der Peritonealhöhle das Expressionsmaß ausgewählter Adhäsionsmoleküle dem primär peritonealer α 1-T-Zellen anpassen. Dies war für B-Zellen bereits bekannt und konnte in dieser Arbeit wiederum bestätigt werden. Die Ergebnisse waren besonders deutlich für CD44 und das α 7-Integrin sowie in etwas geringerem Maße für CD49d. Hinsichtlich LFA-1 und CD29 ließ sich eine Tendenz hin zu den Expressionsleveln zeigen, welche auf ursprünglich peritonealen B-Zellen und α 1-T-Zellen gemessen wurden, bei jedoch insgesamt schwächerem Effekt, als dies für die anderen Adhäsionsmoleküle sichtbar war. In der Summe ließ sich zudem feststellen, dass die gemessenen MFIs auf B-Zellen und α 1-T-Zellen vor wie nach intraperitonealen *Primings* bezüglich fast aller untersuchten Adhäsionsmoleküle niedriger waren. Eine methodische Schwäche könnte die Tatsache gewesen sein, dass die Zeitpunkte des intraperitonealen *Primings* (drei, vier und sieben Tage) jeweils in unterschiedlichen Mäusen stattfanden. Es ist davon auszugehen, dass das

peritoneale Mikromilieu mit seinen prägenden Einflüssen nicht von Maus zu Maus identisch gewesen sein mag. Bezüglich CD44 und LFA-1 konnten die hier erhobenen Daten jedoch in einer auf diese Versuche aufbauenden Arbeit mit Hilfe größerer Versuchsgruppen untermauert werden [123].

Intraperitoneale Prägung ist also in der Lage, den Phänotyp von T-Zellen zu verändern. Betrachtet man die Zellpopulation von Seiten entwicklungsphysiologischer Gesichtspunkte, erfolgt bereits im Thymus die Zuordnung zu T-Zell-Subpopulationen mit diversen festgelegten Kombinationen ihres TCR, welche sie zur Migration in spezifische Gewebe mit den dazugehörigen Effektorfunktionen qualifiziert [43]. So findet sich exklusiv in der murinen Epidermis beispielsweise eine Subpopulation von T-Zellen, welche einen invarianten V 5V 1 TCR exprimiert und auch als dendritische epidermale T-Zellen (DETC, *dendritic epidermal t cell*) bezeichnet werden. V 6V 1 positive T-Zellen finden sich bei der Maus hingegen im Epithel von Zunge, Lunge, dem Reproduktionstrakt sowie auch im Peritoneum. Auch in der Lamina propria des Kolons lassen sich interessanterweise V 6V 1⁺ T-Zellen nachweisen, wohingegen im Dünndarm V 7V 4, V 7V 5 und V 7V 6 exprimierende Subpopulationen dominieren [139, 140]. Darüber hinaus konnte für einige lymphatische Gewebe gezeigt werden, dass sich in diesen auch T-Zell-Subpopulationen anreichern, welche verschiedene TCR-Varianten zeigen. So lassen sich in den peripheren Lymphknoten sowohl V 1 als auch V 2 exprimierende T-Zellen nachweisen [154]. Diese für die meisten T-Zell-Subgruppen bereits frühzeitig in der Entwicklung festgelegten Merkmale hindern sie dennoch nicht an der Bewahrung einer gewissen funktionellen Plastizität. Je nach vorherrschendem Zytokinmilieu erfolgt eine Polarisierung der Zellen in die entsprechende Richtung. Zytokine, welche im Rahmen einer T_H1-Antwort vorherrschen, führen beispielsweise zur Produktion von INF- γ , während ein T_H17-typisches Milieu sie zur IL-17 Sekretion befähigt [140]. Viele weitere dieser modulatorischen Einflüsse sind bekannt und entscheiden darüber, ob eine Subpopulation im Zielgewebe inflammatorische oder immunoregulatorische Funktionen übernimmt. So konnten bereits frühere Arbeiten protektive Effekte von T-Zellen für den Verlauf einer DSS-Kolitis im Wildtyp nachweisen, während im Rahmen spontaner muriner Kolitismodelle auch proinflammatorische Effekte beschrieben werden [155]. Über den Einfluss des Peritoneums ist in diesem Zusammenhang wenig vorbeschrieben. Es ist bekannt, dass T-Zellen intraperitoneale Infektionen beeinflussen können. Nach Inokulation von *Escherichia coli* in das Peritoneum ist beispielsweise ein Anstieg von T-Zellen zu verzeichnen [156]. Auch während einer mittels *Listeria monocytogenes* vermittelten Peritonitis lassen sich T-Zellen als eine der ersten Populationen im Rahmen der akuten Abwehrreaktion

nachweisen [157]. Während diese Zellen mit dem Peritoneum als primäres Migrationsziel in jenes rekrutiert werden, handelt es sich bei der hier dargelegten Hypothese nur um einen Zwischenschritt auf dem Weg in das entzündete Kolon. Die Modulation der Expressionslevel von Adhäsionsmolekülen während des peritonealen Aufenthaltes konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, was die Plastizität hinsichtlich ihrer immunologischen Funktionen erneut bestätigt.

4.3 Ausblick: Pathophysiologische Funktionen von CXCR5

Das wissenschaftliche Interesse an der Chemokin-/Chemokinrezeptorachse im Menschen hat sich nicht zuletzt durch die Erkenntnisse zu CCR5 in der Krankheitsentstehung von HIV manifestiert. Als Co-Rezeptor für den Eintritt von HIV Typ 1 in T-Lymphozyten und Makrophagen erreichte der Rezeptor Bekanntheit und gilt seither als vielversprechendes Therapieziel [158]. Auch wenn es kein CXCR5 KO im Menschen gibt, welcher die erhobenen Daten des hier untersuchten Mausmodelles unmittelbar übertragen lässt, konnten bereits zahlreiche pathologische Zustände beschrieben werden, in denen CXCR5 auch beim Menschen involviert ist. Die Ausbildung von TLOs im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie der RA, dem Sjögrens Syndrom oder der Myasthenia gravis ist beispielsweise ein CXCR5/CXCL13-abhängiger Prozess [80]. Erhöhte Serumspiegel von CXCL13 im Menschen lassen weiterhin vermuten, dass CXCR5 in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen von Bedeutung sein könnte [159, 160]. Anhand humaner Gewebeproben von Patienten mit CU konnte gezeigt werden, dass abberante lymphatische Aggregate auch im Darm unter dem Einfluss von CXCR5 entstehen [161]. Weiterhin konnte in MC-Patienten die Bedeutung von CD4⁺CXCR5⁺ T-Zellen auf eine Erhöhung der Antikörperspiegel im Plasma unter dem Einfluss von IL-21 gezeigt werden [162]. Diese Daten sind insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass zumeist CCR9, CCR6 und CXCR10 als die für intestinale Immunantworten relevanten Chemokinrezeptoren gelten [53]. Bezüglich der CED existieren aktuell keine praktizierten Therapieregime, welche sich gegen CXCR5 oder dessen Liganden CXCL13 richten. Es wurde jedoch bereits ein Antikörper gegen CXCL13 entwickelt, welcher erfolgreich in der Behandlung von Mäusen mit einer Kollagen-induzierten Arthritis (entspricht RA beim Menschen) oder einer experimentellen Autoimmunenzephalitis (entspricht Multipler Sklerose beim Menschen) zum Einsatz gekommen ist. Die Entzündungsschwere der Arthritis sowie der Ausprägungsgrad neurologischer Symptome zeigte sich unter Behandlung betreffender Mäuse mit dem CXCL13-Antikörper in beiden Fällen abgeschwächt [163]. Auch im Rahmen hämatologischer und solider Malignome ist CXCR5 beim Menschen von Bedeutung, wobei die biologischen Effekte je nach Tumorentität sehr spezifisch und komplex sind. Neben dem Einfluss auf die Entstehung verschiedener Lymphome konnte insbesondere für die

Entstehung der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-CLL) eine besondere Bedeutung von CXCR5 und CXCL13 beschrieben werden. CXCR5-CXCL13 leitet die neoplastischen B-Zellen in das Knochenmark und die SLOs, wodurch sie Überlebenssignale erhalten, welche sie vor spontaner oder medikamentös-induzierter Apoptose schützen [164]. Für zahlreiche solide Tumoren ist weiterhin bekannt, dass eine verstärkte Expression von CXCR5-CXCL13 mit einer schlechteren Prognose einhergeht. In humanen Biopsien kolorektaler Karzinome konnten beispielsweise hohe Level von CXCR5 und CXCL13 mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien assoziiert werden [165]. Anhand von humanen Kolonkarzinomzelllinien konnte weiterhin ein negativer Einfluss der CXCR5-CXCL13-Achse in Bezug auf Tumorwachstum, Migration und Gewebsinvasion gezeigt werden [166]. Darüber hinaus ließ sich eine Überexpression von CXCL13 in Blut und Tumorgewebe von Mammakarzinom-Patientinnen nachweisen [167], einhergehend mit einem ungünstigen Einfluss der CXCR5-CXCL13-Achse auf die Prognose erkrankter Personen [168]. Es bestehen große Ambitionen, die CXCR5-CXCL13-Achse mittels pharmakologisch wirksamer Substanzen auf verschiedene Weisen zu adressieren, um die Tumorthherapie zukünftig effizienter zu gestalten. Die direkte Inhibition von CXCL13 oder CXCR5 mit Hilfe inhibitorischer Antikörper oder die genetische Ausschaltung mittels siRNAs sind nur einige vielversprechende Ansätze. Herausfordernd für all diese therapeutischen Grundlagen wird die spezifische Ausschaltung der malignen Zellen unter Schutz potentiell Tumoreliminierender Immunzellen sein [164]. Neben unmittelbarer Adressierung von CXCR5 als therapeutisches Ziel kann es beim Menschen jedoch auch als Biomarker verstanden werden, welcher in der Summe verschiedener Parameter auch von prognostischer Bedeutung für Tumorpatienten sein könnte. Dasselbe gilt für Patienten, welche aufgrund einer bakteriellen Pneumonie hospitalisiert sind. Jüngste Daten konnten eine Population von CXCR5⁺ CD8⁺ T-Zellen identifizieren, welche während einer schweren Pneumonie vermehrt im Blut erkrankter Personen nachzuweisen war und darüber hinaus eine positive Korrelation mit erhöhten Procalcitoninwerten zeigte [169]. Procalcitonin hat sich in den letzten Jahren als wichtiger Marker in der Diagnostik und Überwachung schwerer bakterieller Infektionen etabliert [170]. Die Bedeutung von CXCR5 für humane Pathologien ist also unbestritten und dürfte zukünftig interessante Ansätze in der Optimierung von Therapie und Diagnostik diverser Erkrankungen bieten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Loukas M., Bellary S.S., Kuklinski M., Ferraiola J., Yadav A., Shoja M.M., Shaffer K., and Tubbs R.S., *The lymphatic system: A historical perspective*. Clinical Anatomy, 2011. **24**(7): p. 807-816.
2. Yatim K.M. and Lakkis F.G., *A Brief Journey through the Immune System*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2015. **10**(7): p. 1274-1281.
3. Steiniger B.S., *Human spleen microanatomy: why mice do not suffice*. Immunology, 2015. **145**(3): p. 334-346.
4. Hopken U.E., Winter S., Achtman A.H., Kruger K., and Lipp M., *CCR7 regulates lymphocyte egress and recirculation through body cavities*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(4): p. 671-82.
5. Forster R., Davalos-Misslitz A.C., and Rot A., *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.
6. Muller G., Hopken U.E., Stein H., and Lipp M., *Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 1-8.
7. Hopken U.E., Achtman A.H., Kruger K., and Lipp M., *Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 709-18.
8. Ansel K.M., Ngo V.N., Hyman P.L., Luther S.A., Forster R., Sedgwick J.D., Browning J.L., Lipp M., and Cyster J.G., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
9. Cesta M.F., *Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen*. Toxicologic Pathology, 2006. **34**(5): p. 455-465.
10. Mowat A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**: p. 331.
11. Baptista A.P., Olivier B.J., Goverse G., Greuter M., Knippenberg M., Kusser K., Domingues R.G., Veiga-Fernandes H., Luster A.D., Lugering A., Randall T.D., Cupedo T., and Mebius R.E., *Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events*. Mucosal Immunology, 2012. **6**: p. 511.
12. Buettner M. and Lochner M., *Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon*. Frontiers in Immunology, 2016. **7**(342).
13. Beagley K.W., Fujihashi K., Lagoo A.S., Lagoo-Deenadaylan S., Black C.A., Murray A.M., Sharmanov A.T., Yamamoto M., McGhee J.R., and Elson C.O., *Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine*. The Journal of Immunology, 1995. **154**(11): p. 5611-5619.
14. Van Kaer L. and Olivares-Villagómez D., *Development, Homeostasis, and Functions of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2018. **200**(7): p. 2235-2244.
15. Vitale S., Picascia S., and Gianfrani C., *The cross-talk between enterocytes and intraepithelial lymphocytes*. Molecular and Cellular Pediatrics, 2016. **3**: p. 20.
16. Kunisawa J., Takahashi I., and Kiyono H., *Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine*. Immunological Reviews, 2007. **215**(1): p. 136-153.
17. Hooper L.V., *Chapter 3 - Epithelial Cell Contributions to Intestinal Immunity*, in *Advances in Immunology*, F.W. Alt, Editor. 2015, Academic Press. p. 129-172.
18. Wilkosz S., Ireland G., Khwaja N., Walker M., Butt R., de Giorgio-Miller A., and Herrick S.E., *A comparative study of the structure of human and murine greater omentum*. Anat Embryol (Berl), 2005. **209**(3): p. 251-61.
19. Lin C.Y., Kift-Morgan A., Moser B., Topley N., and Eberl M., *Suppression of pro-inflammatory T-cell responses by human mesothelial cells*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(7): p. 1743-50.
20. Berberich S., Forster R., and Pabst O., *The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4627-34.

21. Mebius R.E., *Lymphoid organs for peritoneal cavity immune response: milky spots*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 670-2.
22. Berberich S., Dahne S., Schippers A., Peters T., Muller W., Kremmer E., Forster R., and Pabst O., *Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2196-203.
23. Rangel-Moreno J., Moyron-Quiroz J.E., Carragher D.M., Kusser K., Hartson L., Moquin A., and Randall T.D., *Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 731-43.
24. Beelen R.H., Fluitsma D.M., and Hoefsmit E.C., *The cellular composition of omentum milky spots and the ultrastructure of milky spot macrophages and reticulum cells*. J Reticuloendothel Soc, 1980. **28**(6): p. 585-99.
25. Chaplin D.D., *Overview of the Immune Response*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
26. Anderson G. and Jenkinson E.J., *Lymphostromal interactions in thymic development and function*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 31-40.
27. Lind E.F., Prockop S.E., Porritt H.E., and Petrie H.T., *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development*. J Exp Med, 2001. **194**(2): p. 127-34.
28. Starr T.K., Jameson S.C., and Hogquist K.A., *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
29. MacDonald H.R., Radtke F., and Wilson A., *T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 219-24.
30. Liudahl S.M. and Coussens L.M., *Chapter 8 - To Help or To Harm: Dynamic Roles of CD4+ T Helper Cells in Solid Tumor Microenvironments*, in *Immunology*, M.A. Hayat, Editor. 2018, Academic Press. p. 97-116.
31. Sun B. and Zhang Y., *Overview of Orchestration of CD4+ T Cell Subsets in Immune Responses*, in *T Helper Cell Differentiation and Their Function*, B. Sun, Editor. 2014, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 1-13.
32. Makedonas G., Hutnick N., Haney D., Amick A.C., Gardner J., Cosma G., Hersperger A.R., Dolfi D., Wherry E.J., Ferrari G., and Betts M.R., *Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000798.
33. Chang J.T., Wherry E.J., and Goldrath A.W., *Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation*. Nat Immunol, 2014. **15**(12): p. 1104-15.
34. Chien Y.-h., Meyer C., and Bonneville M., *$\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond*. Annual Review of Immunology, 2014. **32**(1): p. 121-155.
35. Born W.K., Yin Z., Hahn Y.S., Sun D., and O'Brien R.L., *Analysis of gamma delta T cell functions in the mouse*. J Immunol, 2010. **184**(8): p. 4055-61.
36. Ribeiro S.T., Ribot J.C., and Silva-Santos B., *Five Layers of Receptor Signaling in gammadelta T-Cell Differentiation and Activation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 15.
37. Paul S., Shilpi, and Lal G., *Role of gamma-delta (gammadelta) T cells in autoimmunity*. J Leukoc Biol, 2015. **97**(2): p. 259-71.
38. Jones J.M. and Gellert M., *The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system*. Immunol Rev, 2004. **200**: p. 233-48.
39. Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R.S., Herrup K., Tonegawa S., and Papaioannou V.E., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
40. Carding S.R., Kyes S., Jenkinson E.J., Kingston R., Bottomly K., Owen J.J., and Hayday A.C., *Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression*. Genes Dev, 1990. **4**(8): p. 1304-15.
41. Bigby M., Markowitz J.S., Bleicher P.A., Grusby M.J., Simha S., Siebrecht M., Wagner M., Nagler-Anderson C., and Glimcher L.H., *Most gamma delta T cells develop normally in the absence of MHC class II molecules*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4465-75.

42. Correa I., Bix M., Liao N.S., Zijlstra M., Jaenisch R., and Raulet D., *Most gamma delta T cells develop normally in beta 2-microglobulin-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(2): p. 653-7.
43. Bonneville M., O'Brien R.L., and Born W.K., *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-78.
44. Born W.K., Kemal Aydintug M., and O'Brien R.L., *Diversity of gammadelta T-cell antigens*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 13-20.
45. Dar A.A., Patil R.S., and Chiplunkar S.V., *Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 366.
46. Bendelac A., Bonneville M., and Kearney J.F., *Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 177-86.
47. Hayday A.C., *Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 184-96.
48. Yang Y., Xu C., Wu D., Wang Z., Wu P., Li L., Huang J., and Qiu F., *$\gamma\delta$ T Cells: Crosstalk Between Microbiota, Chronic Inflammation, and Colorectal Cancer*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**: p. 1483.
49. Vantourout P. and Hayday A., *Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology*. Nature reviews. Immunology, 2013. **13**(2): p. 88-100.
50. Schmidt S., Moser M., and Sperandio M., *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies*. Molecular Immunology, 2013. **55**(1): p. 49-58.
51. Mitroulis I., Alexaki V.I., Kourtzelis I., Ziogas A., Hajishengallis G., and Chavakis T., *Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease*. Pharmacology & therapeutics, 2015. **147**: p. 123-135.
52. Nishimura M., Kuboi Y., Muramoto K., Kawano T., and Imai T., *Chemokines as Novel Therapeutic Targets for Inflammatory Bowel Disease*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1173**(1): p. 350-356.
53. Trivedi P.J. and Adams D.H., *Chemokines and Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease; Pitfalls and Promise*. Journal of Crohn's and Colitis, 2018. **12**(suppl_2): p. S641-S652.
54. Griffith J.W., Sokol C.L., and Luster A.D., *Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity*. Annual Review of Immunology, 2014. **32**(1): p. 659-702.
55. Fernandez E.J. and Lolis E., *Structure, Function, and Inhibition of Chemokines*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002. **42**(1): p. 469-499.
56. Rossi D. and Zlotnik A., *The Biology of Chemokines and their Receptors*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**(1): p. 217-242.
57. Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo J.-A., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez-Ramos J.C., and Gearing D., *Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation*. Nature, 1997. **387**: p. 611.
58. Hughes C.E. and Nibbs R.J.B., *A guide to chemokines and their receptors*. The FEBS Journal, 2018. **285**(16): p. 2944-2971.
59. Bachelier F., Ben-Baruch A., Burkhardt A.M., Combadiere C., Farber J.M., Graham G.J., Horuk R., Sparre-Ulrich A.H., Locati M., Luster A.D., Mantovani A., Matsushima K., Murphy P.M., Nibbs R., Nomiyama H., Power C.A., Proudfoot A.E.I., Rosenkilde M.M., Rot A., Sozzani S., Thelen M., Yoshie O., and Zlotnik A., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors*. Pharmacological reviews, 2013. **66**(1): p. 1-79.
60. Groom J.R. and Luster A.D., *CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions*. Immunology and cell biology, 2011. **89**(2): p. 10.1038/icb.2010.158.
61. Muller G., Hopken U.E., and Lipp M., *The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 117-35.
62. Allen S.J., Crown S.E., and Handel T.M., *Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism*. Annual Review of Immunology, 2007. **25**(1): p. 787-820.

63. Rot A. and Andrian U.H.v., *Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**(1): p. 891-928.
64. Antonelli A., Ferrari S.M., Giuggioli D., Ferrannini E., Ferri C., and Fallahi P., *Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases*. Autoimmunity Reviews, 2014. **13**(3): p. 272-280.
65. Groom J.R. and Luster A.D., *CXCR3 in T cell function*. Experimental cell research, 2011. **317**(5): p. 620-631.
66. Xie J.H., Nomura N., Lu M., Chen S.L., Koch G.E., Weng Y., Rosa R., Di Salvo J., Mudgett J., Peterson L.B., Wicker L.S., and DeMartino J.A., *Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 771-80.
67. Zhao Q., Kim T., Pang J., Sun W., Yang X., Wang J., Song Y., Zhang H., Sun H., Rangan V., Deshpande S., Tang H., Cvijic M.E., Westhouse R., Olah T., Xie J., Struthers M., and Salter-Cid L., *A novel function of CXCL10 in mediating monocyte production of proinflammatory cytokines*. Journal of Leukocyte Biology, 2017. **102**(5): p. 1271-1280.
68. Hsieh M.-F., Lai S.-L., Chen J.-P., Sung J.-M., Lin Y.-L., Wu-Hsieh B.A., Gerard C., Luster A., and Liao F., *Both CXCR3 and CXCL10/IFN-Inducible Protein 10 Are Required for Resistance to Primary Infection by Dengue Virus*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(3): p. 1855-1863.
69. Zhang Z., Kaptanoglu L., Haddad W., Ivancic D., Alnadjim Z., Hurst S., Tishler D., Luster A.D., Barrett T.A., and Fryer J., *Donor T Cell Activation Initiates Small Bowel Allograft Rejection Through an IFN- γ -Inducible Protein-10-Dependent Mechanism*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(7): p. 3205-3212.
70. Campanella G.S.V., Tager A.M., El Khoury J.K., Thomas S.Y., Abrazinski T.A., Manice L.A., Colvin R.A., and Luster A.D., *Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(12): p. 4814-4819.
71. Wuest T., Farber J., Luster A., and Carr D.J.J., *CD4(+) T Cell Migration into the Cornea is Reduced in CXCL9 Deficient but not CXCL10 Deficient Mice following Herpes Simplex Virus Type 1 Infection*. Cellular immunology, 2006. **243**(2): p. 83-89.
72. Dobner T., Wolf I., Emrich T., and Lipp M., *Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma*. European Journal of Immunology, 1992. **22**(11): p. 2795-2799.
73. Forster R., Mattis A.E., Kremmer E., Wolf E., Brem G., and Lipp M., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
74. Rezende R.M., Lanser A.J., Rubino S., Kuhn C., Skillin N., Moreira T.G., Liu S., Gabriely G., David B.A., Menezes G.B., and Weiner H.L., *$\gamma\delta$ T cells control humoral immune response by inducing T follicular helper cell differentiation*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 3151.
75. Ansel K.M., Harris R.B.S., and Cyster J.G., *CXCL13 Is Required for B1 Cell Homing, Natural Antibody Production, and Body Cavity Immunity*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 67-76.
76. Leong Y.A., Chen Y., Ong H.S., Wu D., Man K., Deleage C., Minnich M., Meckiff B.J., Wei Y., Hou Z., Zotos D., Fenix K.A., Atnerkar A., Preston S., Chipman J.G., Beilman G.J., Allison C.C., Sun L., Wang P., Xu J., Toe J.G., Lu H.K., Tao Y., Palendira U., Dent A.L., Landay A.L., Pellegrini M., Comerford I., McColl S.R., Schacker T.W., Long H.M., Estes J.D., Busslinger M., Belz G.T., Lewin S.R., Kallies A., and Yu D., *CXCR5+ follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles*. Nature Immunology, 2016. **17**: p. 1187.
77. Mazzucchelli L., Blaser A., Kappeler A., Schärli P., Laissue J.A., Baggolini M., and Ugucioni M., *BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma*. Journal of Clinical Investigation, 1999. **104**(10): p. R49-R54.
78. Winter S., Loddenkemper C., Aebischer A., Räbel K., Hoffmann K., Meyer T.F., Lipp M., and Höpken U.E., *The chemokine receptor CXCR5 is pivotal for ectopic mucosa-associated lymphoid tissue neogenesis in chronic Helicobacter pylori-induced inflammation*. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2010. **88**(11): p. 1169-1180.

79. Moschovakis G.L., Bubke A., Friedrichsen M., Falk C.S., Feederle R., and Förster R., *T cell specific Cxcr5 deficiency prevents rheumatoid arthritis*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 8933.
80. Finch D.K., Ettinger R., Karnell J.L., Herbst R., and Sleeman M.A., *Effects of CXCL13 inhibition on lymphoid follicles in models of autoimmune disease*. European Journal of Clinical Investigation, 2013. **43**(5): p. 501-509.
81. Smith C.W., 3. *Adhesion molecules and receptors*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008. **121**(2, Supplement 2): p. S375-S379.
82. Humphries J.D., Byron A., and Humphries M.J., *Integrin ligands at a glance*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(19): p. 3901-3903.
83. Gofu G., Rivera-Nieves J., and Ley K., *Role of β (7) integrins in intestinal lymphocyte homing and retention*. Current molecular medicine, 2009. **9**(7): p. 836-850.
84. Panés J. and Salas A., *Past, Present and Future of Therapeutic Interventions Targeting Leukocyte Trafficking in Inflammatory Bowel Disease*. Journal of Crohn's and Colitis, 2018. **12**(suppl_2): p. S633-S640.
85. Pavlick K.P., Ostanin D.V., Furr K.L., Laroux F.S., Brown C.M., Gray L., Kevil C.G., and Grisham M.B., *Role of T-cell-associated lymphocyte function-associated antigen-1 in the pathogenesis of experimental colitis*. International Immunology, 2006. **18**(2): p. 389-398.
86. Anderson M.E. and Siahaan T.J., *Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors*. Peptides, 2003. **24**(3): p. 487-501.
87. Sperandio M., *Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo*. The FEBS Journal, 2006. **273**(19): p. 4377-4389.
88. Goodison S., Urquidi V., and Tarin D., *CD44 cell adhesion molecules*. Molecular Pathology, 1999. **52**(4): p. 189-196.
89. Sneath R.J. and Mangham D.C., *The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia*. Molecular Pathology, 1998. **51**(4): p. 191-200.
90. Garnock-Jones K.P., *Vedolizumab: A Review of Its Use in Adult Patients with Moderately to Severely Active Ulcerative Colitis or Crohn's Disease*. BioDrugs, 2015. **29**(1): p. 57-67.
91. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Dore J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., Ehrlich S.D., and Wang J., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
92. Walters W.A., Xu Z., and Knight R., *Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD*. FEBS Lett, 2014. **588**(22): p. 4223-33.
93. Bennett M.S., Round J.L., and Leung D.T., *Innate-like lymphocytes in intestinal infections*. Curr Opin Infect Dis, 2015. **28**(5): p. 457-63.
94. Abraham C. and Cho J.H., *Inflammatory Bowel Disease*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(21): p. 2066-2078.
95. Bousvaros A., Antonioli D.A., Colletti R.B., Dubinsky M.C., Glickman J.N., Gold B.D., Griffiths A.M., Jevon G.P., Higuchi L.M., Hyams J.S., Kirschner B.S., Kugathasan S., Baldassano R.N., and Russo P.A., *Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **44**(5): p. 653-74.
96. Ananthakrishnan A.N., *Epidemiology and risk factors for IBD*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. **12**(4): p. 205-17.
97. Loftus E.V., Jr. and Sandborn W.J., *Epidemiology of inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Clin North Am, 2002. **31**(1): p. 1-20.
98. Rosen M.J., Dhawan A., and Saeed S.A., *Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents*. JAMA Pediatr, 2015: p. 1-8.

99. Kaplan G.G., *The global burden of IBD: from 2015 to 2025*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015.
100. De Matos V., Russo P.A., Cohen A.B., Mamula P., Baldassano R.N., and Piccoli D.A., *Frequency and clinical correlations of granulomas in children with Crohn disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008. **46**(4): p. 392-8.
101. Khor B., Gardet A., and Xavier R.J., *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 307-17.
102. Jostins L., Ripke S., Weersma R.K., Duerr R.H., McGovern D.P., Hui K.Y., Lee J.C., Schumm L.P., Sharma Y., Anderson C.A., Essers J., Mitrovic M., Ning K., Cleynen I., Theatre E., Spain S.L., Raychaudhuri S., Goyette P., Wei Z., Abraham C., Achkar J.P., Ahmad T., Amininejad L., Ananthakrishnan A.N., Andersen V., Andrews J.M., Baidoo L., Balschun T., Bampton P.A., Bitton A., Boucher G., Brand S., Buning C., Cohain A., Cichon S., D'Amato M., De Jong D., Devaney K.L., Dubinsky M., Edwards C., Ellinghaus D., Ferguson L.R., Franchimont D., Fransen K., Gearry R., Georges M., Gieger C., Glas J., Haritunians T., Hart A., Hawkey C., Hedl M., Hu X., Karlsen T.H., Kupcinskis L., Kugathasan S., Latiano A., Laukens D., Lawrance I.C., Lees C.W., Louis E., Mahy G., Mansfield J., Morgan A.R., Mowat C., Newman W., Palmieri O., Ponsioen C.Y., Potocnik U., Prescott N.J., Regueiro M., Rotter J.I., Russell R.K., Sanderson J.D., Sans M., Satsangi J., Schreiber S., Simms L.A., Sventoraityte J., Targan S.R., Taylor K.D., Tremelling M., Verspaget H.W., De Vos M., Wijmenga C., Wilson D.C., Winkelmann J., Xavier R.J., Zeissig S., Zhang B., Zhang C.K., Zhao H., Silverberg M.S., Annesse V., Hakonarson H., Brant S.R., Radford-Smith G., Mathew C.G., Rioux J.D., Schadt E.E., Daly M.J., Franke A., Parkes M., Vermeire S., Barrett J.C. and Cho J.H., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
103. Bamias G., Pizarro T.T., and Cominelli F., *Pathway-based approaches to the treatment of inflammatory bowel disease*. Transl Res, 2015.
104. Mizoguchi A., *Animal Models of Inflammatory Bowel Disease*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, P.M. Conn, Editor. 2012, Academic Press. p. 263-320.
105. Kolios G., *Animal models of inflammatory bowel disease: how useful are they really?* Current Opinion in Gastroenterology, 2016. **32**(4): p. 251-257.
106. Araki Y., Sugihara H., and Hattori T., *In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis*. Oncol Rep, 2006. **16**(6): p. 1357-62.
107. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., and Nakaya R., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
108. Perse M. and Cerar A., *Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 718617.
109. Eichele D.D. and Kharbanda K.K., *Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis*. World journal of gastroenterology, 2017. **23**(33): p. 6016-6029.
110. Petersson J., Schreiber O., Hansson G.C., Gendler S.J., Velcich A., Lundberg J.O., Roos S., Holm L., and Phillipson M., *Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(2): p. G327-33.
111. Van der Sluis M., De Koning B.A., De Bruijn A.C., Velcich A., Meijerink J.P., Van Goudoever J.B., Buller H.A., Dekker J., Van Seuning I., Renes I.B., and Einerhand A.W., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 117-29.
112. Ramulu S., Kale A.D., Hallikerimath S., and Kotrashetti V., *Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections*. J Oral Maxillofac Pathol, 2013. **17**(1): p. 23-30.
113. Erben U., Loddenkemper C., Doerfel K., Spieckermann S., Haller D., Heimesaat M.M., Zeitz M., Siegmund B., and Kühl A.A., *A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation*

- in mouse models*. International journal of clinical and experimental pathology, 2014. **7**(8): p. 4557-4576.
114. Williams I.R., *Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system*. Immunol Res, 2004. **29**(1-3): p. 283-92.
 115. Hermiston M.L., Xu Z., and Weiss A., *CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells*. Annual Review of Immunology, 2003. **21**(1): p. 107-137.
 116. Basu S., Ray A., and Dittel B.N., *Differential Representation of B Cell Subsets in Mixed Bone Marrow Chimera Mice Due to Expression of Allelic Variants of CD45 (CD45.1/CD45.2)*. Journal of immunological methods, 2013. **396**(0): p. 10.1016/j.jim.2013.07.008.
 117. Chami B., Yeung A.W., van Vreden C., King N.J., and Bao S., *The role of CXCR3 in DSS-induced colitis*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101622.
 118. Kanazawa H., Ishiguro Y., Munakata A., and Morita T., *Multiple accumulation of Vdelta2+ gammadelta T-cell clonotypes in intestinal mucosa from patients with Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(2): p. 410-6.
 119. Giacomelli R., Parzanese I., Frieri G., Passacantando A., Pizzuto F., Pimpo T., Cipriani P., Viscido A., Caprilli R., and Tonietti G., *Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease*. Clinical and Experimental Immunology, 1994. **98**(1): p. 83-88.
 120. Kuhl A.A., Pawlowski N.N., Grollich K., Loddenkemper C., Zeitz M., and Hoffmann J.C., *Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 168-75.
 121. Höpken U.E., Winter S., Achtman A.H., Krüger K., and Lipp M., *CCR7 regulates lymphocyte egress and recirculation through body cavities*. Journal of Leukocyte Biology, 2010. **87**(4): p. 671-682.
 122. Salmi M. and Jalkanen S., *Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment*. Immunological Reviews, 2005. **206**(1): p. 100-113.
 123. Peter F., *Gewebsspezifische Rekrutierung und Funktionalität von $\gamma\delta$ T-Zellen unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen*. Dissertation, Freie Universität Berlin, Refubium, 2015.
 124. Habtezion A., Nguyen L.P., Hadeiba H., and Butcher E.C., *Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon*. Gastroenterology, 2016. **150**(2): p. 340-54.
 125. Wengner A.M., Hopken U.E., Petrow P.K., Hartmann S., Schurigt U., Brauer R., and Lipp M., *CXCR5- and CCR7-dependent lymphoid neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(10): p. 3271-83.
 126. Koboziev I., Karlsson F., and Grisham M.B., *Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1207 Suppl 1**(Suppl 1): p. E86-E93.
 127. Velaga S., Herbrand H., Friedrichsen M., Jiong T., Dorsch M., Hoffmann M.W., Förster R., and Pabst O., *Chemokine Receptor CXCR5 Supports Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Formation, B Cell Homing, and Induction of Intestinal IgA Responses*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(5): p. 2610-2619.
 128. Junt T., Fink K., Forster R., Senn B., Lipp M., Muramatsu M., Zinkernagel R.M., Ludewig B., and Hengartner H., *CXCR5-dependent seeding of follicular niches by B and Th cells augments antiviral B cell responses*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7109-16.
 129. Matsuo K., Nagakubo D., Yamamoto S., Shigeta A., Tomida S., Fujita M., Hirata T., Tsunoda I., Nakayama T., and Yoshie O., *CCL28-Deficient Mice Have Reduced IgA Antibody-Secreting Cells and an Altered Microbiota in the Colon*. The Journal of Immunology, 2018. **200**(2): p. 800-809.
 130. Masahata K., Umemoto E., Kayama H., Kotani M., Nakamura S., Kurakawa T., Kikuta J., Gotoh K., Motooka D., Sato S., Higuchi T., Baba Y., Kurosaki T., Kinoshita M., Shimada Y., Kimura T., Okumura R., Takeda A., Tajima M., Yoshie O., Fukuzawa M., Kiyono H., Fagarasan S., Iida T., Ishii M., and Takeda K., *Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3704.

131. Kim C.H., Rott L.S., Clark-Lewis I., Campbell D.J., Wu L., and Butcher E.C., *Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(12): p. 1373-81.
132. Takebe T., Sakamoto K., Higami Y., and Harada Y., *A novel mouse model for tracking the fate of CXCR5-expressing T cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. **495**(2): p. 1642-1647.
133. Obermeier F., Schwarz H., Dunger N., Strauch U.G., Grunwald N., Schölmerich J., and Falk W., *OX40/OX40L interaction induces the expression of CXCR5 and contributes to chronic colitis induced by dextran sulfate sodium in mice*. European Journal of Immunology, 2003. **33**(12): p. 3265-3274.
134. Voigt I., Camacho S.A., de Boer B.A., Lipp M., Forster R., and Berek C., *CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T cell zone*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 560-7.
135. Caccamo N., Battistini L., Bonneville M., Poccia F., Fournie J.J., Meraviglia S., Borsellino G., Krocze R.A., La Mendola C., Scotet E., Dieli F., and Salerno A., *CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5290-5.
136. Chen Q., Wen K., Lv A., Liu M., Ni K., Xiang Z., Liu Y., and Tu W., *Human Vgamma9Vdelta2-T Cells Synergize CD4(+) T Follicular Helper Cells to Produce Influenza Virus-Specific Antibody*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 599.
137. Chen Y., Chou K., Fuchs E., Havran W.L., and Boismenu R., *Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14338-43.
138. Romagnoli P.A., Sheridan B.S., Pham Q.-M., Lefrançois L., and Khanna K.M., *IL-17A-producing resident memory $\gamma\delta$ T cells orchestrate the innate immune response to secondary oral Listeria monocytogenes infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(30): p. 8502-8507.
139. Hatano S., Tun X., Noguchi N., Yue D., Yamada H., Sun X., Matsumoto M., and Yoshikai Y., *Development of a new monoclonal antibody specific to mouse V γ 6 chain*. Life science alliance, 2019. **2**(3): p. e201900363.
140. Paul S., Singh A.K., Shilpi, and Lal G., *Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta (gammadelta) T cells in inflammation and tolerance*. Int Rev Immunol, 2014. **33**(6): p. 537-58.
141. Schneider O.D., Weiss A.A., and Miller W.E., *Pertussis toxin signals through the TCR to initiate cross-desensitization of the chemokine receptor CXCR4*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. **182**(9): p. 5730-5739.
142. Rezende R.M., da Cunha A.P., Kuhn C., Rubino S., M'Hamdi H., Gabriely G., Vandeventer T., Liu S., Cialic R., Pinheiro-Rosa N., Oliveira R.P., Gaublumme J.T., Obholzer N., Kozubek J., Pochet N., Faria A.M.C., and Weiner H.L., *Identification and characterization of latency-associated peptide-expressing gammadelta T cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8726.
143. Do J.-S., Kim S., Keslar K., Jang E., Huang E., Fairchild R.L., Pizarro T.T., and Min B., *$\gamma\delta$ T Cells Coexpressing Gut Homing α 487 and α E Integrins Define a Novel Subset Promoting Intestinal Inflammation*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2017. **198**(2): p. 908-915.
144. Mohaghehpour N., Bermudez L.E., Khajavi S., and Rivas A., *The VLA-4/VCAM-1 molecules participate in gamma delta cell interaction with endothelial cells*. Cell Immunol, 1992. **143**(1): p. 170-82.
145. Nakajima S., Roswit W.T., Look D.C., and Holtzman M.J., *A hierarchy for integrin expression and adhesiveness among T cell subsets that is linked to TCR gene usage and emphasizes V delta 1+ gamma delta T cell adherence and tissue retention*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1117-31.
146. Galea P., Brezinschek R., Lipsky P.E., and Oppenheimer-Marks N., *Phenotypic characterization of CD4-/alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells with a transendothelial migratory capacity*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 529-42.
147. Behr-Perst S.I., Munk M.E., Schaberg T., Ulrichs T., Schulz R.-J., and Kaufmann S.H.E., *Phenotypically Activated $\gamma\delta$ T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Tuberculosis*. The Journal of Infectious Diseases, 1999. **180**(1): p. 141-149.

148. DeGrendele H.C., Kosfiszter M., Estess P., and Siegelman M.H., *CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation*. J Immunol, 1997. **159**(6): p. 2549-53.
149. Sheridan B.S., Romagnoli P.A., Pham Q.-M., Fu H.-H., Alonzo F., 3rd, Schubert W.-D., Freitag N.E., and Lefrançois L., *$\gamma\delta$ T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 184-195.
150. Stankovic S., Zhan Y., and Harrison L.C., *Homeostatic proliferation of intestinal intraepithelial lymphocytes precedes their migration to extra-intestinal sites*. Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2226-33.
151. Kawaguchi-Miyashita M., Shimada S., Matsuoka Y., Ohwaki M., and Nanno M., *Activation of T-cell receptor-gammadelta+ cells in the intestinal epithelia of K6 transgenic mice*. Immunology, 2000. **101**(1): p. 38-45.
152. Byeseda S.E., Burns A.R., Dieffenbaugher S., Rumbaut R.E., Smith C.W., and Li Z., *ICAM-1 is necessary for epithelial recruitment of gammadelta T cells and efficient corneal wound healing*. The American journal of pathology, 2009. **175**(2): p. 571-579.
153. Huleatt J.W. and Lefrançois L., *$\beta 2$ Integrins and ICAM-1 Are Involved in Establishment of the Intestinal Mucosal T Cell Compartment*. Immunity, 1996. **5**(3): p. 263-273.
154. Carding S.R. and Egan P.J., *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
155. Paul S., Shilpi, and Lal G., *Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells in autoimmunity*. Journal of Leukocyte Biology, 2015. **97**(2): p. 259-271.
156. Takada H., Hiromatsu K., Matsuzaki G., Muramori K., and Nomoto K., *Peritoneal gamma delta T cells induced by Escherichia coli infection in mice. Correlation between Thy-1 phenotype and host minor lymphocyte-stimulating phenotype*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2062-9.
157. Ohga S., Yoshikai Y., Takeda Y., Hiromatsu K., and Nomoto K., *Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with Listeria monocytogenes*. Eur J Immunol, 1990. **20**(3): p. 533-8.
158. Bryant V.L. and Slade C.A., *Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy*. Immunology & Cell Biology, 2015. **93**(4): p. 364-371.
159. Singh U.P., Venkataraman C., Singh R., and Lillard J.W., Jr., *CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 111-23.
160. Singh U.P., Singh N.P., Murphy E.A., Price R.L., Fayad R., Nagarkatti M., and Nagarkatti P.S., *Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients*. Cytokine, 2016. **77**: p. 44-49.
161. Carlsen H.S., Baekkevold E.S., Johansen F.E., Haraldsen G., and Brandtzaeg P., *B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue*. Gut, 2002. **51**(3): p. 364-71.
162. Wang Z., Ding L., Wang Z., Wang J., Zhu N., Diao Y., Demmy T.A., Haitsma J.M., Lech-Maranda E.E., Bangia N.N., Czuczman M.A., Qian X., and Kovacs K.L., *Circulating CD4(+)CXCR5(+) T Cells Exacerbate B Cell Antibody Production in Crohn's Disease Through IL-21 Secretion*. Immunol Invest, 2015. **44**(7): p. 665-77.
163. Klimatcheva E., Pandina T., Reilly C., Torno S., Bussler H., Scrivens M., Jonason A., Mallow C., Doherty M., Paris M., Smith E.S., and Zauderer M., *CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders*. BMC immunology, 2015. **16**(1): p. 6-6.
164. Hussain M., Adah D., Tariq M., Lu Y., Zhang J., and Liu J., *CXCL13/CXCR5 signaling axis in cancer*. Life Sci, 2019. **227**: p. 175-186.
165. Qi X.W., Xia S.H., Yin Y., Jin L.F., Pu Y., Hua D., and Wu H.R., *Expression features of CXCR5 and its ligand, CXCL13 associated with poor prognosis of advanced colorectal cancer*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014. **18**(13): p. 1916-24.
166. Zhu Z., Zhang X., Guo H., Fu L., Pan G., and Sun Y., *CXCL13-CXCR5 axis promotes the growth and invasion of colon cancer cells via PI3K/AKT pathway*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2015. **400**(1): p. 287-295.

167. Panse J., Friedrichs K., Marx A., Hildebrandt Y., Luetkens T., Barrels K., Horn C., Stahl T., Cao Y., Milde-Langosch K., Niendorf A., Kroger N., Wenzel S., Leuwer R., Bokemeyer C., Hegewisch-Becker S., and Atanackovic D., *Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients*. Br J Cancer, 2008. **99**(6): p. 930-8.
168. Razis E., Kalogeras K.T., Kotoula V., Eleftheraki A.G., Nikitas N., Kronenwett R., Timotheadou E., Christodoulou C., Pectasides D., Gogas H., Wirtz R.M., Makatsoris T., Bafaloukos D., Aravantinos G., Televantou D., Pavlidis N., and Fountzilas G., *Improved outcome of high-risk early HER2 positive breast cancer with high CXCL13-CXCR5 messenger RNA expression*. Clin Breast Cancer, 2012. **12**(3): p. 183-93.
169. Shen Y., Qu Q.-X., Jin M.-N., and Chen C., *Investigating the role of circulating CXCR5-expressing CD8+ T-cells as a biomarker for bacterial infection in subjects with pneumonia*. Respiratory research, 2019. **20**(1): p. 54-54.
170. Wacker C., Prkno A., Brunkhorst F.M., and Schlattmann P., *Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2013. **13**(5): p. 426-35.

6. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Solveig Tetzlaff, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Chemokin-abhängige Rekrutierung und Funktionalität von T-Zellen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen* / *chemokine-dependent recruitment and functionality of t-cells under homeostatic and inflammatory conditions* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

7. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. PUBLIKATIONSLISTE

10/2013

Journal of Autoimmunity

Transition from an autoimmune-prone state to fatal autoimmune disease in CCR7 and ROR γ t double-deficient mice is dependent on gut microbiota

Wichner K, Fischer A, Winter S, **Tetzlaff S**, Heimesaat MM, Bereswill S, Rehm A, Lipp M, Höpken UE.

9. DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei Frau Dr. Uta Höpken bedanken, welche mich sowohl während meiner aktiven wissenschaftlichen Zeit am MDC als auch darüber hinaus stets unterstützte. Ihr habe ich es in erster Linie zu verdanken, dass ich meine Arbeit nach vielen Jahren des Nichtstuns nun doch abschließen konnte, weil sie mir sofort wieder mit ihrer unglaublichen Kompetenz und uneingeschränkten Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Es war ein großes Glück und ich bin sehr dankbar, dich Uta, als meine Betreuerin gehabt zu haben! In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch ganz herzlich für das immer kollegiale und fröhliche Miteinander aller Kollegen der AG Lipp bedanken. Hervorheben möchte ich hierbei Frau Dr. Katharina Wichner, Frau Dr. Kristina Heinig, Frau Kerstin Krüger sowie Frau Dr. Susann Winter. Vielen Dank auch an Herrn Dr.öHPö Rahn und Frau Kirstin Rautenberg für schier endlose Sorting-Sessions und stets exzellente technische Unterstützung. Weiterer Dank gebührt meinem Freund Julian Friebe, der mich stets ermutigte nicht den Glauben an einen erfolgreichen Promotionsabschluss zu verlieren und der mir durch seine unglaubliche Disziplin und Strebsamkeit immer eine große Motivationshilfe war. Auch möchte ich mich bei unserer kleinen Tochter Ylvie bedanken. Danke, dass du zu uns gekommen bist und mir durch die Elternzeit überhaupt die Möglichkeit gegeben hast, Zeit für den Abschluss dieses Projektes zu finden. Und danke, dass du (zumindest manchmal) artig geschlafen hast, wenn ich am Computer arbeiten und mich konzentrieren musste. Mama und Papa haben dich sehr lieb! Danke auch an meine Schwester Saskia für ihr untrügliches Adlauge hinsichtlich grammatikalischer und orthografischer Korrekturen. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die stets an mich geglaubt haben, mich in Zeiten fehlender Motivation und viel zu langen Kliniktagen jedoch nicht weiter unter Druck gesetzt haben. Ihr glaubt gar nicht wie entlastend es für mich war, nicht ständig nach dem aktuellen Stand der Dinge gefragt worden zu sein. Tausend Dank euch allen!