

Regulation der mukosalen Immunität durch eosinophile Granulozyten und die intestinale Mikroflora

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

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

vorgelegt von
Alexander Beller
aus Karaganda (Kasachstan)

Berlin, Januar 2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juli 2011 bis Dezember 2015 in den Arbeitsgruppen von PD Dr. rer. nat. Claudia Berek und Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Berlin angefertigt

Erstgutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Radbruch

Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Berlin

Zweitgutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel

Freie Universität, Berlin

Disputationstermin: 06. Juni 2016

Danksagung

Zuallererst geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. Andreas Radbruch für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das umfangreiche vermittelte Wissen und seine hilfreiche Betreuung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Bei PD Dr. Claudia Berek möchte ich mich für die Einführung in die Welt der Immunologie und ihre unermüdliche jahrelange Betreuung und Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit bedanken.

Bei Dr. Andrey Kruglov bedanke ich mich für seine umfangreiche Unterstützung sowohl theoretischer, als auch praktischer Art sowie unzählige Diskussionen und gemeinsame Kaffeepausen.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe von Prof. Radbruch danke ich für hilfreiche Diskussionen und zahlreiche Hinweise praktischer Art. Insbesondere geht mein Dank an Dr. Hyun-Dong Chang, Dr. Mir-Farzin Mashreghi, Stefanie Schmidt, Dr. René Riedel, Jakob Zimmermann, Dr. Özen Sercan, Dr. Anna Rao und Daniel Schulz.

Gudrun Steinhauser danke ich für jahrelange Zusammenarbeit und ihr geteiltes Wissen über den Alltag im Labor.

Unter den Kollegen aus dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum gilt mein Dank besonders Prof. Dr. Anja Hauser und Dr. Sandra Zehentmeier. Außerdem möchte ich mich bei den FCCF-Mitarbeitern Toralf Kaiser und Jenny Kirsch, den Veterinären und Tierpflegern Anja Schulz, Sabine Gruczek, Manuela Ohde, Vivien Theißig und Patrick Thiemann, den Labormanagerinnen Heidi Hecker-Kia, Heidi Schliemann, Tuula Geske und Annette Peddinghaus und den Mitarbeiterinnen der Medienküche Regina Schuck, Angela Lindner und Birgit Füßel bedanken.

Abschließend möchte ich mich besonders herzlich bei meiner Familie bedanken. Mein Sohn Viktor, meine Frau Jennie und meine Eltern haben mich all diese Jahre ermutigt und unterstützt. Für die nötige Ablenkung haben sie ab und zu ebenfalls gesorgt.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	3
INHALTSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	5
1.1 Physiologie des Darmtraktes von <i>Mus musculus</i>	5
1.1.1 Barrierefunktion des Darmepithels	5
1.1.2 Morphologie des Darmtraktes einer Hausmaus	8
1.2 Entwicklung von Peyer Plaques	13
1.2.1 Rolle von $LT\alpha$ in der PP-Entwicklung	14
1.2.2 Einfluss der Mikroflora auf die PP-Entwicklung	15
1.2.3 Einwanderung von T- und B-Lymphozyten in die Peyer Plaques	15
1.3 Humorale Abwehrmechanismen des Darmes	17
1.3.1 Die Rolle des IgA in der Darmimmunität	17
1.3.2 Generation des Antikörperrepertoires während der B-Zell-Entwicklung	18
1.3.2.1 Molekulare Vorgänge bei dem IgA-Klassenwechsel	18
1.3.2.2 Der T-Zell-unabhängige Weg der IgA Generierung	20
1.3.2.3 T-Zell-abhängige Weg der IgA Generierung	23
1.3.2.4 Einwanderung der IgA^+ Plasmazellen in die Lamina propria des Darms	25
1.4 Einfluss von Mikroflora auf die intestinale Immunhomöostase	26
1.5 Bedeutung der eosinophilen Granulozyten für das gastrointestinale Immunsystem	27
1.6 Zielsetzung der Arbeit	29
2. MATERIALIEN UND METHODEN	30
2.1 Materialien	30
2.2 Methoden	37
2.2.1 Versuchstiere	37
2.2.1.1 Eosinophil-defiziente Mausstämme	37
2.2.1.2 Vergesellschaftung der Tiere	38
2.2.2 Zellbiologische Methoden	38

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.1 Zellisolierung aus den Organen des gastrointestinalen Traktes	38
2.2.2.2 Erythrozyten-Lyse	40
2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl	40
2.2.2.4 Blocken von Fc γ -Rezeptoren	41
2.2.3 Durchflusszytometrische Methoden	41
2.2.3.1 Färbung von Oberflächenantigenen	41
2.2.3.2 Färbung von intrazellulären und intranukleären Antigenen	41
2.2.3.3 Durchflusszytometrie	42
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	43
2.2.4.1 Isolierung der genomischen DNA aus Mausbiopsien	43
2.2.4.2 Genotypisierung der PHIL-Mäuse	43
2.2.4.3 RNA Isolierung	44
2.2.4.4 cDNA Synthese	45
2.2.4.5 Analyse der bakteriellen DNA	45
2.2.4.6 Qualitative real time PCR (qRT-PCR)	46
2.2.5 Sonstige Methoden	47
2.2.5.1 Immunhistologische Methoden	47
2.2.5.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	49
2.2.5.3 Enzyme linked immunospot assay (ELISpot)	50
2.2.6 Statistische Auswertung	51
3. ERGEBNISSE	52
3.1 Die Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten führt zu Veränderungen der Zellpopulationen in den Immunkompartimenten des Dünndarmes	52
3.1.1 Untersuchung der Immunzellen in der Lamina propria des Dünndarmes	52
3.1.2 Analyse der intraepithelialen Lymphozyten des Dünndarmes	58
3.1.3 Analyse der Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere.	60
3.1.3.1 Bestimmung der Größe und der Struktur von Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse	60
3.1.3.2 Analyse der Zellpopulationen in der Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse	62
3.1.4 Zusammenfassung	71
3.2 Die Entwicklung der Peyer-Plaques in den eosinophil-defizienten Mäusen	72
3.2.1 Entwicklung der Peyer Plaques in der Ontogenese	72
3.2.2 Untersuchung der Lymphozyten-Einwanderung in die Peyer Plaques	73
3.2.3 Analyse der LT α -Zellpopulation in den Peyer Plaques	76
3.2.4 Analyse der LT β -Zellpopulation in den Peyer Plaques	78
3.2.5 Einfluss der Depletion der eosinophilen Granulozyten auf die Immunkomponenten des Dünndarmes	80
3.2.5.1 Die Depletion der eosinophilen Granulozyten bewirkt keinen messbaren Effekt an dem Gewicht der Peyer Plaques	82

Inhaltsverzeichnis

3.2.5.2 Die Depletion der eosinophilen Granulozyten in den BALB/c Mäusen führt zu den Veränderungen der IgA ⁺ Plasmazellen der Lamina propria	83
3.2.6 Zusammenfassung	86
3.3 Der Einfluss der Mikroflora auf die Immunkompartimente des Dünndarmes	87
3.3.1 Die BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse besitzen unterschiedliche Mikroflora	87
3.3.2 Die Analyse des Einflusses der Vergesellschaftung auf die Immunkomponenten der Lamina propria	89
3.3.3 Analyse der IEL-Populationen in den vergesellschafteten Tieren	96
3.3.4 Auswirkung der Vergesellschaftung auf die Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Mäuse	98
3.3.4.1 Mikrofloraausgleich bewirkte Veränderungen in den Immunfunktionen der Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse	98
3.3.4.2 Der Austausch der Mikroflora beeinflusst nicht die Größe der Peyer-Plaques in den eosinophil-defizienten Mäusen	105
3.3.5 Die Analyse der Darmimmunkompartimente der PHIL-Mäuse	107
3.3.6 Zusammenfassung	114
4. DISKUSSION	115
4.1 Der Einfluss der Mikroflora auf die Entwicklung und die Funktion des mukosalen Immunsystems	115
4.2. Der Einfluss des IgA auf das Mikrobiom	116
4.3. Einfluss der Vergesellschaftung auf das mukosale Immunsystem	117
4.4 Direkter Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf das intestinale Immunsystem	119
4.5 Der Einfluss der Mikroflora auf eosinophile Granulozyten	122
4.6 Der Einfluss der IgA-Antikörper auf eosinophile Granulozyten	123
4.7 Schlussfolgerung	123
5. ZUSAMMENFASSUNG	124
6. SUMMARY	126
7. VERZEICHNIS DER ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	128
8. LEBENSLAUF	129
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	130

10. TABELLENVERZEICHNIS	133
11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
12. LITERATURVERZEICHNIS	137

1. Einleitung

Die Entdeckung der mukosalen Immunität geschah vor nun fast einhundert Jahren. Bereits 1919 beschrieb ein Schüler von Ilja Metschnikow, Alexander Besredka, sein Konzept der örtlichen, spezialisierten Immunität des Darmes. In den folgenden Jahrzehnten haben zahlreiche Entdeckungen zum Verständnis der gastrointestinalen (GI) Immunität beigetragen. Die Entdeckung der Antikörper im Stuhl der Dysenterie-Patienten¹, die Beschreibung der antikörperproduzierenden Plasmazellen in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes², die Existenz der sekretorischen Form des Immunoglobulins A (IgA)³ und die Fähigkeit einiger Darmbakterien Keimzentrumsreaktionen in den Peyer Plaques (PPs) zu aktivieren⁴ werden unter anderem als Meilensteine der Darm-assoziierten Immunität anerkannt. 1971 wurden die Peyer Plaques als der Hauptentstehungsort der IgA⁺ Plasmazell-Vorläufer⁵, welche unter anderem die Lamina propria des Darmes besiedeln können⁶, beschrieben. Durch diese und zahlreiche andere Entdeckungen wird die gastrointestinale Immunität heutzutage als ein wichtiger Teil des Immunabwehrsystems anerkannt.

1.1 Physiologie des Darmtraktes von *Mus musculus*

Der Darm eines Säugertieres bildet die größte Oberfläche des Körpers und ist in einem engen Kontakt zu den Nährstoffen, symbiotischer Mikroflora und Pathogenen. Um den Körper vor den Mikroorganismen effektiv zu schützen, ist der Darm mit dem Großteil des lymphatischen Gewebes assoziiert und enthält den Großteil aller Zellen des Immunsystems im Organismus. Die Hauptaufgabe des Darmes besteht neben der Verdauung und Absorption von Nährstoffen und Wasser darin, eine effektive Schutzbarriere zwischen der antigenreichen Außenumgebung und dem inneren Milieu des Organismus sicherzustellen. Die Strategien, die dafür verwendet werden beinhalten unter anderem eine durch das Epithel sichergestellte physikalische Barriere, die Produktion antibakterieller Peptide und insbesondere organisierte lymphatische Strukturen deren Hauptaufgabe darin besteht IgA zu produzieren.

1.1.1 Barrierefunktion des Darmepithels

Der darmspezifische Schutzmechanismus des Epithels besteht vor allem in der Herstellung einer physikalischen Barriere zwischen dem Organismus und dem Darminhalt. Darüber hinaus wird die Barrierefunktion der normalen Darmepithelzellen (Enterozyten) durch eine Reihe von spezialisierten Epithelzellen unterstützt.

1. Einleitung

Die Goblet-Zellen (Becherzellen) kommen gehäuft in den distalen Abschnitten des Darmes (Krummdarm und Dickdarm, Abbildung 1) vor. Dabei handelt es sich um Epithelzellen, die sich auf Schleimproduktion (Mucus) spezialisiert haben. Der sekretierte Schleim dient als eine zusätzliche mechanische Barriere gegen die Krankheitserreger im Darm. Einen wichtigen Bestandteil des Schleimes bildet die Glykokalix, eine Schicht aus kovalent gebundenen Glykoproteinen und Polysacchariden auf der Außenfläche der Epithelschicht. Die Glykokalix schützt das Darmepithel vor mechanischen und chemischen Beschädigungen und bietet zusätzlich den Schutz vor Selbstverdauung. Zusätzlich zur Schleimproduktion sind die Goblet-Zellen in der Lage Darmantigene aus dem Darmlumen aufzunehmen und an die die Lamina propria besiedelten CD103⁺ (Integrin α_E) dendritischen Zellen (DC) zu übergeben⁷.

Die Paneth-Zellen sind ebenfalls hochspezialisierte Epithelzellen, welche antibakterielle Peptide (u.a. Lysozyme und Defensive) bilden und sekretieren. Im Gegensatz zu den normalen Enterozyten sind die Paneth-Zellen langlebig und sind in den Lieberkühn-Krypten des Dünndarmes lokalisiert.

Neben den Enterozyten und den spezialisierten Epithelzellen sind zahlreiche T-Lymphozyten (intraepitheliale Lymphozyten, IELs) in das Darmepithel eingelagert, wo sie auf der basalen Membran zwischen den Enterozyten lokalisiert sind⁸. Durch ihren Kontakt zu den Enterozyten und die unmittelbare Nachbarschaft zu den Darmantigenen bilden sie einen Teil der ersten Abwehrlinie gegen die Pathogene. Die IELs sind Antigen-aktivierte, im Gewebe residenten Zellen, welche typische Oberflächenmarker wie CD44 und CD69 exprimieren⁹. Zusätzlich exprimieren IELs das CD103-Molekül, welches mit dem E-Cadherin der Enterozyten interagiert und somit das Verbleiben der IELs in der Epithelschicht ermöglicht¹⁰. Obwohl alle IELs ein aktiviertes Phänotyp aufweisen, können sie in zwei Populationen nach dem Ursprung ihrer Aktivierung aufgeteilt werden. Die induzierten „klassischen“ IELs (auch bekannt als Typ A IELs) stammen von den herkömmlichen CD4⁺ oder CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Lymphozyten ab und erlangen ihr aktiviertes Phänotyp nach dem Verlassen von Thymus in der Peripherie. Sie exprimieren $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TCR $\alpha\beta$) und das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer¹¹.

Die natürlichen „nicht klassischen“ T-Zellen vom Typ B dagegen exprimieren das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer und tragen entweder einen TCR $\alpha\beta$ oder einen TCR $\gamma\delta$ an ihrer Oberfläche. Sie werden während ihrer Entwicklung im Thymus aktiviert und stammen vermutlich von den doppelpositiven Thymozyten ab, die ihre Differenzierung direkt im Darm abschließen¹².

1. Einleitung

Die natürlichen IELs regulieren die Expression von Darmniwanderungsmolekülen wie Integrin $\alpha_E\beta_7$ und CCR9 bereits im Thymus hoch und werden direkt zum Epithel des Dünndarmes, dank der Produktion von entsprechenden Liganden E-Cadherin und CCL25 durch die Enterozyten, rekrutiert¹³. Ein kleiner Teil der induzierten IELs kann ebenfalls das Epithel des Dünndarmes direkt aus dem Thymus besiedeln¹³, aber im Allgemeinen exprimieren die herkömmlichen T-Lymphozyten keine Darmeinwanderungsrezeptoren und benötigen dafür eine Aktivierung im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT, *gut associated lymphatic tissue*)¹⁴. Nach der Aktivierung exprimieren die T-Lymphozyten Moleküle, welche ihnen erlauben in das Darmgewebe einzuwandern¹⁵. Dazu zählen unter anderem VLA1 (*very late antigen 1*, Integrin $\alpha_1\beta_1$, bindet an das Kollagen), Integrin $\alpha_4\beta_7$ (Ligand für MadCAM-1) und CCR9 (Rezeptor für CCL25). Die Expression von CD103 an den IELs wird durch TGF- β (*transforming growth factor β*) induziert¹⁶ und durch den CCR9-Signalweg begünstigt¹⁷.

Obwohl die genauen Funktionen der IELs bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt sind, scheint ihre Hauptaufgabe darin zu bestehen, das Gleichgewicht zwischen der Abwehr der Pathogene aus dem Darmlumen und der Unversehrtheit der Epithelschicht zu halten¹⁸. Die natürlichen TCR $\gamma\delta^+$ IELs sind zum einen in die Reparatur der Epitheliumschicht involviert¹⁹, zum anderen wurden sie für den Immunoglobulin-Klassenwechsel und die IgA-Produktion als wichtig beschrieben²⁰. Außerdem wurde gezeigt, dass die natürlichen TCR $\gamma\delta^+$ IELs eine Reihe von Faktoren produzieren, darunter TGF- β_1 , welches ebenfalls für den IgA-Klassenwechsel von Bedeutung ist²¹. In den Studien der klassischen CD8 $\alpha\beta^+$ IELs wurde ihre abwehrende Rolle bei zahlreichen Infektionen nachgewiesen²²⁻²⁴. Das vollständige Verständnis über die immunologische Rolle jeder IEL-Population ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vorhanden.

1. Einleitung

1.1.2 Morphologie des Darmtraktes einer Hausmaus

Der Darm wird bei den Mäusen anatomisch in zwei große Abschnitte unterteilt (Abbildung 1): den Dickdarm (lat. *Intestinum crassum*) und den Dünndarm (lat. *Intestinum tenue*). Der Dünndarm einer Maus besteht seinerseits aus drei nicht festdefinierten etwa gleich großen Abschnitten: aus dem Zwölffingerdarm (lat. *Duodenum*), welcher dem Magen am nächsten ist, dem Leerdarm (lat. *Jejunum*) und dem Krummdarm (lat. *Ileum*), welcher in den Dickdarm übergeht (Abbildung 1). Der Dickdarm wird ebenfalls in drei Abschnitte unterteilt: er fängt mit dem Blinddarm (lat. *Caecum*) an, auf welchen der Grimmdarm (lat. *Colon*) und der Enddarm (lat. *Rectum*) folgen (Abbildung 1). Der Dünn- und der Dickdarm unterscheiden sich außerdem in ihrer Größe. Der Dickdarm ist wesentlich kürzer, hat aber einen größeren Durchmesser.



Abbildung 1: Anatomischer Aufbau des Darmtraktes einer Maus.

Der Darm einer Hausmaus besteht aus zwei großen Abschnitten: dem Dünndarm und dem Dickdarm. Der Dünndarm wird in den Zwölffingerdarm (I-II), den Leerdarm (II-III) mit Peyer Plaques (in einem Kreis) und den Krummdarm (III-IV) unterteilt. Der Dickdarm besteht aus dem Blinddarm (V) und dem Grimmdarm mit dem Enddarm (VI-VII).

Im Abdomen sind große Teile des Darmes über ein Mesenterium (Gekröse) elastisch aufgehängt, welches Binde- und Fettgewebe, sowie zahlreiche Gefäße und Nerven zur Versorgung des Darmes enthält.

1. Einleitung

Gegenüber dem Ansatz des Mesenteriums, auf der Höhe des Zwölffingerdarmes und besonders auf Höhe des Krummdarmes befinden sich organisierte lymphatische Strukturen (Abbildung 1). Diese werden nach ihrem Entdecker, dem schweizer Anatomen Johann Conrad Peyer Peyer Plaques (PP) genannt. Die Peyer Plaques stellen Ansammlungen von mehreren Lymphfollikeln dar und sind für die Ausbildung der erworbenen Immunität des Darmes von großer Bedeutung.

Morphologisch lassen sich die Peyer Plaques in drei Hauptbereiche aufteilen: folliculäre und parafolliculäre Zonen, sowie das follicel-assoziierte Epithel (FAE) (Abbildung 2). Im Gegensatz zu den Lymphknoten besitzen PPs keine Kapsel, Medulla und afferente lymphatische Gefäße. Das FAE ist eine Einzelzellschicht zwischen dem lymphatischen Organsystem des Darmes und dem Darmlumen. Es ist durch keine Mukusschicht bedeckt und enthält neben den normalen Darmepithelzellen (Enterozyten) die hochspezialisierten Mikrofaltenzellen (M-Zellen) (Abbildung 2).

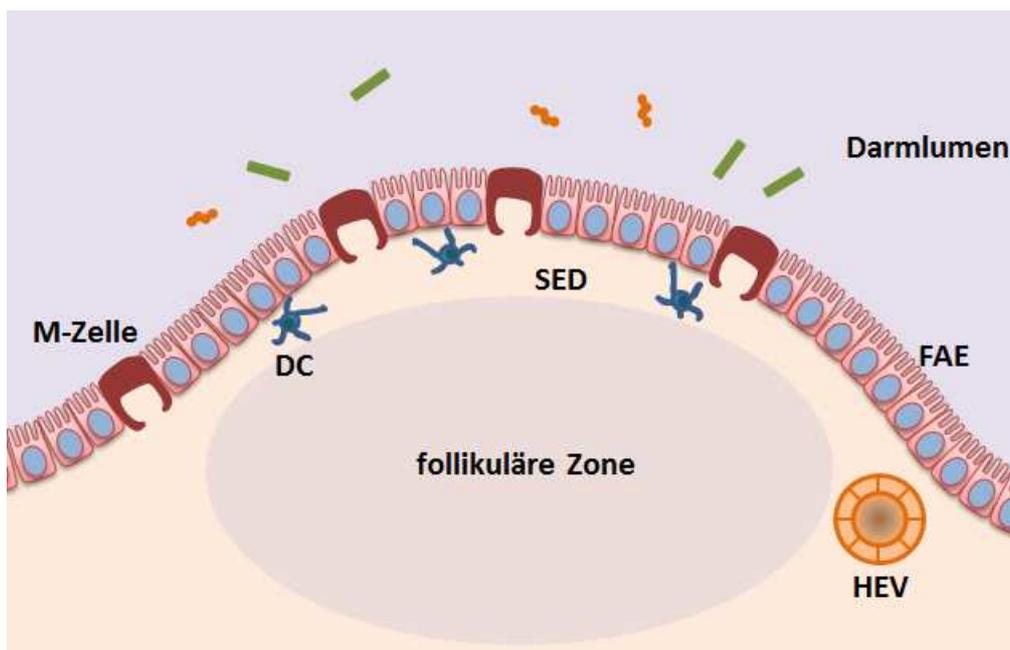


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Peyer-Plaques.

Die Peyer-Plaques lässt sich in drei unterschiedliche Zonen aufteilen: folliculäre und parafolliculäre Zonen sowie das follicel-assoziierte Epithel. Die folliculäre Zone enthält einen B-Zellfollikel, welches eines oder mehrere Keimzentren enthalten und von T-Zellen umgeben sind. Das FAE enthält neben Enterozyten auch M-Zellen, welche für die Antigenaufnahme aus dem Darm-lumen zuständig sind. Der subepithelialer Raum enthält zahlreiche dendritische Zellen, welche die Antigene von den M-Zellen zu den Follikeln transportieren.

1. Einleitung

Eine M-Zelle besitzt an ihrer basalen Membranseite eine Tasche, wo B- und T-Zellen, sowie Makrophagen und dendritische Zellen untergebracht werden. Im Gegensatz zu den normalen Enterozyten weder sekretieren die M-Zellen Verdauungsenzyme und Schleim, noch verfügen sie über eine Glykokalixschicht auf ihrer lateralen Oberfläche und sind durch viele kleine zytoplasmatische Vesikel und wenige Lysosomen charakterisiert²⁵. Dadurch sind sie für die Mikroorganismen und Partikel leicht zugänglich und bilden somit den Haupteintrittsweg für Antigene aus dem Darmlumen zu dem subepithelialen Raum (*subepithelial dome region*, SED), welcher zahlreiche dendritische Zellen (DC) enthält (Abbildung 2). Dies ermöglicht die Präsentation der Darmantigene für die Zellen des Immunsystems. Das FAE enthält ebenfalls IELs, einige Mukus-sekretierende Goblet-Zellen und dendritische Zellen. Letztere können die Pseudopods durch das Epithel ausstrecken und die Antigene einfangen⁷.

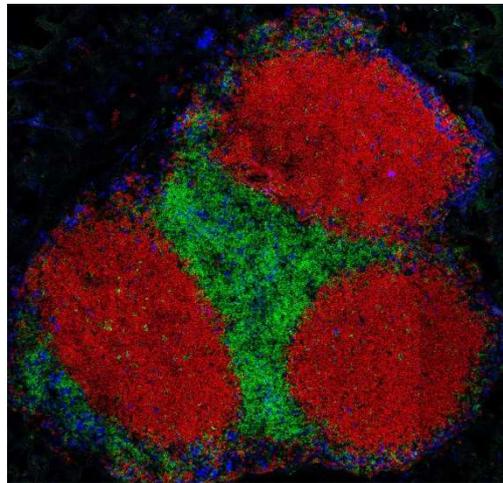


Abbildung 3: Follikuläre Struktur einer Peyer Plaque.

Eine Peyer Plaque enthält mehrere B-Zell-Follikel (rot, B220), sowie T-Zell-Zonen (grün, CD4), welche sich zwischen den Follikeln befinden. Der subepitheliale Raum (SED) enthält zahlreiche dendritische Zellen (blau, CD11c).

Histologisch besteht eine Peyer Plaque aus mehreren B-Zell-Follikeln, sowie kleineren T-Zell-Regionen, die sich zwischen den Follikeln befinden (Abbildung 3). Die Wölbung unter dem Epithel enthält zahlreiche dendritische Zellen und Lymphozyten. Im Gegensatz zu den Lymphknoten enthalten die Peyer Plaques immer Keimzentren, was ein Anzeichen für die fortwährende Immunstimulation ist.

Darüber hinaus besitzen die Peyer Plaques mehrere hochendotheliale Venole (HEV), kleine venöse Blutgefäße, welche mit den kubischen anstelle der flachen Endothelzellen

1. Einleitung

ausgekleidet sind und den Eintritt der Lymphozyten aus der Blutbahn in die inneren Bereiche der Peyer Plaques ermöglichen. Die Peyer Plaques sind durch Lymphgefäße mit den ableitenden Mesenteriallymphknoten (mLN) verknüpft.

Die Mesenteriallymphknoten sind die größten Lymphknoten im Körper und liegen im mesenterialen Bindegewebe. Im Gegensatz zu den Peyer Plaques besitzen sie eine für die Lymphknoten typische Organisation und einen adäquaten Aufbau. Obwohl die Darmbakterien eines gesunden Organismus die mLN nicht erreichen können, werden die Antigene via afferente lymphatische Gefäße durch die migratorische Monozyten und dendritische Zellen aus dem Darm zu den mLN transportiert und dort präsentiert^{26, 27}. Außerdem sind die mLN für die Filtration der Lymphe aus unterschiedlichen Darmregionen zuständig²⁸.

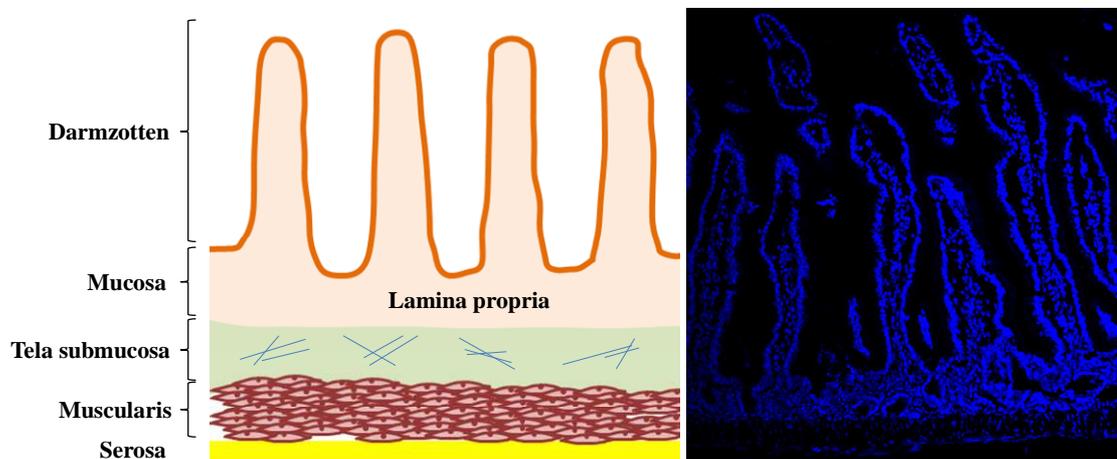


Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Darmwand.

Die Darmschleimhaut bildet zahlreiche Zotten aus, welche die effektive Darmschleimhautfläche vervielfachen. Unter der Einzelzellschicht des Epithels liegt die Lamina propria, welche zahlreiche Zellen des Immunsystems enthält. Darunter ist die Darmwand mit einer Schicht des Bindegewebe (Tela submucosa) und der Glattmuskulatur (Muscularis) ausgekleidet. Die äußere Auskleidung der Darmwand besteht aus einer Serosa-Schicht.

Betrachtet man den Längsschnitt durch den Dünndarm (Abbildung 4) so werden die zahlreichen fingerförmigen Erhebungen der Darmschleimhaut sichtbar. Es handelt sich um die sogenannten Darmzotten, welche durch Fortsätze der Eigenschicht der Darmschleimhaut (lat. *Lamina propria mucosae*, LP) entstehen und mit Epithelschicht bedeckt sind. Die Darmzotten kleiden das gesamte Dünndarminnere aus und vervielfachen somit die effektive Fläche des verdauungsaktiven Epithels.

1. Einleitung

Alle Darmabschnitte besitzen den typischen, schichtartigen Aufbau der Darmwand. Das komplette Darminnere ist mit Darmepithel ausgekleidet. Darunter liegt die Lamina propria, eine dünne Schicht aus dem locker verpacktem Bindegewebe, welche zwischen der Epithel- und Muskelgewebesicht liegt und unter anderem Nerven, Blut- und Lymphgefäße enthält. Unter der Schleimhaut des Darmes liegt eine Schicht des Bindegewebes, die sogenannte Tela submucosa, welche durch eine Schicht der Glattmuskulatur (lat. *Muscularis*) und schließlich eine äußere Serosaschicht ausgekleidet ist.

1. Einleitung

1.2 Entwicklung von Peyer Plaques

Wie bereits im Kapitel 1.1.2 beschrieben wurde, verfügt das intestinale Immunsystem über hochorganisierte Strukturen, welche unter dem Überbegriff darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT, *gut associated lymphoid tissue*) zusammengefasst werden. Dieses schließt die Mesenteriallymphknoten (mLN), Peyer Plaques (PP) sowie Cryptoplaques und isolierte lymphatische Follikel (ILF). Obwohl es sich bei allen um lymphatische Strukturen handelt, unterscheiden sie sich in ihrer Funktion und Entwicklung. Während mLN und Peyer Plaques bei der neonatalen Entwicklung des Organismus angelegt werden, wird die Formation von Cryptoplaques und ILFs erst nach der Geburt initiiert.

Die Entwicklung des intestinalen lymphatischen Systems einer Maus wird durch die Bildung von lymphatischen Strukturen am Tag 9,5 *post coitus* (p. c.) eingeleitet. Am Tag 15,5 p. c. wird das lymphatische Netzwerk unter der spezifischen Expression des Transkriptionsfaktors Prox1 in den Endothelzellen angelegt²⁹. Die ersten PP-Anlagen werden am Tag 16-17 p.c. entdeckt³⁰. Die eigentliche Entwicklung der Peyer Plaques verläuft über drei histologisch unterschiedliche Schritte.

Der erste Entwicklungsschritt besteht in der Entstehung der Organisationszentren, bestehend aus den Vcam-1 und Icam-1 exprimierenden Stromazellen (auch als LTo (*lymphoid tissue organizer*) Zellen bekannt) am distalen Ende des Dünndarmes. Die PP-Anlagen entwickeln sich dann von distalem zum proximalen Ende des Darmes³⁰.

Im zweiten Schritt erfolgt die Aggregation von hämatopoetischen LTi- (*lymphoid tissue inducer*)-Zellen und deren Ko-Lokalisation mit den Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Stromazellen an den Tagen 16-17 p.c.^{30, 31}. Die Interaktion der LTi-Zellen mit den LTo-Stromazellen durch zahlreiche Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ist entscheidend für die Entwicklung des lymphatischen Gewebes. LTi-Zellen wurden als CD4⁺ CD3⁻ CD45⁺ IL-7R α ⁺ Zellen beschrieben, welche in die Anlagen von Lymphknoten und Peyer Plaques während der fötalen Entwicklung zuerst eintreten^{32, 33}. Heutzutage werden sie der Gruppe drei von Lymphozyten des angeborenen Immunsystems (*innate lymphoid cells*, ILC3) zugeordnet³⁴. Alle ILC3-Zellen einschließlich LTi-Zellen sind durch die hohe Expression von Transkriptionsfaktor ROR γ t (*retinoic acid-related orphan receptor γ t*) gekennzeichnet³⁵.

Zusätzlich zur ROR γ t-Expression werden die LTi-Zellen durch die Expression von einigen Oberflächenmarkern wie IL-7R α (CD127), c-Kit (CD117), CXCR5 (Rezeptor für CXCL13),

1. Einleitung

CCR7 (Rezeptor für CCL19 und CCL21), Lymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ und Integrin $\alpha_4\beta_7$ charakterisiert^{31, 33, 36, 37}. Die Expression von IL-7R α auf den LTi-Zellen ist dabei kritisch für die normale Ausbildung der Peyer Plaques³⁸.

Nach dem Eintritt von CD3⁺ T- und B220⁺ B-Lymphozyten in die PP-Anlagen kurz vor der Geburt³⁰ wird die PP-Entwicklung abgeschlossen. Bereits vier Tage nach der Geburt findet man PPs mit einer vollständig reifen Architektur, das heißt mit einem Netzwerk bestehend aus follikulären dendritischen Zellen (FDC) mit darin eingebetteten B-Zellfollikeln sowie T-Zellzonen.

1.2.1 Rolle von LT α in der PP-Entwicklung

Viele Mitglieder der TNF-Familie wurden als wichtig für die Formation von Peyer Plaques beschrieben. Eine besonders bedeutende Rolle spielen LT α und LT β , welche entweder als membranständiges LT $\alpha_1\beta_2$ -Heterotrimer oder als lösliches LT α_3 -Homotrimer exprimiert werden. Für die PP-Entwicklung wurde gezeigt, dass LT $\alpha_1\beta_2$ ausschließlich an den LT β R der LTo-Zellen bindet, während LT α_3 den LT β R und den TNFR aktivieren kann. Die Bindung an den LT β R führt zur Aktivierung von zwei NF- κ B (*nuclear factor κ B*)-Kaskaden, welche letztendlich die Transkription von MIP-1 β , MIP-2 und Vcam-1³⁹ bzw. von den Chemokinen CXCL13, CCL19 und CCL21^{39, 40} induzieren. Die Bedeutung der LT β R-Aktivierung für die PP-Formation wird durch die Tatsache betont, dass die Defizienz im LT α -Gen zum Fehlen von organisiertem lymphatischem Gewebe führt^{41, 42}. Auch bei den LT β ^{-/-} Mäusen wurde das Fehlen von Peyer Plaques beschrieben^{43, 44}.

Ebenfalls wichtig für die Entwicklung der Peyer Plaques sind die Chemokine. Es sind kleine lösliche Proteine, welche in der Lage sind die Zellen mit dem entsprechenden Chemokin-Rezeptor an der Oberfläche entlang des Chemokin-Gradientes anzulocken. Besonders bedeutend für die Entwicklung der Peyer Plaques sind die Chemokine CXCL13 (CXCR5-Ligand), sowie CCL19 und CCL21 (beide CCR7-Ligande)³⁷. CXCL13 wird durch die LTo-Stromazellen produziert und rekrutiert die ROR γ t⁺ LTi-Zellen sowie die B-Lymphozyten in der späteren PP-Entwicklung zu den PP-Anlagen. Zusätzlich führt die Aktivierung von CXCR5 an den LTi-Zellen zur Hochregulation von LT $\alpha_1\beta_2$ -Produktion durch diese Zellen und somit zur stärkeren Stimulierung von LT β R der LTo-Stromazellen, welche ihrerseits die Freisetzung von CXCL13 durch die LTo-Stromazellen erhöht⁴². Zusätzlich zu CXCR5 exprimieren die LTi-Zellen CCR7 und wandern chemotaxisch in Richtung des CCL19 bzw. CCL21-Gradientes.

1. Einleitung

LTi-Zellen, wie alle Zellen der ILC3-Familie, benötigen IL-7R α -Signalweg für ihre Entwicklung und Homöostase⁴⁵.

1.2.2 Einfluss der Mikroflora auf die PP-Entwicklung

Für die postnatale PP-Entwicklung stellt die Darmmikroflora die stärkste Stimulierung bereit. Es wurde gezeigt, dass Peyer Plaques von keimfreien Mäusen die Merkmale von unreifen PP-Anlagen besitzen. So besitzen die Peyer Plaques dieser Mäuse eine flache, in die Darmwand eingeschlossene Struktur, während die Peyer Plaques der normalen Mäuse eine gutausgebildete, kuppelartige Architektur vorzeigen. Nach der Exposition dieser Mäuse der normalen Umgebung ändert sich die PP-Entwicklung wieder zu einer regulären⁴⁶. Somit kann die Stimulierung mit der Mikroflora zu der Generierung eines optimalen Signalmilieus beitragen, welches für die Reifung von GALT von Bedeutung ist.

1.2.3 Einwanderung von T- und B-Lymphozyten in die Peyer Plaques

Wie bereits oben beschrieben wurde, besiedeln die ersten T- und B-Lymphozyten die Peyer Plaques kurz vor der Geburt³⁰. Während der Lebenszeit ist der Prozess der Lymphozyten-Einwanderung kontinuierlich. Das Verlassen des Blutstroms und der Eintritt der naiven Lymphozyten in die PPs erfolgen über die hochendotheliale Venole (HEVs) und umfassen mehrere Schritte.

Zuerst gehen die Zellen eine Interaktion mit dem Endothel des Blutgefäßes an, welche zum Rollen der Lymphozyten mit dem Blutstrom entlang der Endothelschicht führt. Wenn die sich rollende Zelle ein geeignetes Signal von Endothelzellen erhält, kann sie an das Endothel binden und somit mit der Rollbewegung aufhören. Anschließend sucht die Zelle eine geeignete Eintrittsstelle, um durch die Endothelschicht durchzudringen und das Blutgefäß zu verlassen⁴⁷.

Obwohl mehrere Klassen von Adhäsionsmolekülen in verschiedene Schritte der Extravasation der Lymphozyten involviert sind, sind nur wenige von ihnen spezifisch für das mukosale Gewebe. Zuerst müssen die Lymphozyten das Integrin $\alpha_4\beta_7$ auf ihrer Oberfläche exprimieren, welches mit seinem Liganden MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*) auf den Endothelzellen der HEV interagieren kann⁴⁸. Zusätzlich können die MAdCAM-1 Moleküle glykosyliert sein und dadurch auch als Ligand für L-Selektin dienen⁴⁹, welches normalerweise PNAd (*peripheral lymph node addressin*) bindet. Da aber naive T-

1. Einleitung

Lymphozyten sowohl L-Selektin, als auch Integrin $\alpha_4\beta_7$ exprimieren, wird dadurch deren Eintritt in die Peyer Plaques gefördert⁵⁰.

Einige T-Zell-Populationen exprimieren $\alpha_E(\text{CD}103)\beta_7$ Integrin. Dazu gehören unter anderem $\text{TCR}\alpha\beta^+$ und $\text{TCR}\gamma\delta^+$ IELs, $\text{FoxP}3^+$ Tregs und einige $\text{CD}4^+$ $\text{FoxP}3^-$ nonTreg-Lymphozyten. Auch eine Population von mukosalen dendritischen Zellen, welche als $\text{CD}103^+$ DCs bekannt sind, exprimiert $\alpha_E\beta_7$. Der einzige bekannte Ligand für $\alpha_E\beta_7$ Integrin ist E-Cadherin, welches von den Epithelzellen produziert wird⁵¹. Die $\alpha_E\beta_7$ -vermittelte Lymphozyten-Adhäsion zum epithelialen E-Cadherin wird zusätzlich durch das Chemokin CCL25 verstärkt⁵². Das bedeutet, dass die Chemokine nicht ausschließlich für das Anlocken von Lymphozyten, sondern auch für die Abstimmung der Interaktionen zwischen den Lymphozyten und den Zellen der Mukosa wichtig sind.

Aus der Gruppe der Chemokinrezeptoren kann CCR9 als Darm-spezifisch angesehen werden. Die $\text{CCR}9^+$ Population der T-Lymphozyten wird in Richtung Dünndarm geleitet⁵³. $\text{CCR}9^{-/-}$ Mäuse weisen verringerte Anzahl von intraepithelialen T-Lymphozyten⁵⁴ und der IgA-Plasmazellen in der Lamina propria des Dünndarms⁵⁵.

Die Chemokine CCL19 und CCL21 sind an der HEV der Peyer Plaques präsent, wo sie $\text{CCR}7^+$ Lymphozyten anlocken⁵⁶. Ihre Expression ist auf die interfollikuläre Bereiche konzentriert, wo sie anscheinend den Eintritt von T-Lymphozyten in die Peyer Plaques steuern⁵⁷. Die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR7 und seinen Liganden CCL19 und CCL21 ist durch die Studien von $\text{CCR}7^{-/-}$ bzw. plt/plt (diese Tiere haben weder CCL19, noch CCL21) Mäusen belegt. Solche Tiere weisen beeinträchtigtes Eintreten von T-Lymphozyten in die Peyer Plaques auf, während das Eintreten von B-Zellen weniger betroffen ist^{57, 58}.

Für die B-Lymphozyten sind dagegen die Chemokine CXCL12 und CXCL13 die bedeutendste Chemoattraktanten. Beide Chemokine sind ähnlich wie CCL19/CCL21 an der HEV präsent. Die CXCL13-Präsenz ist für die HEV der Peyer Plaques spezifisch⁵⁹. Zusätzlich zum Eintritt der B-Lymphozyten in die Peyer Plaques, sind diese Chemokine für die Organisation von Keimzentren wichtig, wo CXCL13 die $\text{CXCR}5^+$ Lymphozyten zu der hellen Zone bzw. CXCL12 die $\text{CXCR}4^+$ Lymphozyten zu der dunklen Zone des Keimzentrums lenken⁶⁰.

Zusätzlich zu den Peyer Plaques enthält der Darm auch kleinere lymphatische Strukturen: Cryptoplaques und isolierte lymphatische Follikel (ILFs), welche vermutlich unterschiedliche

1. Einleitung

Reifungsphasen derselben Anlagen darstellen^{61, 62}. Im Gegensatz zu den Peyer Plaques bestehen die ILFs primär aus B-Zellen ohne eindeutige T-Zellzone und sind wichtig für den T-Zellunabhängigen IgA-Klassenwechsel in Mäusen⁶³.

1.3 Humorale Abwehrmechanismen des Darmes

Als ein Teil des Immunsystems besitzt der Darm mehrere Zelltypen und Gewebe, welche sich auf die Immunabwehr spezialisiert haben. Neben der Barrierefunktion des Epithels, welche im Kapitel 1.1.1 ausführlich diskutiert wurde, verfügt der Darm über einen zweiten Abwehrmechanismus: sekretiertes IgA.

1.3.1 Die Rolle des IgA in der Darmimmunität

Die Schlüsselaufgabe des lymphatischen Gewebes des gastrointestinalen Traktes besteht im Schutz des Organismus sowohl gegen die pathogene, als auch die symbiotische Mikroflora des Darmes. Eine wichtige Rolle dabei spielt die humorale Immunantwort, deren Großteil über die Antikörper ausgelöst wird. Die Bedeutung von antikörperproduzierenden Plasmazellen für die Darmimmunabwehr kann nicht bestritten werden: Über 80% aller Plasmazellen des Organismus sind in der Lamina propria des Darmes lokalisiert, wobei die IgA⁺ Plasmazellen den dominierenden Ig-Isotyp im Darm darstellen. Insgesamt gibt es im Organismus mehr IgA-Plasmazellen, als Plasmazellen aller anderen Isotypen zusammen^{64, 65}.

Die sekretierte Form von IgA stellt ein Dimer dar, dessen Monomerteile über eine J (*joining*)-Kette verknüpft sind⁶⁶.

Die biologischen Aktivitäten von IgA sind vielfältig und deren genaue Wirkmechanismen bisher nicht vollständig aufgeklärt. IgA ist in der Lage Toxine und Pathogene zu neutralisieren ohne eine Entzündung auszulösen, weil es das Komplementsystem nicht aktiviert⁶⁷. Es wurde gezeigt, dass IgA unter anderem in der Lage ist Adhärenz und Kolonisierung der Bakterien an der Epitheloberfläche zu unterbinden^{68, 69}. Andere Studien beschreiben einen Effekt, bei dem das IgA durch seine Bindung an die Bakterien deren Eindringen in die Mukusschicht verhindert. Der denkbare Mechanismus dafür könnte durch die IgA-Bindung veränderte Oberflächenladung bzw. die hydrophoben Eigenschaften der Bakterien begründet werden^{70, 71}. Zusätzlich belegen zahlreiche Arbeiten die Interaktion von IgA mit verschiedenen Leukozyten über deren Fc α RI (CD89). Je nach Zelltyp führt diese Interaktion zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Interaktion von IgA mit den eosinophilen

1. Einleitung

Granulozyten löst deren Degranulierung aus⁷². In den Monozyten kann IgA die Freisetzung von Entzündungszytokinen wie TNF- α und IL-6 runterregulieren⁷³ und in den dendritischen Zellen wird die IL-12 Produktion inhibiert⁷⁴.

1.3.2 Generation des Antikörperrepertoirs während der B-Zell-Entwicklung

Die Vielfältigkeit des Antikörperrepertoirs der B-Zellen wird durch mehrere Entwicklungsstufen geregelt. Die sich entwickelnde B-Zellen bauen variable Regionen der schweren (IgH) und der leichten (IgL) Immunoglobulingene aus den V- (*variable*), D- (*diversity*) und J- (*joining*) Segmenten. Dieser Vorgang wird V(D)J-Rekombination genannt und wird durch den RAG-1/RAG-2 (*recombination activating gene*) Endonukleasenkomplex initiiert⁷⁵. Reife B-Lymphozyten mit abgeschlossener V(D)J-Rekombination der schweren und leichten Immunoglobulinketten exprimieren IgM an ihrer Oberfläche und migrieren zu den peripheren lymphoiden Organen, wo sie reifen können. Nach ihrer Aktivierung proliferieren und differenzieren B-Zellen zu Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen.

Währenddessen machen sie einen zweiten Umbau des Ig-Lokus durch, nämlich die sogenannte Klassenwechselrekombination (*class switch recombination, CSR*) sowie die somatische Hypermutation (SHM), welche für den Isotypewechsel bzw. für die Affinitätsreifung verantwortlich sind⁷⁶.

1.3.2.1 Molekulare Vorgänge bei dem IgA-Klassenwechsel

Die CSR wandelt die konstante Region der schweren Kette um, ohne die Antigen-spezifität zu verändern und erlaubt die Produktion von unterschiedlichen Ig-Klassen wie IgG, IgE, IgA etc. Der Locus der konstanten Region der schweren Immunoglobulinkette (CH-Lokus) besteht aus einer Reihe von CH-Genen, welche, mit Ausnahme von C δ , an ihrem jeweiligen 5'-Ende von einer spezifischen Sequenz, der S-Region, flankiert sind⁷⁷ (Abbildung 5).

1. Einleitung

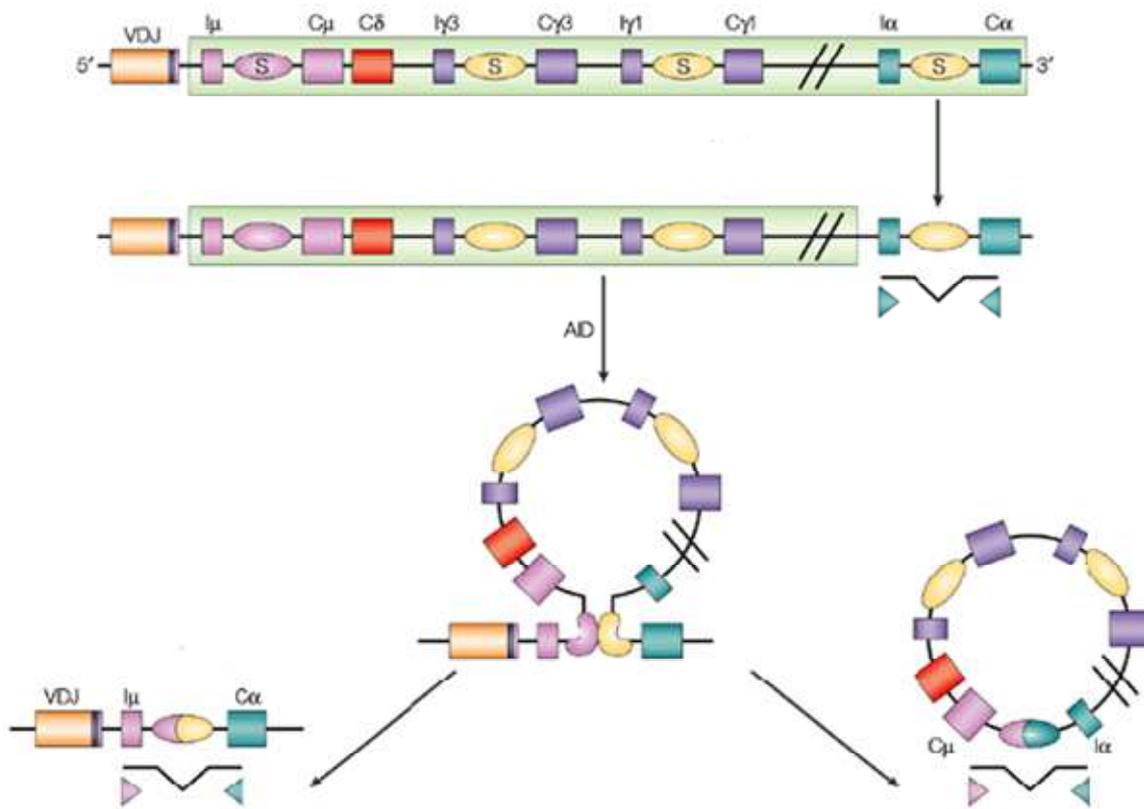


Abbildung 5: Molekulare Vorgänge beim IgA-Klassenwechsel

Ein IgA-Klassenwechsel wird durch das Öffnen des α -Lokus eingeleitet. Während der α -Lokus geöffnet ist, kann ein spezifisches RNA-Molekül (Keimbahntranskript) transkribiert werden. Die Klassenwechselrecombination erfolgt zwischen zwei S-Regionen und erfordert DNA-Doppelstrangbrüche. Die ausgeschnittene DNA-Schleife kann als Matrize für die zirkulären I-C μ Transkripte dienen. Übernommen mit Modifikationen⁷⁸.

Die Präsenz von S-Regionen ist für die CSR absolut erforderlich⁷⁹. Einer CSR geht die Transkription eines spezifischen RNA-Moleküls, kodiert durch die CH-Gene in der Keimbahn (*germline*), vor⁸⁰. Die Keimbahntranskription fängt in einem am 5' zum I-Exon liegenden Promoter an und endet am 3'-Ende des CH-Gens⁸¹. In reifen nicht aktivierten B-Zellen wird die S μ -Region transkribiert, während die Transkription von abwärts liegenden S-Regionen ausschließlich nach deren Aktivierung der B-Zellen durch Zytokine erfolgt. So induziert TGF- β zum Beispiel verstärkte Erreichbarkeit des Keimbahn- α -Gens und führt zur erhöhten Expression des Keimbahn- α -Transkripts^{82, 83}. Die CSR kann zwischen zwei S-Regionen passieren, dies erfordert jedoch Doppelstrangbrüche in S μ und in einer anderen S-Region und führt zum Ausschneiden einer DNA-Schleife⁸⁴. Darauf folgen die Reparatur und Ligation der DNA-Enden. Die ausgeschnittene DNA-Schleife enthält einen I-Promoter und kann (*circle transcripts*, CT) produzieren (Abbildung 5). Diese zirkuläre I-C μ Transkripte dienen als

1. Einleitung

Kennzeichen für aktive CSR *in vivo* und *in vitro*⁸⁵. CSR zwischen S μ und einer anderen S-Region führt zu einer Angrenzung des jeweiligen CH-Gens zum VH-Exon und somit zum Klassenwechsel von IgM/IgD zu IgG, IgE oder IgA.

Die Spezifität der CSR wird durch den spezifischen Promoter festgelegt⁸⁰. Der Promoter, der stromaufwärts zum CH-Gen liegt, reagiert ausschließlich auf einen spezifischen Satz von Signalen⁸⁶. C α , sowie I α Promoters werden als Reaktion auf TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) aktiviert⁸⁷.

Die CSR-Initialisierung erfordert eine Aktivierung der B-Zellen durch Antigene und Zytokine. Die Zytokine werden durch eine Reihe von Zellen hergestellt, wie aktivierte T-Zellen, dendritische Zellen (DC) oder Makrophagen (M Φ). Signaltransduktion durch membranständiges IgM⁸⁸, TLRs (*toll like receptor*), CD40L⁸⁹ oder andere Membranrezeptoren der TNF-Familie (BCMA (*B cell maturation antigen*), TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*), BAFF-R (*B cell activating factor-receptor*) und Zytokinrezeptoren der B-Zellen induziert zwei essentielle Ereignisse, welche für die CSR erforderlich sind: die Auswahl des Ziel-S-Regions und die Aktivierung von AID⁹⁰ (*activation-induced cytidine deaminase*).

1.3.2.2 Der T-Zell-unabhängige Weg der IgA Generierung

Obwohl die Differenzierung von IgA⁺ B-Zellen hauptsächlich über den T-Zell-abhängigen (TD, *t cell dependent*)-Weg verläuft, können die IgA⁺ B-Zellen zusätzlich über den T-Zell-unabhängigen Weg (TI, *t cell independent*) entstehen.

Mäuse, denen CD4⁺ T-Lymphozyten fehlen^{91, 92}, sowie Tiere ohne mLNs, PPs und ILFs^{93, 94} weisen eine intestinale IgA-Produktion auf. Das deutet auf die Existenz eines T-Zell-unabhängigen (TI)-Weges der IgA-Produktion. Im Gegensatz zum TD-Weg kann die T-Zell-unabhängige IgA-Generierung direkt in der intestinalen Lamina propria⁹⁴ oder den isolierten lymphatischen Follikeln (ILFs)⁶³ erfolgen.

Die T-Zell-unabhängige IgA-Produktion in der Lamina propria kann nach dem Einfangen des Antigens durch eine dendritische Zelle initiiert werden (Abbildung 6). Dazu gehen die B-Zellen der Lamina propria eine Interaktion mit den CX3CR1⁺ oder CD103⁺ dendritischen Zellen ein, nachdem diese die Darmantigene mittels ihrer transepithelialen Dendriten oder von Goblet-Zellen eingesammelt haben^{7, 95}. Außer der Antigenpräsentation setzen die

1. Einleitung

dendritischen Zellen der Lamina propria, als Antwort auf die Stimulierung von TLR5 durch bakterielles Flagellin, die Zytokine IL-6 und Retinsäure (*retinoic acid*, RA) frei, welche die IgA-Produktion anregen⁹⁶. Die RA verstärkt zudem in der Zusammenwirkung mit TGF- β 1 die IgA CSR und die IgA-Produktion^{97,98}.

Eine andere Möglichkeit der T-Zell-unabhängigen IgA-Aktivierung liegt in der Produktion von CD40L-ähnlichen Zytokinen der TNF-(*tumor necrosis factor*) Familie: BAFF und APRIL (Abbildung 6). Diese werden von einer Population der dendritischen Zellen in der Lamina propria als eine Antwort auf TLR-Signale der Mikroflora produziert⁹⁹. Auch die Epithelzellen produzieren BAFF und APRIL und unterstützen damit die dendritischen Zellen beim Voranbringen des APRIL-abhängigen IgA-Klassenwechsels¹⁰⁰.

Alternativ findet der T-Zell-unabhängige IgA-Klassenwechsel in den isolierten lymphatischen Follikeln (ILFs) statt. Die sich dort befindende Stromazellen (SC) werden durch TNF- und Lymphotoxin-Signale der LT α -Zellen, sowie durch die TLR-Liganden der Mikroflora aktiviert. Aktivierte Stromazellen produzieren BAFF, APRIL, TGF- β 1 und zusätzlich CXCL13, CCL19 und CCL20, welche B-Zellen und dendritische Zellen zu den ILFs anlocken⁶³. Die Makrophagen, dendritische Zellen und LT α -Zellen der ILFs produzieren TNF, welches die dendritische Zellen und Stromazellen dazu anregt TGF- β 1-freisetzende Matrixmetalloproteasen MMP-2, MMP-9 und MMP-13 zu exprimieren⁶³. Außerdem produzieren dendritische Zellen und Makrophagen zusammen mit den Stromazellen BAFF und APRIL, welche in der Zusammenwirkung mit TGF- β 1 und TLR-Stimulierung den IgA-Klassenwechsel ohne T-Zell-Hilfe und Keimzentrumsreaktion ermöglichen⁶³.

1. Einleitung

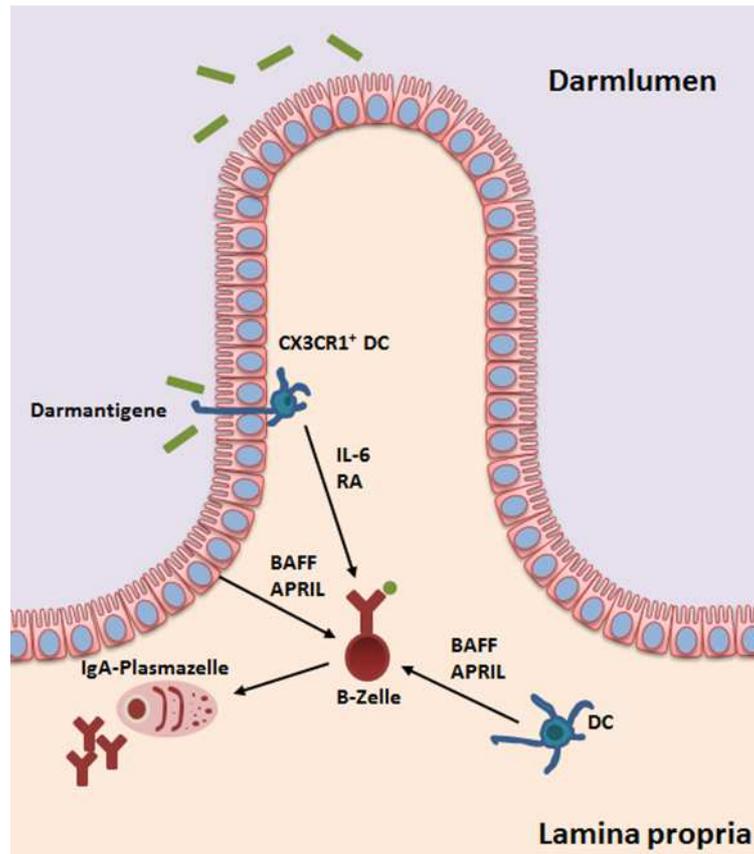


Abbildung 6: T-Zell-unabhängige Generierung von IgA-Plasmazellen in der Lamina propria des Dünndarms

Die CX3CR1⁺ bzw. CD103⁺ dendritischen Zellen können Pseudopods durch die Epithelschicht ausstrecken und die Darmantigene fangen. Diese werden anschließend den B-Zellen in der Lamina propria präsentiert. Zusätzlich setzen die dendritischen Zellen IL-6 und Retinsäure frei, was die IgA-Produktion unterstützt. Alternativ kann die T-Zellunabhängige IgA-Aktivierung in der Lamina propria mittels der Produktion von BAFF und APRIL durch Epithelzellen oder dendritische Zellen der Lamina propria angeregt werden.

Zusätzlich zu der T-Zell-abhängigen IgA-Produktion findet in den mLNs und PPs ebenfalls die T-Zell-unabhängige Generierung von IgA-Plasmazellen statt. Dabei sind die plasmazytoide dendritischen Zellen (pDCs) beteiligt¹⁰¹. Die Stromazellen produzieren Interferon α und stimulieren damit die Produktion von BAFF und APRIL durch die pDCs, was die IgA-Klassenwechselrekombination und -Produktion in den B-Lymphozyten bewirkt¹⁰¹. Die FDCs können T-Zell-unabhängige IgA-Produktion in den Peyer Plaques weiter erhöhen, indem sie folliculäre B-Lymphozyten stimulieren. Die Aktivierungssignale durch RA und Mikroflora regen die Produktion von BAFF und CXCL13 durch die FDCs, sowie die TGF- β 1 Aktivierung via MMP9 und MMP13 an¹⁰². Diese pDC/FDC-basierende T-Zell-unabhängige IgA-Produktion könnte eine Erklärung für die verbleibende IgA-Klassenwechselrekombination in den Peyer Plaques der CD40-defizienten Mäuse sein¹⁰³.

1. Einleitung

1.3.2.3 T-Zell-abhängige Weg der IgA Generierung

Die meisten Antigene lösen humorale Immunantworten in den Keimzentren (*germinal center*, GC) aus. Keimzentren sind Orte mit besonderer Mikroumgebung und ermöglichen den B-Zellen die Proliferation, AID-Induktion, Klassenwechselrekombination, somatische Hypermutation sowie Affinitätsreifung durch die Interaktionen mit den Antigenen und den folliculären T-Helferzellen (TFH-Zellen).

Die Produktion des intestinalen IgA findet hauptsächlich in den Follikeln der Peyer Plaques und Mesenteriallymphknoten durch den T-Zell-abhängigen Weg statt⁶⁷. Dieser Weg erfordert eine Aktivierung der CD4⁺ T-Helferzellen durch die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, gefolgt durch die Expansion und Selektion der B-Zellen in den Keimzentren der Peyer Plaques⁹³ (Abbildung 7). Im Keimzentrum findet die Differenzierung der B-Zellen zu den $\alpha_4\beta_7^+$ CCR9⁺ IgA-produzierenden Plasmablasten und Plasmazellen mit der Fähigkeit kompletten Dünndarm zu besiedeln^{67, 104}.

Die Aufnahme des Antigenes erfolgt vor allem durch die antigensammelnden M-Zellen, welche das gesammelte Antigen zu den in der SED sitzenden dendritischen Zellen übergeben. Etliche Populationen der dendritischen Zellen sind in die T-Zell-abhängige IgA-Generierung involviert. Einige DCs sind in der Lage die Antigene direkt aus dem Darmlumen zu sammeln. Dazu bilden sie Dendriten durch die M-Zellspezifischen transzellulären Poren aus¹⁰⁵. Auf ähnliche Weise können Makrophagen-ähnliche CX3CR1⁺ DCs antigensammelnde Dendriten durch die Epithelzellen ausstrecken⁹⁵. Obwohl sie nicht in der Lage sind in die Peyer Plaques einzuwandern, können die CX3CR1⁺ DCs das Antigen an die migratorischen CD103⁺ DCs durch die intrazellulären *gap junctions* übertragen und dadurch zur T-Zell-abhängigen IgA-Generierung in den Peyer Plaques beitragen^{106, 107}. Anschließend migrieren die CD103⁺ DCs in die parafollikulären Zonen der Peyer Plaques, wo sie Interaktionen mit den CD4⁺ Vorläufern der TFH-Zellen eingehen und diese somit aktivieren^{108, 109} (Abbildung 7).

1. Einleitung

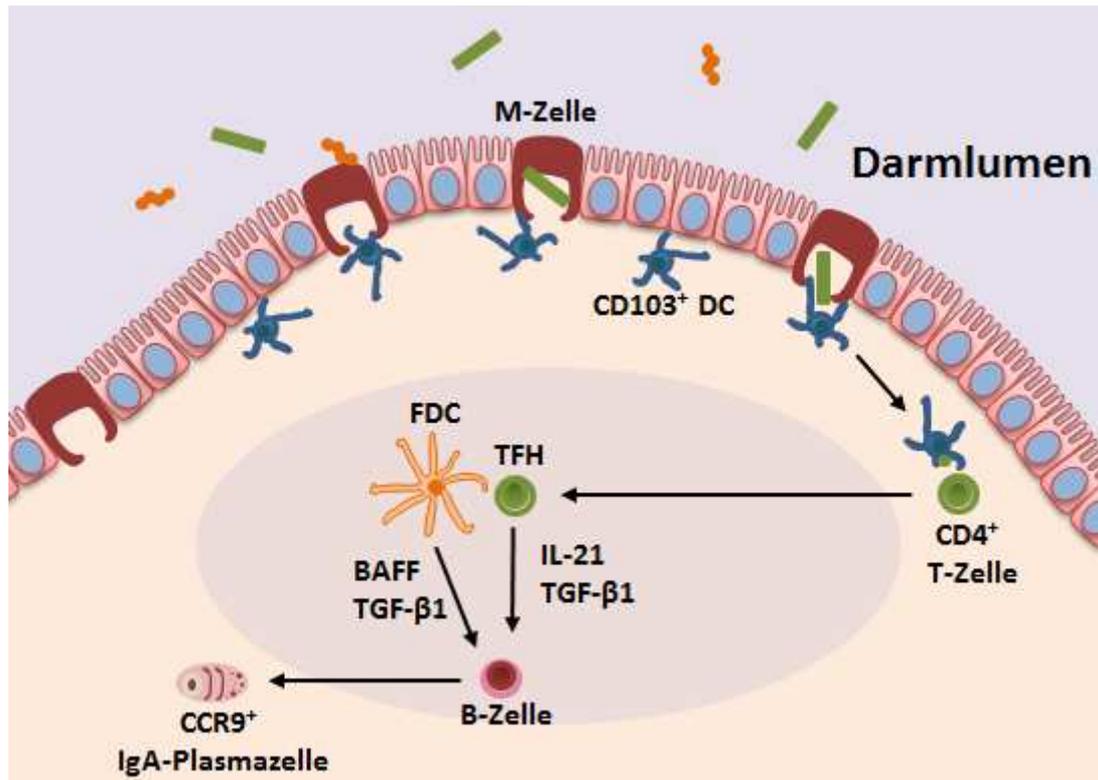


Abbildung 7: Die T-Zell-abhängige Generierung von IgA⁺ Plasmazellen im PP

Die Darmantigene gelangen in die Peyer Plaques meistens über die M-Zellen. Anschließend werden sie von den M-Zellen an die CD103⁺ dendritischen Zellen übergeben, welche daraufhin in der parafollikulären Zone die Vorläufer der TFH-Lymphozyten aktivieren. Aktivierte TFH-Lymphozyten wandern in das FDC-Netzwerk des Follikels ein und unterstützen dort den IgA-Klassenwechsel durch die Produktion von IL-21 und TGF-β.

TFH-Zellen regulieren die CXCR5 Produktion hoch und wandern in das Netzwerk von CXCL13-produzierenden follikulären dendritischen Zellen (FDC) des Follikels ein^{108, 109}. Neben CXCR5 exprimieren TFH-Zellen kostimulatorische Moleküle wie CD40L, ICOS (*inducible costimulator*) und PD-1 (*programed cell death-1*)^{108, 109}. In den Peyer Plaques setzen die TFH-Zellen zusätzlich die Zytokine IL-21 und TGF-β1 frei, welche zusammen IgA induzieren^{110, 111} (Abbildung 7). Die intestinalen TFH-Zellen stammen von den FoxP3 (*forkhead box protein 3*)-positiven regulatorischen T-Zellen (Tregs)¹¹⁰ und vermutlich auch von den T-Helfer-17-Zellen (T_H17-Zellen)¹¹² ab.

Zusätzlich zu den B- und T-Lymphozyten enthalten die Keimzentren der Peyer Plaques ein Netzwerk von follikulären dendritischen Zellen (FDC)¹¹³. Diese Zellen stromalen Ursprungs exponieren Darmantigene an ihrer Oberfläche und unterstützen dadurch Selektion von B-Lymphozyten mit hochaffinen B-Zell-Rezeptoren¹¹⁴. In den Peyer Plaques produzieren die

1. Einleitung

FDCs das Chemokin CXCL13, welches für die Chemoattraktion von T- und B-Lymphozyten in die Follikel verantwortlich ist¹⁰². Darüber hinaus unterstützen die FDCs den IgA-Klassenwechsel durch die Produktion von TGF- β 1, BAFF und die TGF- β freisetzende Matrixmetalloproteasen (MMPs)¹⁰².

1.3.2.4 Einwanderung der IgA⁺ Plasmazellen in die Lamina propria des Darms

IgA⁺ Plasmazellen aus dem mukosalen lymphatischen Gewebe können die Expression von zwei Chemokinrezeptoren CCR9 und CCR10 hochregulieren. Im Gegensatz zu den IgA⁺ Plasmazellen aus anderen mukosalen Geweben (z.B. Lunge) zeigen die IgA⁺ Plasmazellen aus den Peyer Plaques eine Ansprechbarkeit auf den CCR9-Liganden CCL25¹¹⁵, was bedeutet, dass die Expression von CCR9 während der Plasmazellentwicklung im darmassoziierten lymphatischen Gewebe induziert wird. Die CCR9-Expression ist spezifisch assoziiert mit den IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria des Dünndarmes, während die IgA⁺ Plasmazellen in anderen Darmsegmenten oder in der Lunge nur wenig bzw. keine CCR9-Expression zeigen^{116, 117}. Konsequenz dazu wird CCR9-Ligand CCL25 spezifisch von den Epithel-¹¹⁸ und Endothelzellen¹¹⁹ des Dünndarms produziert. Darüber hinaus vermitteln CCR9 und CCL25 das Einwandern von T-Lymphozyten in den Dünndarm¹²⁰ und sind somit ideal um die Immunantwort auf den Dünndarm zu richten.

Im Gegensatz dazu wird CCR10-Ligand CCL28 unter anderem von den Epithelzellen des Dickdarms produziert¹²¹, während die im Dickdarm residenten IgA⁺ Plasmazellen hohe Expression von CCR10 aufweisen¹²².

1.4 Einfluss von Mikroflora auf die intestinale Immunhomöostase

Der gastrointestinale Trakt der Säugetiere ist durch eine große Anzahl von Bakterien besiedelt, deren Gesamtheit ein Mikrobiom bildet. Das Mikrobiom eines Organismus ist für die Entwicklung von mukosalen Immunantworten sehr wichtig. Die Untersuchungen von keimfreien Mäusen (GF, *germ free*) zeigten erhebliche Beeinträchtigungen des intestinalen Immunsystems in der Abwesenheit der bakteriellen Stimulation^{4, 123}. GF-Mäuse produzieren geringere Mengen an antimikrobiellen Peptiden und besitzen eine kleinere Anzahl von intraepithelialen Lymphozyten als herkömmliche Tiere¹²⁴. Zusätzlich beobachtet man in den Peyer Plaques der GF-Mäuse eine Verkleinerung der Keimzentren⁴, sowie eine verringerte Population der IgA⁺ Plasmazellen¹²⁵ in der Lamina propria solcher Tiere. Diese Defekte sind allerdings reversibel und die korrekte Organisation des intestinalen Immunsystems kann durch die bakterielle Stimulation wiederhergestellt werden¹²⁶. Die Zusammensetzung und metabolische Aktivität des intestinalen Mikrobioms üben bedeutenden Einfluss auf die Regulation der Darmimmunität aus. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Rolle von SFB (*segmented filamentous bacteria*) beim Voranbringen der intestinalen Th17-Immunantwort^{127, 128}. SFB heften sich an die Epithelzellen des Dünndarms an. Diese Bakterienart wird mit der Erhöhung der IL-17 und IL-22 produzierenden Th17-Population in der Lamina propria verbunden^{127, 128}. Die Monokolonisierung von GF-Mäusen mit SFB induziert die Expression von SAA (*serum amyloid A*), welches zusammen mit den intestinalen dendritischen Zellen die Th17-Differenzierung bewirkt¹²⁸. Zusätzlich wird ein Anstieg der IgA-Produktion bei den SFB-monokolonisierten Mäusen beobachtet¹²⁹. Andersherum ist die IgA-Produktion für die Kontrolle der SFB-Population wichtig: Mäuse mit IgA-Defizienz (aufgrund der AID-Defizienz) weisen eine starke Expansion der SFB im Dünndarm auf, welche durch die Wiederherstellung der IgA-Werte aufgehoben wird¹³⁰. Andere Studien belegen die Fähigkeit einiger Arten von *Clostridia* die Entwicklung von FoxP3⁺ Tregs zu unterstützen^{131, 132}. Kolonisierung mit *Clostridia* aus den Clustern IV und XIVa erhöht die Produktion von TGF-β1 und begünstigt die Entwicklung von IL-10 produzierenden Tregs in GF-Mäusen^{131, 132}. Ein möglicher Grund wäre die Produktion von SCFAs (*short chain fatty acids*) durch die *Clostridia*-Arten¹³³. In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Kolonisierung von GF-Mäusen mit ASF (*Altered Schaedler Flora*, besteht aus acht Bakterienstämmen) zu einer Wiederherstellung der Treg-Population führt¹³⁴. Für den bakteriellen Stamm *Bacteroides fragilis* wurde ebenfalls eine auf die FoxP3⁺ Treg-Population aktivierende Wirkung beschrieben¹³⁵.

1.5 Bedeutung der eosinophilen Granulozyten für das gastrointestinale Immunsystem

Seit ihrer Entdeckung im 19. Jahrhundert galten die eosinophilen Granulozyten lange Zeit als entzündungsfördernde Zellen, welche ausschließlich im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Krankheiten, wie asthmatischen und atopischen Reaktionen, Parasiteninfektionen und Allergie- und Hypersensibilisierungsreaktionen betrachtet wurden. Sie wurden als aggressive Zellen angesehen, die durch eine Reihe von zytotoxischen Proteinen wie MBP (*major basic protein*), ECP (*eosinophil cationic protein*), EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*) und EPO (*eosinophil peroxidase*), eine Gewebe-zerstörende Funktion haben. Erst in den letzten Jahren wird es immer deutlicher, dass die eosinophilen Granulozyten wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle für den Aufbau und die Entwicklung von Geweben haben^{136, 137}.

Eosinophile Granulozyten sind hämatopoetische Zellen, die im Knochenmark gebildet werden von wo sie über das Blut in das Gewebe einwandern. Besonders zahlreich sind sie im gastrointestinalen Trakt¹³⁸. Hauptsächlich in der Lamina propria des Dünndarms befinden sich erhebliche Zahlen von Eosinophilen, auch dann wenn keine Entzündung vorliegt. Konstitutiv hohe Expression von Eotaxin in der Lamina propria, führt zu einer kontinuierlichen Einwanderung von eosinophilen Granulozyten, die dieses Chemokin über den CC-Chemokinrezeptor 3 (CCR3) erkennen. Da die Einwanderung der eosinophilen Granulozyten in den Dünndarm schon vor der Geburt erfolgt¹³⁹ könnten eosinophile Granulozyten auch hier zur Entwicklung der Immunkompartimente beitragen.

Für das Knochenmark wurde gezeigt, dass eosinophile Granulozyten essentiell für den Aufbau der Plasmazellüberlebensnische sind. Durch Sekretion von Chemokinen wie APRIL und IL-6 tragen eosinophile Granulozyten maßgeblich zum Überleben der Plasmazellen bei und verhindern dass sie in Apoptose gehen¹⁴⁰. Die Untersuchung von eosinophil-defizienten Mausstämmen zeigte eine deutliche Verringerung in der Anzahl Plasmazellen nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der Lamina propria. Der direkte Einfluss der Eosinophilen auf das Überleben der IgA⁺ Plasmazellen zeigte sich, wenn BALB/c Mäuse mit einem Antikörper behandelt wurden, welcher zur spezifischen Apoptose von eosinophilen Granulozyten führt. Die Depletion der eosinophilen Granulozyten hatte den sofortigen Verlust der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria zur Folge¹⁴¹.

1. Einleitung

Trotz der hohen Zahlen von eosinophilen Granulozyten im gastrointestinalen Trakt ist über ihre Funktion noch erstaunlich wenig bekannt. Neuere Arbeiten^{141, 142} legten nahe, dass eosinophile Granulozyten nicht nur für das Überleben von IgA⁺ Plasmazellen wichtig sind. Vieles spricht dafür, dass sie eine entscheidende Rolle für das Gleichgewicht zwischen der Mikroflora und dem Immunsystem des Darmes haben, da es in der Abwesenheit von eosinophilen Granulozyten zu deutlichen Veränderungen nicht nur im B-Zellkompartiment sondern auch in den Populationen der T-Zellen und der dendritischen Zellen kommt.

Außerdem scheint die Entwicklung der Peyer Plaques in eosinophil-defizienten Tieren gestört zu sein. In der Abwesenheit von eosinophilen Granulozyten haben die Peyer Plaques eine normale Follikelstruktur und eine auf den ersten Blick normale Keimzentrumsbildung, aber die Größe der Peyer Plaques ist deutlich verringert und in den Keimzentren werden an Stelle von IgA⁺ hauptsächlich IgG⁺ B-Zellen generiert. Erste Ergebnisse sprechen dafür, dass TFH-Zellen eine veränderte Zytokinexpression haben und damit B-Zellen vermehrt einen Klassenwechsel nach IgG durchführen.

Die verringerte Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria von eosinophil-defizienten Tieren, führt zu einer starken Reduktion des IgA-Antikörperspiegels im Serum aber vor allem auch im Darm. Diese könnte der Grund dafür sein, dass eosinophil-defiziente Tieren eine veränderte Mikroflora haben. Über das genaue Zusammenspiel zwischen Mikroflora, IgA Antikörpern und Immunzellen ist aber immer noch sehr wenig bekannt und der Einfluss der Eosinophile auf dieses Gleichgewicht ist bisher überhaupt noch nicht untersucht worden.

1. Einleitung

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es die Rolle der eosinophilen Granulozyten für den Aufbau und die Funktion der verschiedenen Darmimmunkompartimente darzustellen und die Wechselwirkungen zwischen der Mikroflora, dem Immunsystem und den Eosinophilen zu untersuchen.

Zunächst sollen die unterschiedlichen Immunkompartimente des Darmes in Wildtyp und in eosinophil-defizienten Mäuse miteinander verglichen werden. Dabei sollen die Zellpopulationen des Immunsystems in der Lamina propria, dem Epithel, sowie den Peyer Plaques mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert und mit immunhistologischen Methoden dargestellt werden.

Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Entwicklung der Peyer Plaques, deren Keimzentren für die Bildung der IgA⁺ B- und Plasmazellen im Darmgewebe verantwortlich sind. Der Einfluss der Eosinophil-Defizienz auf die reguläre Entwicklung von Peyer Plaques in der Ontogenese soll analysiert und Ausbildung der Immunstrukturen in den Peyer Plaques in der Abwesenheit von eosinophilen Granulozyten untersucht werden.

Hauptziel der Arbeit ist es das Zusammenspiel zwischen eosinophilen Granulozyten, dem Immunsystem und der Mikrobiom besser zu verstehen. Die Frage stellt sich, was geschieht, wenn eosinophil-defiziente Tiere mit Wildtyptieren vergesellschaftet werden und es zu einer Angleichung der Mikroflora kommt. Es soll gezeigt werden, wie sich die Mikroflora verändert und ob dies einen Einfluss auf die Entwicklung und die Funktion der Peyer Plaques hat. Im Weiteren soll untersucht werden ob sich durch die Vergesellschaftung Veränderungen im Immunkompartiment der Lamina propria und des Epithels nachweisen lassen. Damit lässt sich zeigen, ob die Veränderungen, die im gastrointestinalen Trakt von eosinophil-defizienten Tieren beobachtet wurden, ein direkter Effekt von eosinophilen Granulozyten sind oder ob sie durch die veränderte Darmflora ausgelöst wurden. Die Ergebnisse ermöglichen es ein Modell für das Zusammenspiel von Eosinophilen, dem Immunsystem und dem Mikrobiom aufzustellen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

In den folgenden Tabellen sind die Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Puffer, Lösungen und Antikörper aufgelistet, welche während dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Lichtmikroskop	Leitz	Laborlux S
Laser-Scanning-Mikroskop	Zeiss	LSM 710
Durchflusszytometer	BD Biosciences	Canto LSR II
Durchflusszytometer (Zellseparation)	BD Biosciences	Aria I Aria II
Nanodrop	Thermo Scientific	Nanodrop 2000C
PCR-Maschine	Biometra	Tpersonal combi
qRT-PCR-Gerät	Applied Biosystems Stratagene	StepOne Plus Mx3000P
Geldokumentationsanlage	Biorad	GelDoc XR+
Mikrotom	Thermo Scientific	HM560
ELISA-Lesegerät	Molecular Devices	SpectraMax plus 384
ELISPOT-Lesegerät	AID	EliSpot Reader Classic

2. Materialien und Methoden

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Kits

Material/Kit	Hersteller
Zellfilter 70 µm	BD Biosciences
Zellfilter 40 µm	Partec
Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit	Roche
Sensiscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel
QIAamp DNA Stool Mini Kit	Qiagen
ELISA-Platten Costar® Assay Plate, high binding	Corning
ELISPOT-Platten MultiScreen® HTS	Merck Millipore
18 G x 1 1/2“ Kanülen	Braun
Mikrotom Klagen SEC35p	Microm
Objektträger Superfrost plus	Thermo Scientific
Zellkulturplatten	greiner bio-one
DreamTaq DNA Polymerase Kit	Thermo Scientific
AmpliTaq Gold PCR Kit	Applied Biosystems

2. Materialien und Methoden

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Methyl-Butan	Roth
BSA	Biomol
Collagenase D	Roche
Dispase II	Roche
DNase I	Sigma
dNTPs Set	Fermentas
Einbettmedium O.C.T. compound	Tissue Tek
Fluoromount Bedeckmedium	Sigma
Glykogen	Roche
LPS	Sigma
O'RangeRuler 100 bp	Thermo Scientific
Percoll	GE Healthcare
Proteinase K	Roche
RNase away	Roth
TRIzol Reagent	Life Technologies
Trypanblau	Sigma
Ribolock RNase Inhibitor	Fermentas
ELISPOT-Substrat 1-Step NBT/BCIP	ThermoFisher Scientific

2. Materialien und Methoden

Tabelle 4: Puffer, Medien und Lösungen

Puffer/Medium	Zusammensetzung
10x TBE Puffer	216,0 g TRIS-Base 110,0 g Borsäure 19,0 g EDTA Ad 2 l ddH ₂ O
1x TNES Puffer	10 mM TRIS-Base, pH 7,5 0,4 M NaCl 0,1 M EDTA 0,6% SDS
Erythrozyten-Lysepuffer	4,15 g NH ₄ Cl 0,5 g KHCO ₃ 0,0185 g EDTA pH 7,5 Ad 0,5 l ddH ₂ O
Zellkultur-Nährmedium	RPMI 1640 + Glutamax-I Medium (Gibco) 10% FCS 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
1x PBS	136,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM K ₃ PO ₄ 8,1 mM Na ₃ PO ₄
PBS/BSA Puffer	1x PBS 0,5% BSA
Fixierungspuffer, eBioscience	3 Volumina Fixation Diluent 1 Volumen Fixation Concentrate
Permeabilisierungspuffer, eBioscience	10x Permeabilization Buffer 1:10 Verdünnung mit ddH ₂ O
Lamina propria EDTA-Vorverdaupuffer	9 ml RPMI Medium 500 µl 0,5M EDTA, pH 8,0

2. Materialien und Methoden

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Lamina propria Proteasenscocktail	1 mg/ml Collagenase D 0,1 mg/ml DNase I 1 mg/ml Dispase II
ELISA Blocking Puffer	1x PBS 1% BSA
PBST-Waschpuffer	1x PBS 0,05% Tween-20

2. Materialien und Methoden

Tabelle 5: Antikörper

Antigen	Klon	Hersteller
Arginase-1	658922	R&D Systems
B220	RA3.6B2	DRFZ
CD103	2E7	BioLegend
CD11b	M1/70.15.11	DRFZ
CD11c	N418	DRFZ
CD3	145-2C11	DRFZ
CD4	GK1.5	DRFZ
CD45	30-F11	eBioscience
CD8 α	53-6.7	eBioscience
CD8 β	YTS156.7.7	BioLegend
c-Kit (CD117)	ACK45	DRFZ
CX3CR1	SA011F11	BioLegend
CXCR5	L138D7	BioLegend
FAS	15A7	eBioscience
Fc γ Rezeptor	2.4G2	DRFZ
FoxP3	FJK-16s	eBioscience
Gr-1	RB6-8C5	DRFZ
Icam-1	KAT1-6	DRFZ
IgA	polyklonal	Bethyl
IgA	polyklonal	Southern Biotech
IgG1	RMG1-1	BioLegend
Ki67	SolA15	eBioscience
MadCAM-1	MECA-367	BD Bioscience
MBP	MT-14.7.3	LeeLab
MHCII	M5/114	DRFZ
PD-1	29F.1A12	BioLegend
PDCA-1	JF05-1C2.4.1	Miltenyi Biotec
Pecam-1 (CD31)	390	DRFZ
PNA		Vector
ROR γ t	Q31-378	BD Bioscience
SA-Pe/Cy7		BioLegend

2. Materialien und Methoden

Antigen	Klon	Hersteller
SA-PerCP		BD Pharmingen
Siglec-F	E50-2440	BD Pharmingen
TCR β	H57-597	eBioscience
TCR $\gamma\delta$	GL3	BD Biosciences
Vcam-1	6C71	DRFZ

Tabelle 6: Primersequenzen

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
<i>CCL19</i>	5'-GGG GTG CTA ATG ATG CGG AA-3'	5'-CCT TAG TGT GGT GAA CAC AAC A-3'
<i>CCL21</i>	5'-GTG ATG GAG GGG GTC AGG A-3'	5'-GGG ATG GGA CAG CCT AAA CT-3'
<i>CCL25</i>	5'-TTA CCA GCA CAG GAT CAA ATG G-3'	5'-CGG AAG TAG AAT CTC ACA GCA C-3'
<i>CXCL13</i>	5'-GGC CAC GGT ATT CTG GAA GC-3'	5'-GGG CGT AAC TTG AAT CCG ATC TA-3'
<i>E-Cadherin</i>	5'-CAG TTC CGA GGT CTA CAC CTT-3'	5'-TGA ATC GGG AGT CTT CCG AAA A-3'
<i>MadCAM-1</i>	5'-CCT GGC CCT AGT ACC CTA CC-3'	5'-CCG TAC AGA GAG GAT ACT GCT G-3'
<i>β-Aktin</i>	5'-CTC CTG AGC GCA AGT ACT CTG TG-3'	5'- TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC-3'

2. Materialien und Methoden

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse von zwei unterschiedlichen eosinophil-defizienten Stämmen verwendet: Δ dblGATA-1¹⁴³ und PHIL-Mäuse¹⁴⁴. Diese wurden unter pathogenfreien Konditionen am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin gezüchtet und gehalten. Als Wildtyp-Kontrolle für den Δ dblGATA-1 Mausstamm dienten BALB/c Mäuse, welche von Charles River Laboratories in Sulzfeld bezogen wurden. Für den PHIL-Stamm wurden negative Wurfgeschwister (C57BL/6) als die entsprechende Kontrolle verwendet.

Tabelle 7: Mausstämme

Stammsname	Zuchtort	Entstehungsort
BALB/c	Charles River, Sulzfeld	Jackson Laboratory
Δ dblGATA-1	BfR, Berlin	Jackson Laboratory
C57BL/6	Charles River, Sulzfeld	Bussey Institute
PHIL	BfR, Berlin	Mayo Clinic

2.2.1.1 Eosinophil-defiziente Mausstämme

Die Entwicklung von eosinophilen Granulozyten ist von einer komplexen Wechselwirkung von mehreren Transkriptionsfaktoren abhängig. Einer davon ist *GATA-binding protein 1* (GATA-1). Seine Wichtigkeit für die Eosinophil-Entwicklung wird durch die Tatsache bestätigt, dass die Mäuse mit einer Deletion der hochaffinen palindromischen GATA-Sequenz im *Gata1*-Promoter einen selektiven Verlust von eosinophilen Granulozyten aufweisen¹⁴³.

Der zweite eosinophil-defizienter Mausstamm, der transgene PHIL-Stamm, wurde durch eosinophil-spezifische Expression des zytotoxischen Proteins mit dem *EPO*-(eosinophil peroxidase)-Promoter erzeugt¹⁴⁴. Als zytotoxisches Protein wurde Diphtheriatoxin A (DTA) Kette gewählt, dessen zytotoxische Aktivität auf der katalytischen Degradierung von EF-(*elongation factor*)-2 und dem anschließenden Zusammenbruch der Proteinsynthese beruht¹⁴⁵. Der resultierende Verlust von eosinophilen Granulozyten in PHIL-Mäusen ist absolut und lebenslänglich¹⁴⁴.

2. Materialien und Methoden

2.2.1.2 Vergesellschaftung der Tiere

Aufgrund dessen dass die BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse in den unterschiedlichen Einrichtungen gezüchtet wurden, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um den Einfluss von Mikroflora auf die beobachteten Ergebnisse zu untersuchen. Dazu wurden die Tiere beider Mausstämme für zwei bis fünf Wochen in einem Verhältnis eins zu eins gemischt im denselben Käfig untergebracht, um den Austausch der Mikroflora zwischen den Mausstämmen zu ermöglichen

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellisolierung aus den Organen des gastrointestinalen Traktes

Die Lymphozyten des gastrointestinalen Traktes wurden in Abhängigkeit von dem jeweiligen Organ mit drei unterschiedlichen Methoden präpariert.

Präparation der Zellsuspension aus der Lamina propria.

Der Dünndarm wurde entnommen und dabei wurden alle Reste von dem mesenterialen Fett- und Bindegewebe gründlich entfernt. Diese verringern die Zellausbeute und führen zum verstärkten Absterben der Zellen der Lamina propria. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass der Darm bei keinem der Arbeitsschritte austrocknet.

Nach dem Abtrennen von Peyer Plaques wurde der Darm in einer Petrischale mit eiskaltem PBS/0,5% BSA Puffer gelegt und der Länge nach aufgeschnitten. Anschließend wurde er in 4-5 Schritten in eiskaltem PBS/0,5% BSA gespült, um den Darminhalt zu entfernen.

Die eigentliche Zellisolation aus der Lamina propria wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

- Herstellung des Vorverdaupuffers: pro Dünndarm/Maus in 50 ml Falcon tube 10 ml RPMI/10% FCS/Pen/Strep + 500 μ l 0,5M EDTA pH 8,0. Dient zur Abtrennung von Epithelzellen.
- Schneiden von ca. 1 cm langen Darmstücken in das Falcon-Röhrchen mit 10 ml des Vorverdaupuffers
- Erste Behandlung von Darmstücken mit dem EDTA-Vorverdaupuffer erfolgt 15 min lang bei 37 °C im Wasserbad ohne Schütteln.

2. Materialien und Methoden

- Nach 15 min EDTA-Behandlung wurden die Proben 20-30 sec lang kräftig in der Hand geschüttelt und die abgetrennte Suspension von Epithelzellen durch das Metallsieb gefiltert und evtl. eingesammelt für eine spätere IEL-Analyse, die Darmstücke wurden wieder in das 50 ml Falcon-Röhrchen reingelegt und in 10 ml frischen Vorverdaupuffer aufgenommen.
- Zweite Behandlung von Darmstücken mit dem EDTA-Vorverdaupuffer erfolgte unter denselben Bedingungen (15 min lang bei 37°C im Wasserbad ohne Schütteln).
- Erneutes Schütteln und Filtrieren von Epithelzellen durch das Metallsieb findet nach dem zweiten Vorverdauschritt. Anschließend wurden die Darmstücke gründlich von EDTA-Resten im Metallsieb im eiskalten PBS/0,5% BSA gewaschen.
- Nach dem Auswaschen von EDTA wurden die Darmstücke in einer Petrischale zuerst mit einer Schere und danach mit einem Skalpell sorgfältig zum Brei homogenisiert. Die Gründlichkeit der Homogenisierung ist entscheidend für die Zellausbeute.
- Die Gewebe-Homogenate wurden in neue 50 ml Falcon-Röhrchen mit je 1 ml RPMI/10% FCS/Strep/Pen überführt.
- Nachdem alle Proben homogeniert wurden, wurde zu jeder Probe 5 ml des Proteasen-Cocktails dazugegeben.
- Verdaut wurden die Proben 20 min lang bei 37°C und 225 ¹/_{min} Schütteln.
- Nach dem Verdau wurden die isolierten Zellen durch das Metallsieb in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Die unverdauten Darmreste wurden zurück in das Röhrchen mit 5 ml des frischen Proteasen-Cocktails reingelegt und ein zweites Mal unter den Bedingungen wie zuvor inkubiert.
- Nach dem zweiten Verdauschritt wurden die Darmreste mehrmals durch eine 18 G x 1¹/₂“ Kanüle durchgezogen, um die Zellen aus dem Gewebe rauszulösen. Anschließend wurden sie durch das Metallsieb mit den isolierten Zellen aus dem ersten Verdauschritt vereinigt.
- Die vereinten Zellen nach den beiden Verdauschritten wurden durch den 70µm Zellfilter von BD filtriert und anschließend im RPMI/10% FCS/Pen/Strep zwei Mal gewaschen.
- Um die Lamina propria Zellsuspension von den Resten des Bindungs- und Fettgewebe zu reinigen und somit das Überleben der Lamina propria Zellen zu erhöhen, wurde die Zellsuspension in 10 ml 30 % Percoll-Lösung (in RPMI/10% FCS/Pen/Strep) aufgenommen und 20 Minuten lang bei 2000 min⁻¹ und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die pelletierten Lymphozyten wurden anschließend zwei Mal von den Percoll-Resten mit dem RPMI1640/10% FCS/Pen/Strep Nährmedium gewaschen.
- Vor der eigentlichen Färbung wurden die Zellen in dem eiskalten PBS/0,5% BSA Puffer gewaschen und resuspendiert. Die Zellzahl wurde ermittelt und die Zellen entsprechend

2. Materialien und Methoden

verdünnt, dass man ca. $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/100 μl erhält. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten im PBS/0,5% BSA und auf Eis.

Präparation der Zellsuspension aus Peyer Plaques.

Für die Analysen wurden die Peyer Plaques vorsichtig von dem Dünndarm abgeschnitten, gesammelt und mit Hilfe des RPMI1640/10% FCS/ Pen/Strep Nährmediums über den 100 μm Zellfilter gewaschen. Vor der Zellfärbung wurde die Zellsuspension im eiskalten PBS/0,5% BSA Puffer gewaschen und resuspendiert.

Sollten die Stromazellen der Peyer Plaques analysiert werden, wurden die Peyer Plaques auf dieselbe Weise mit dem Proteasen-Cocktail wie bei der Lamina propria beschrieben behandelt.

Präparation der intraepithelialen Lymphozyten des Darmes.

Die Zellsuspensionen nach den beiden Vorverdauschritten mit EDTA wurden vereinigt und zwei Mal mit dem RPMI1640/10% FCS/Pen/Strep Nährmedium gewaschen, um EDTA-Reste zu entfernen. Die intraepithelialen Lymphozyten wurden mittels 30% Percoll-Lösung im RPMI1640/10% FCS/Pen/Strep Nährmedium aufgereinigt (zentrifugiert wurde 20 min lang bei 2000 min^{-1} , RT, ohne Bremse). Nach zwei abschließenden Waschschritten mit dem RPMI1640/10% FCS/Pen/Strep konnten die IELs für eine durchflusszytometrische Analyse gefärbt werden.

2.2.2.2 Erythrozyten-Lyse

Um die eventuell vorhandene Erythrozyten aus den präparierten Zellsuspensionen (gilt insbesondere für die Analyse der Blutlymphozyten) zu eliminieren wurden letztere mit einem hypotonischen Erythrozytenlyse-Puffer (Tabelle 4) 5 min lang auf Eis behandelt. Dieser Puffer bringt durch seine Beschaffenheit die Erythrozyten dazu durch die übermäßige Wasseraufnahme zu platzen.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die absoluten Zahlen der analysierten Zellpopulationen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Gesamtzahlen der isolierten Zellen mittels Trypanblau-Färbung und einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2. Materialien und Methoden

2.2.2.4 Blocken von Fc γ -Rezeptoren

Sowohl für die durchflusszytometrische Analysen, als auch für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Antikörper des IgG-Isotyps verwendet. Einige Zelltypen (Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen) exprimieren Fc γ -Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche, welche IgG-Moleküle erkennen und binden können. Um das unspezifische Binden von fluorochromgekoppelten Antikörpern an diese Zellen zu verhindern, wurden die Zellsuspensionen bzw. die Gewebeschnitte vor der eigentlichen Färbung mit einem anti-Fc γ R-Antikörper (DRFZ) behandelt.

2.2.3 Durchflusszytometrische Methoden

2.2.3.1 Färbung von Oberflächenantigenen

Die Zellfärbung für Durchflusszytometrie-Messungen erfolgte grundsätzlich auf 96-Loch Platten mit flachem Boden. Dazu wurden die hergestellten Zellsuspensionen nach dem Blocken von Fc γ -Rezeptoren und der anschließenden Behandlung mit dem Fixable Viability Dye (eBioscience) auf der Platte verteilt und drei Minuten lang bei 1500 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden ausgeschüttelt und die Zellpellets in je 50 μ l des entsprechenden Antikörper-Cocktails resuspendiert. Gefärbt wurde 30 min bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Platte mit PBS/0,5% BSA Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Wenn durch den Versuchsaufbau bedingt eine Färbung mit dem Sekundär-Antikörper notwendig ist, wurde diese ebenfalls bei 4 °C für 20 min durchgeführt. Nach dem abschließenden Waschschrift sind die Zellen für die Fixierung und eventuelle Färbung von intrazellulären Antigenen bereit.

2.2.3.2 Färbung von intrazellulären und intranukleären Antigenen

Für die Färbungen von intrazellulären bzw. intranukleären Antigenen sollten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Für die Fixierung wurde der Fixierungspuffer von eBioscience verwendet. Die Zellen wurden mit jeweils 100 μ l Fixierungspuffer auf einer 96-well Platte über Nacht bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Permeabilisationspuffer gewaschen (Zentrifugation für 3 min bei 1500 min⁻¹ und 4 °C). Die Antikörper für die intrazelluläre Färbung wurden ebenfalls im 1x Permeabilisationspuffer verdünnt und auf die gewaschenen Zellen aufgetragen. Intrazelluläre Färbung dauerte 30 min bei 4 °C. Im

2. Materialien und Methoden

Anschluss wurden die Zellen ein zusätzliches Mal gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 200 μ l PBS/0,5% BSA resuspendiert.

2.2.3.3 Durchflusszytometrie

Diese Methode ermöglicht die Detektion von verschiedenen Zellpopulationen anhand der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern und intrazellulären Molekülen. Die molekulspezifischen Antikörper sind mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert, welche durch einen Durchflusszytometer erfasst werden. Für die durchflusszytometrische Analysen wurden die Zytometer Canto und LSR II von BD Bioscience benutzt. Die aufgenommenen Daten wurden mittels FlowJo 7.6.5 oder FlowJo 10 Software ausgewertet.

In der Abbildung 1 ist eine typische Auswertung der durchflusszytometrischen Daten anhand der T-Lymphozyten-Analyse gezeigt.

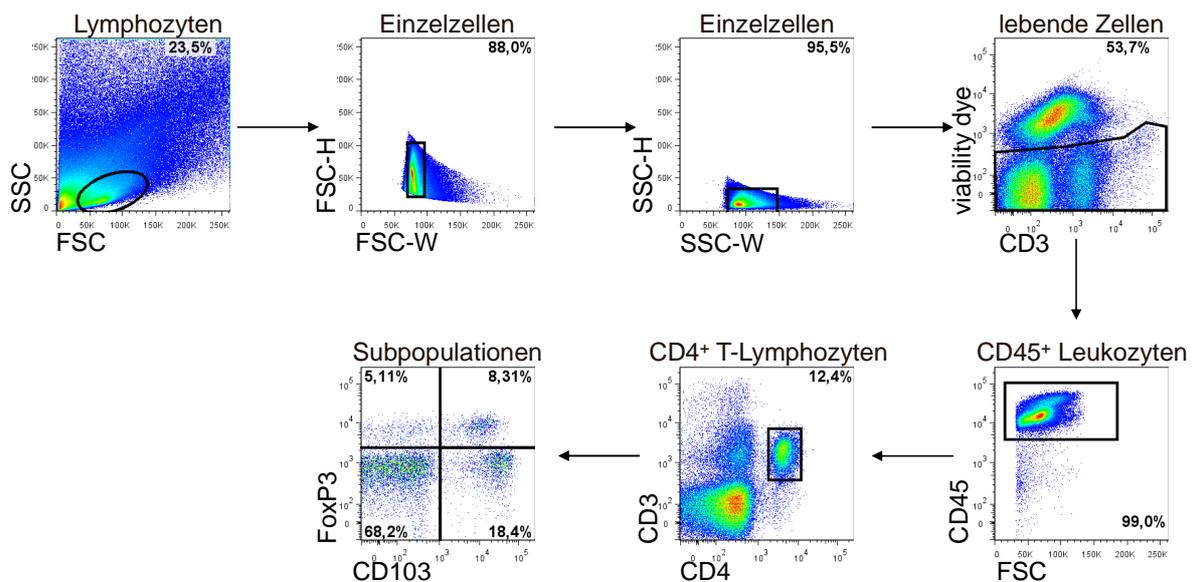


Abbildung 8: Typisches Eingrenzungsschema bei der durchflusszytometrischen Analyse.

Nach der Eingrenzung der Lymphozyten erfolgt der Ausschluss von den Zellduplikaten und den toten Zellen. Anschließend werden die CD45+ Leukozyten eingegrenzt um den Kompartiment der Stromalen Zellen auszuschließen. Die CD4+ T-Lymphozyten werden als CD3+ CD4+ Zellen definiert und lassen sich schließlich nach ihrer Expression von FoxP3 und CD103 in Subpopulationen aufteilen.

2. Materialien und Methoden

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolierung der genomischen DNA aus Mausbiopsien

Mausschwanzbiopsien wurden von den vier bis sechs Wochen alten Tieren entnommen. Anschließend werden sie in 400 µl TNES-Puffer mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Verdaute Mausschwanzbiopsien wurden 10000 min⁻¹ für 10 min zentrifugiert. 250 µl des Überstandes wurden mit 600 µl des 100% Ethanol gemischt und eine Stunde lang bei -80 °C inkubiert um die DNA zu präzipitieren. Die DNA wurde dann zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Die gewaschenen DNA-Pellets wurden bei 55 °C getrocknet, um die Ethanolreste zu beseitigen und anschließend in 200 µl ddH₂O über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gelöst.

2.2.4.2 Genotypisierung der PHIL-Mäuse

Da die PHIL-Mäuse heterozygot gezüchtet werden, sollen die PHIL-positiven Tiere von ihren C57BL/6-Wurfgeschwistern anhand der Genotypisierung unterschieden werden. Dazu wurde das Vorhanden des Diphtheriatoxin-Gens in der genomischen DNA mit Hilfe von spezifischen Primern mittels PCR-Reaktion untersucht.

Tabelle 8: Mastermix für PHIL-Genotypisierung

Reagenz	x1	Endkonzentration
10x DreamTaq Green Buffer	2,5 µl	1x
dNTPs	2,5 µl	0,5 mM
Vorwärtsprimer	0,5 µl	0,2 µM
Rückwärtsprimer	0,5 µl	0,2 µM
DreamTaq Polymerase	0,1 µl	0,5 U
H ₂ O	17,9 µl	

Tabelle 9: Primersequenzen für PHIL-Genotypisierung

Primer	Sequenz
EPO F 221	5' AAG TAT GAT GGG GGT GTT TC 3'
DTA R 224	5' GAG CGG GTT TTC ATT ATC TAC 3'

2. Materialien und Methoden

Tabelle 10: PCR-Reaktion für PHIL-Genotypisierung

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	3 min	
94 °C	1 min	35x
53 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	Pause	

Das erhaltene PCR-Produkt besitzt eine Größe von 447 Basenpaare (bp).

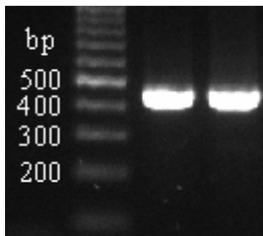


Abbildung 9: Genotypisierung der PHIL-Mäuse.

Die PCR-Reaktion für PHIL-Genotypisierung liefert bei den PHIL-Mäusen ein 447 Basepaare großes Produkt.

2.2.4.3 RNA Isolierung

Durchflusszytometrisch isolierte Zellen bzw. homogenisiertes Gewebe wurde in 250 μ l TRIzol Reagent aufgenommen und bei -20 °C eingefroren, um die Ausbeute der gewonnenen RNA zu erhöhen. Im nächsten Schritt wurden die Lysate aufgetaut, vortext und nach der Zugabe von 50 μ l Chloroform bei 12000 g und 4 °C 15 min lang zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation entstandene obere Wasserphase (ca. 80-90 μ l) wurde in die neuen Tubes mit bereits vorgelegten 2 μ l Glykogen aufgetragen und mit 125 μ l Isopropanol gemischt. Das Gemisch wurde erneut bei 12000 g und 4 °C 30 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und bei 50 °C getrocknet, bis alle Ethanolspuren entfernt wurden. Gelöst wurde das RNA-Pellet in 20 μ l des RNase-freien Wasser. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop-Gerätes (Thermo Scientific) bestimmt.

2. Materialien und Methoden

2.2.4.4 cDNA Synthese

Die cDNA wurde mittels Sensiscript Kits von Qiagen synthetisiert. Dazu wurde der folgende Mastermix hergestellt:

Tabelle 11: cDNA-Mastermix

Reagenz	x1	Endkonzentration
10x RT Puffer	2 μ l	1x
dNTPs	2 μ l	0,5 mM
random Primer (Hexamere)	2 μ l	0,1 mM
Oligo dT Primer	1 μ l	0,05 mM
RNase Inhibitor	0,3 μ l	12 U
Sensiscript Reverse Transkriptase	1 μ l	1 U
H ₂ O	10,7 μ l	

Zu den 19 μ l des cDNA-Mastermixes wurde 1 μ l der RNA-Lösung hinzu pipettiert und die reverse Transkriptase Reaktion wurde in einem PCR-Gerät mit dem folgenden Programm gestartet:

Tabelle 12: Programm für die reverse Transkriptase Reaktion (cDNA-Synthese)

Temperatur	Zeit
37 °C	1 Stunde
95 °C	5 min
4 °C	Pause

2.2.4.5 Analyse der bakteriellen DNA

Frische Mausfäzes wurden gesammelt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die bakterielle DNA wurde mittels QIAamp DNA Stool Mini Kit von Qiagen mit der Hochtemperatur-Bakterienlyse (95 °C) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die relativen Mengen von Darmflorabakteriengruppen wurden mittels qRT-PCR und gruppenspezifischen 16S rDNA Primern¹⁴⁶ quantifiziert. Das gemeinsame 172 bp-große Fragment der 16S rDNA wurde als interne Referenz verwendet, um die Gesamtmenge von Eubacteria zu bestimmen. Folgende bakterielle Gruppen wurden gemessen: Bact (*Bacteroides*), MIB (*mouse intestinal bacteroides*), Erec (*Eubacterium rectal/Clostridium coccoides*), Lact (*Lactobacillus/Enterococcus*) und SFB (*segmented filamentous bacteria*).

2. Materialien und Methoden

Tabelle 13: 16S rDNA Primer

Bakteriengruppe	Forwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Bact	5'-GGT TCT GAG AGG AGG TCC C-3'	5'-CTG CCT CCC GTA GGA AT- 3'
Erec	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'	5'-GCT TCT TAG TCA GGT ACC GTC A-3'
Lact	5'-AGC AGT AGG GAA TCT TCC-3'	5'-CAC CGC TAC ACA TGG A-3'
MIB	5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA-3'	5'-CGC ATT CCG CAT ACT TCT C-3'
Eubacteria	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3'	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3'
SFB	5'-GAC GCT GAG GCA TGA GAG CA-3'	5'-GAC GGC ACG GAT TGT TAT TC-3'

2.2.4.6 Qualitative real time PCR (qRT-PCR)

Für die Quantifizierung der Genexpression bestimmter Gene wurde der qRT-PCR Mastermix mit den Reagenzien aus dem Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit von Roche wie folgt vorbereitet:

Tabelle 14: qRT-PCR Mastermix

Reagenz	x1	Endkonzentration
Solution 1 (Fast start Enzymmix)	1 µl	1x
Solution 2 (MgCl ₂)	1,5 µl	3,75 mM
Solution 3 (H ₂ O)	5,5 µl	
Forwärtsprimer	0,5 µl	0,5 µM
Rückwärtsprimer	0,5 µl	0,5 µM

Der qRT-PCR Mastermix wurde auf der 96-Well Platte verteilt und 1 µl cDNA wurde pro Vertiefung hinzugefügt. Die Platte wurde 3 min lang bei 300 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert und die Reaktion in Duplikaten mit dem qRT-PCR Programm durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

Tabelle 15: qRT-PCR Programm

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
95 °C	10 min	
95 °C	30 sec	50x
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
95 °C	10 sec	
65 °C	20 sec	
95 °C	30 sec	

Die relative Genexpression wurde zu der Expression von β -Aktin normalisiert. Die relative mRNA Expression wurde mittels der vergleichenden CT-Methode berechnet.

$$\Delta CT = CT^{\text{Gen}} - CT^{\beta\text{-Aktin}}$$

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta CT}$$

2.2.5 Sonstige Methoden

2.2.5.1 Immunhistologische Methoden

Einbetten von Gewebe und die Herstellung von Gewebeschnitten

Gewebestücke wurden vorsichtig ins OCT compound eingelegt und ausgerichtet. Das eingelegte Gewebe wurde in auf Trockeneis vorgekühltem 2-Methyl-Butan eingefroren, um dadurch das schnelle und gleichmäßige Einfrieren des Gewebes zu gewährleisten.

Das Gewebe wurde in die 7 μm dicke Schnitte geschnitten, welche anschließend 20 Minuten lang in Aceton fixiert wurden. Nach dem Austrocknen von Aceton wurden die Objektträger bis zur Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung

Alle Arbeitsschritte der Immunfluoreszenzfärbung erfolgten in einer befeuchteten, dunklen Kammer bei Raumtemperatur. Es wurde darauf geachtet, die Gewebeschnitte bei keinem der Schritte austrocknen. Zunächst wurde das Gewebe auf dem Objektträger für wenige Minuten mit PBS rehydriert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindestellen mit Fc γ R-Lösung in PBS/BSA Puffer für 20 Minuten geblockt. Nach dem Blocken erfolgte die eigentliche Färbung der Schnitte mit Antikörper-Konjugaten in PBS/BSA für 45 Minuten. Fünf Minuten

2. Materialien und Methoden

vor dem Ende der Färbung wurden die Zellkerne mittels DAPI-Lösung gegengefärbt. Nach dem Färben wurden die Gewebeschnitte zuerst in PBS und dann in Wasser gründlich aber vorsichtig gespült und anschließend mittels Fluoromount-Deckmedium und Deckglas bedeckt. Die Objektträger wurden vor dem Mikroskopieren mindestens eine Stunde lang getrocknet.

Laserrastermikroskopie (Laser scanning microscopy (LSM))

Die Visualisierung von Fluoreszenzfärbung der Gewebeschnitte erfolgte mit einem konfokalen Laserrastermikroskop. Die aufgenommenen Abbildungen wurden mittels der ZEN2011-Software von Zeiss bearbeitet.

2. Materialien und Methoden

2.2.5.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Detektion von IgA in Kot und Serum erfolgte mittels ELISA. Dazu wurden die Mäusfäzes gesammelt, eingewogen und in der entsprechenden Menge von sterilem PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte nach dem in der Tabelle 16 zusammengefassten Protokoll:

Tabelle 16: ELISA-Arbeitsprotokoll

Arbeitsschritt	Reagenz/Puffer	Zeit/Temperatur
Beschichtung der ELISA-Platte	ELISA-Fangantikörper Goat anti-mouse Ig(H+L), Southern Biotech, 1:1000 in PBS	Über Nacht 4 °C
Waschen	PBST-Waschpuffer	3x
Blocken von unspezifischen Bindungsstellen	ELISA-Blocking Puffer	1 Stunde, RT
Verdünnen und Anbringen von Proben und IgA-Standard	Mouse IgA, Southern Biotech	1 Stunde, RT
Waschen	PBST-Waschpuffer	3x
Detektion	ELISA-Detektionsantikörper Goat anti-mouse IgA-AP, Southern Biotech, 1:2000 im ELISA-Blocking Puffer	1 Stunde, RT
Entwicklung	ELISA-Alkalische Phosphatase Substrat SIGMAFAST p-Nitrophenyl phosphate, Sigma	Ca. 20 min
Auslesen der Platte bei 405 nm		

2. Materialien und Methoden

2.2.5.3 Enzyme linked immunospot assay (ELISpot)

Die Untersuchung der Sekretionsrate von IgA durch die Plasmazellen der Lamina propria wurde mittels ELISpot durchgeführt. Die isolierten Zellen der Lamina propria wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf die ELISpot-Platte aufgetragen. Die Bestimmung der Spotgröße erfolgte durch das EliSpot6 Software. Das ELISpot-Arbeitsprotokoll ist in der Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: ELISpot-Arbeitsprotokoll

Arbeitsschritt	Reagenz/Puffer	Zeit/Temperatur
Aktivierung der ELISpot-Platte	35% Ethanol-Lösung in 1x PBS	5 Minuten
Waschen	1x PBS	3x
Beschichtung der ELISpot-Platte	Goat anti-mouse Ig(H+L), Southern Biotech, 1:1000 in PBS	Über Nacht, 4 °C
Waschen	PBST-Waschpuffer	3x
Blocken von unspezifischen Bindungsstellen	RPMI1640/10% FCS	30 Minuten, 37 °C
Verdünnen und Anbringen der Lamina propria Zellen	in RPMI1640/10% FCS	5 Stunden oder über Nacht, 37 °C
Waschen	PBST-Waschpuffer	3x
Detektion	Goat anti-mouse IgA-AP, Southern Biotech, 1:2000	Über Nacht, 4 °C
Waschen	PBST-Waschpuffer 1x PBS	2x 1x
Entwicklung	1-Step NBT/BCIP-Substrat, ThermoFisher Scientific	20-30 Minuten
Waschen	fließendes Wasser	
Auslesen der Platte		

Das Auslesen und Auswerten der ELISpot-Platten erfolgte am EliSpot Reader Classic Gerät von AID mittels EliSpot6 Software. Dabei wurde die mittlere Fleckgröße pro einzelne Vertiefung der Platte bestimmt.

2. Materialien und Methoden

2.2.6 Statistische Auswertung

Bei den Auswertungen der statistischen Signifikanz der Daten wurde der abhängige Zweistichproben-t-Test verwendet. Die Höhe der Signifikanz wurde durch den P-Wert bestimmt: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1 Die Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten führt zu Veränderungen der Zellpopulationen in den Immunkompartimenten des Dünndarmes

Der Einfluss der Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten auf die weiteren Veränderungen in den Immunkompartimenten des Dünndarmes sollte untersucht werden. Dazu wurden die Zellen aus der Dünndarm Lamina propria, den Peyer Plaques und dem Epithel des Dünndarmes der Δ dblGATA-1 Tiere sowie deren Wildtypkontrollmäuse des BALB/c Stammes isoliert und durchflusszytometrisch sowie mit Hilfe des ELISpot-Assays analysiert.

In darauffolgenden Experimenten sollten die Populationen von B- und T-Lymphozyten sowie der dendritischen Zellen in den Immunkompartimenten des Dünndarmes näher untersucht werden.

3.1.1 Untersuchung der Immunzellen in der Lamina propria des Dünndarmes

In der Abbildung 10A sind die $CD45^+ IgA^+ B220^-$ Plasmazellpopulation aus der Lamina propria der BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse gezeigt. Der prozentuale Anteil sowie die absolute Anzahl dieser Zellpopulation in den Δ dblGATA-1 Tieren sind verringert im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abbildung 10A). Zusätzlich wurde die Expression der B220- und MHCII-Moleküle an der Oberfläche der IgA^+ Plasmazellen mittels Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Die Analyse ergab, dass die Expression dieser Oberflächenmoleküle durch die IgA^+ Plasmazellen der eosinophil-defizienten Mäuse höher ist als in den Kontrolltieren (Abbildung 10B). Anschließend wurde die Menge des sekretierten IgA zur ergänzenden Charakterisierung der Plasmazellen der Lamina propria bestimmt. Die mittlere Fleckgröße pro Vertiefung wurde mittels EliSpot6 Software berechnet. Die Analyse ergab, dass die mittlere Fleckgröße pro Vertiefung von IgA^+ Plasmazellen der Δ dblGATA-1 Tiere im Durchschnitt kleiner ist, als die von IgA^+ Plasmazellen der Kontrollmäuse (Abbildung 10C)

3. Ergebnisse

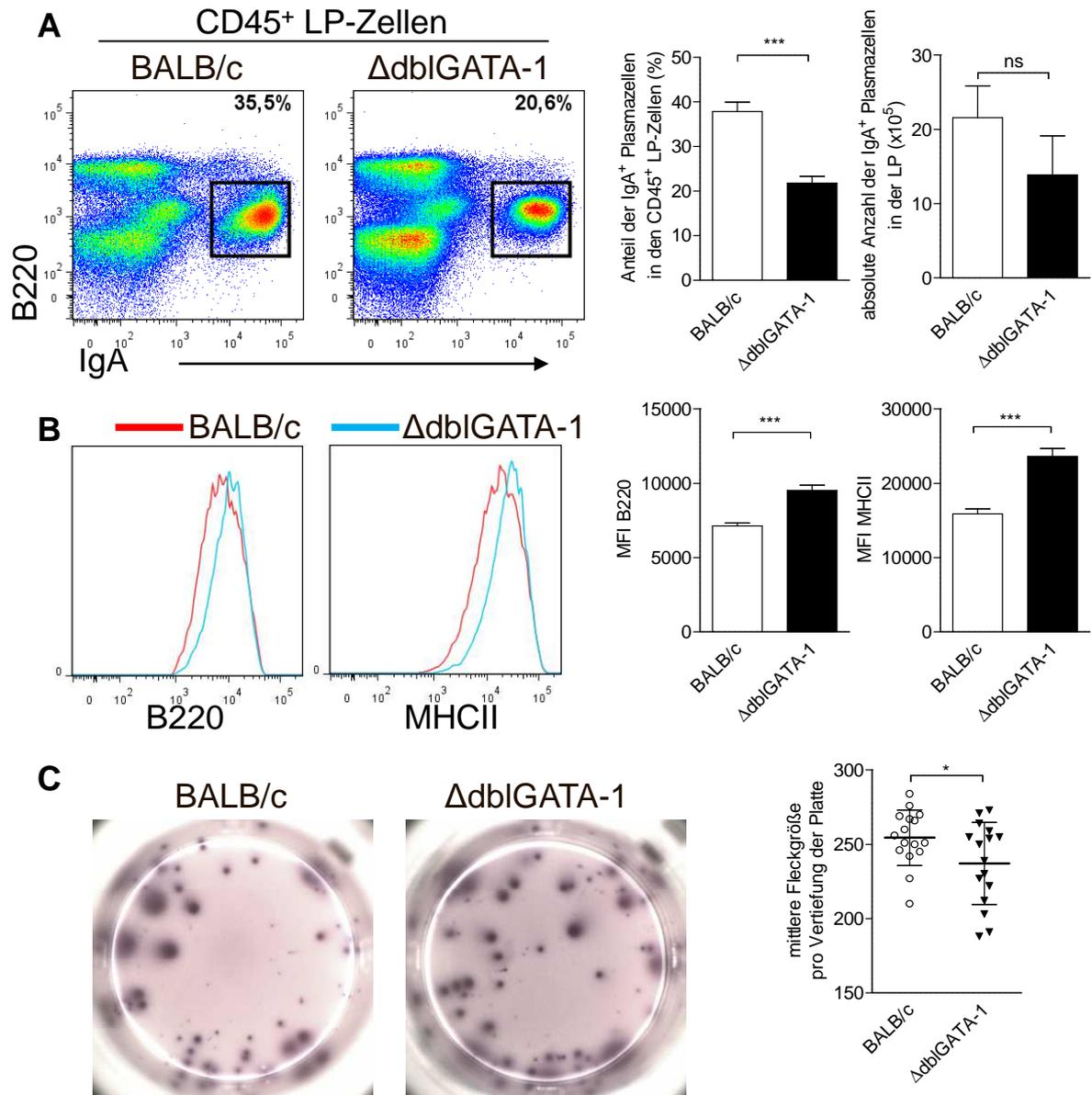


Abbildung 10: Veränderungen in den IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria von Δ dblGATA-1 Mäusen.

Zellen der Lamina propria wurden aus dem Dünndarm der Tiere präpariert und durchflusszytometrisch (A und B) bzw. mittels ELISpot (C) analysiert.

A: Gezeigt sind FACS-Plot Ergebnisse für lebende CD45⁺ B220⁻ IgA⁺ Zellen. Der Prozentsatz der IgA⁺ Plasmazellen in der LP ist angegeben für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen in der LP sind mit Hilfe von Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe.

B: Die Expression von B220 und MHCII der LP IgA⁺ Plasmazellen der BALB/c (rot) und der Δ dblGATA-1 Tiere (blau) wurde durch die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels der FlowJo7.6.5 Software bestimmt. Die repräsentativen Graphen pro Mausstamm (links) sowie die zusammenfassende Auswertung (rechts) sind gezeigt.

C: Unter Verwendung einer 96 Lochplatte wurde in einer Verdünnungsreihe die Zahl der Plasmazellen in der LP der BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen mittels ELISpot bestimmt (links). Das Auslesen der Platte und die Bestimmung der mittleren Fleckgröße pro Vertiefung (rechts) erfolgte am EliSpot Reader Classic Gerät (AID) mittels EliSpot6 Software. Die Daten zeigen vorläufige Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Die Analyse der CD3⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Tiere zeigte ebenfalls starke Abweichungen gegenüber den Kontrollmäusen des BALB/c Stammes. In eosinophil-defizienten Tieren ist der prozentuale Anteil den Darm besiedelnden CD3⁺ CD4⁺ CD103⁺ T-Lymphozyten verringert, während deren absolute Anzahl in der Lamina propria normal erscheint (Abbildung 11A). Eine gleichzeitige Analyse der Expression des spezifischen Transkriptionsfaktors der T-regulatorischen Zellen und CD103 auf den CD3⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten ergab, dass die Population CD3⁺ CD4⁺ CD103⁺ FoxP3⁻ nonTreg-Lymphozyten in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse verringert ist, während die FoxP3⁺ T-Zellpopulationen unverändert bzw. leicht erhöht sind (Abbildung 11B). Ebenfalls die Population von CD3⁺ CD4⁺ ROR γ t⁺ Th17-Lymphozyten ist in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse reduziert (Abbildung 11C).

3. Ergebnisse

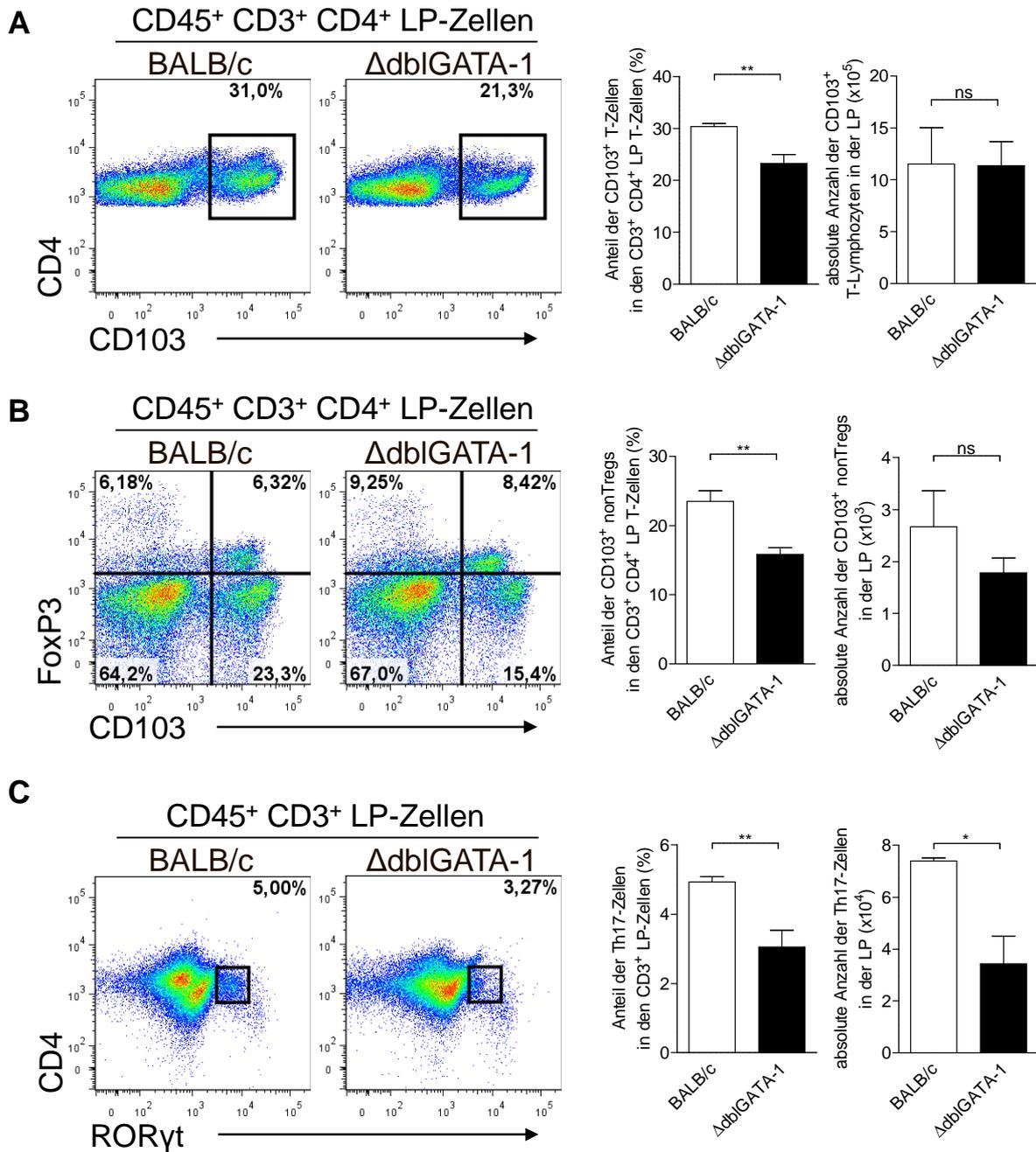


Abbildung 11: Veränderungen in den Populationen der T-Lymphozyten in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Tiere.

Die Zellen der Lamina propria wurden wie unter Abbildung 1 beschrieben isoliert und analysiert. Die Population der CD4⁺ T-Lymphozyten wurde als lebende CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ Zellen definiert und eingegrenzt. Die Subpopulationen der CD4⁺ T-Lymphozyten wurden anhand der Expression der populationsspezifischen Transkriptionsfaktoren FoxP3 (Tregs, B) und ROR γ t (Th17, C) sowie des Markers CD103 (A und B) unterschieden. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden T-Lymphozytenpopulationen in der LP sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der untersuchten T-Lymphozytenpopulationen in der LP sind in Balkendiagrammen dargestellt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Die Untersuchung der dendritischen Zellen der Lamina propria ergab zunächst, dass die Gesamtpopulation von CD11c⁺ Zellen in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den Kontrolltieren unverändert ist (Abbildung 12A). Eine detaillierte Analyse der DC-Subpopulationen ergab, dass die Subpopulationen der von den Monozyten abstammenden CX3CR1⁺ dendritischen Zellen (moDCs) sowie der PDCA-1⁺ plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den Kontrolltieren ebenfalls unverändert sind (Abbildung 12B). Allerdings konnte eine Verschiebung in den Populationen der CD11c⁺ CD103⁺ Zellen in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse festgestellt werden (Abbildung 12C). In der Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten ist der prozentuale Anteil sowie die absolute Anzahl der CD103⁺ MHCII⁻ Zellen verringert, während die CD103⁻ MHCII⁻ Population erhöht ist (Abbildung 12C).

3. Ergebnisse

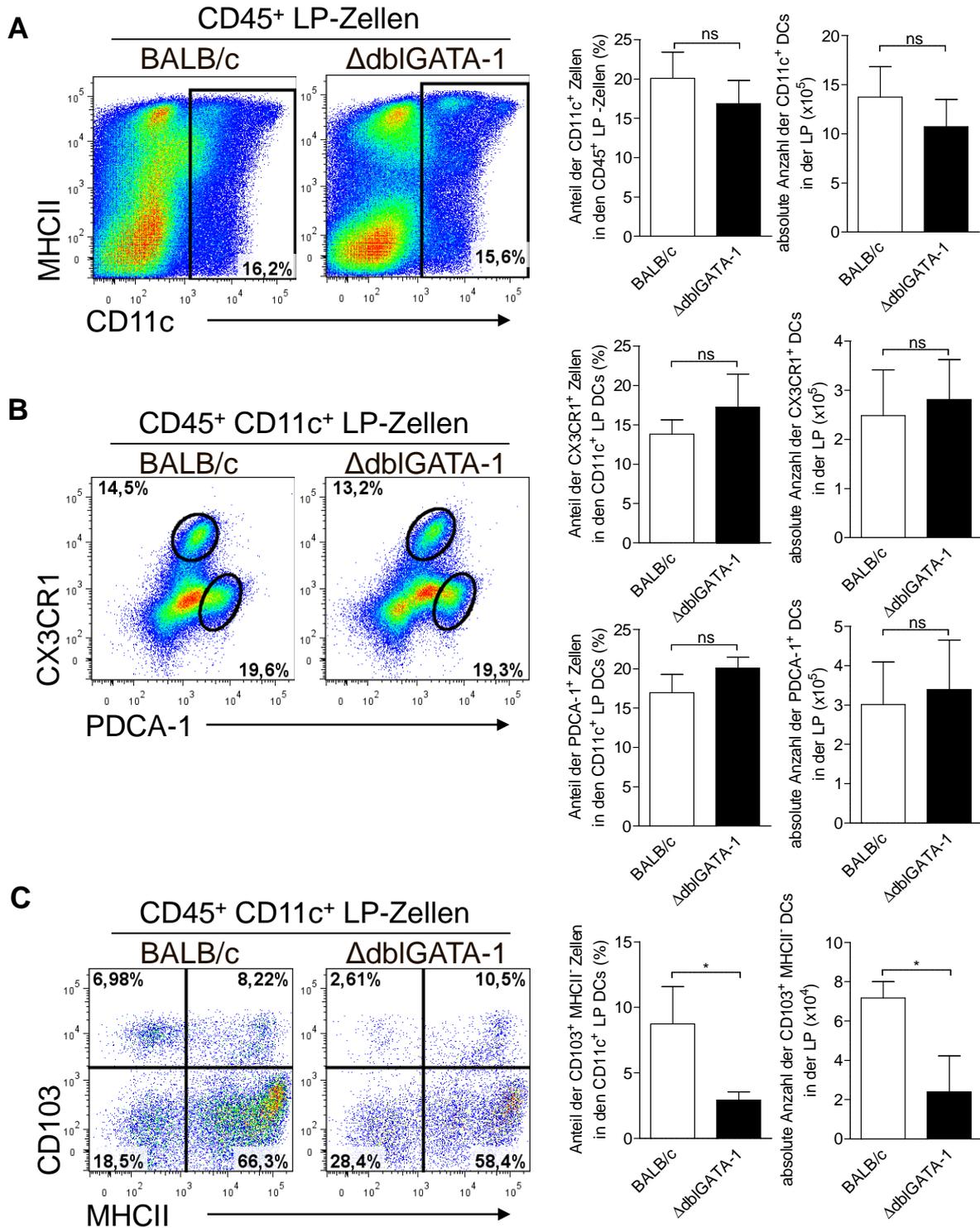


Abbildung 12: Die Population von CD11c⁺ CD103⁺ MHCII⁺ Zellen ist in der Lamina propria der Δ dbiGATA-1 Mäuse verringert.

Die Zellen der Lamina propria wurden wie unter Abbildung 1 beschrieben isoliert und analysiert. Die Population der CD11c⁺ Zellen wurde als lebende CD45⁺ CD11c⁺ Zellen definiert und eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der CD11c⁺ Zellen wurden anhand der Expression der populationsspezifischen Markern CX3CR1 (moDCs) und PDCA-1 (pDCs) (B) sowie CD103 und MHCII (C) unterschieden. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Zellpopulationen in der LP sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dbiGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der

3. Ergebnisse

untersuchten Zellpopulationen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3.1.2 Analyse der intraepithelialen Lymphozyten des Dünndarmes

Die Subpopulationen der intraepithelialen Lymphozyten (IELs) des Dünndarmes wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Analyse der IELs nach ihrer Expression von TCR β und TCR $\gamma\delta$ ergab, dass die Subpopulation der TCR β^+ IELs in dem Dünndarm der Δ dblGATA-1 Tiere im Vergleich zu den Wildtypmäusen deutlich reduziert ist, während die Population der TCR $\gamma\delta^+$ IELs unverändert ist (Abbildung 13A).

Nähere Untersuchung der TCR β^+ IELs ergab, dass in den Δ dblGATA-1 Mäusen eine Disproportion zwischen CD8 $\alpha\alpha^+$ und CD8 $\alpha\beta^+$ Subpopulationen der TCR β^+ IELs aufweisen (Abbildung 13B). Der Dünndarm der Δ dblGATA-1 Mäuse enthält wesentlich weniger der CD8 $\alpha\beta^+$ TCR β^+ IELs als der Dünndarm der BALB/c Tiere, während die Population von CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR β^+ IELs in den Δ dblGATA-1 Tieren leicht erhöht ist (Abbildung 13B).

Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Populationen von TCR $\gamma\delta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ und TCR $\gamma\delta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$ IELs im Dünndarm der Δ dblGATA-1 Tiere unverändert sind (Abbildung 13C).

3. Ergebnisse

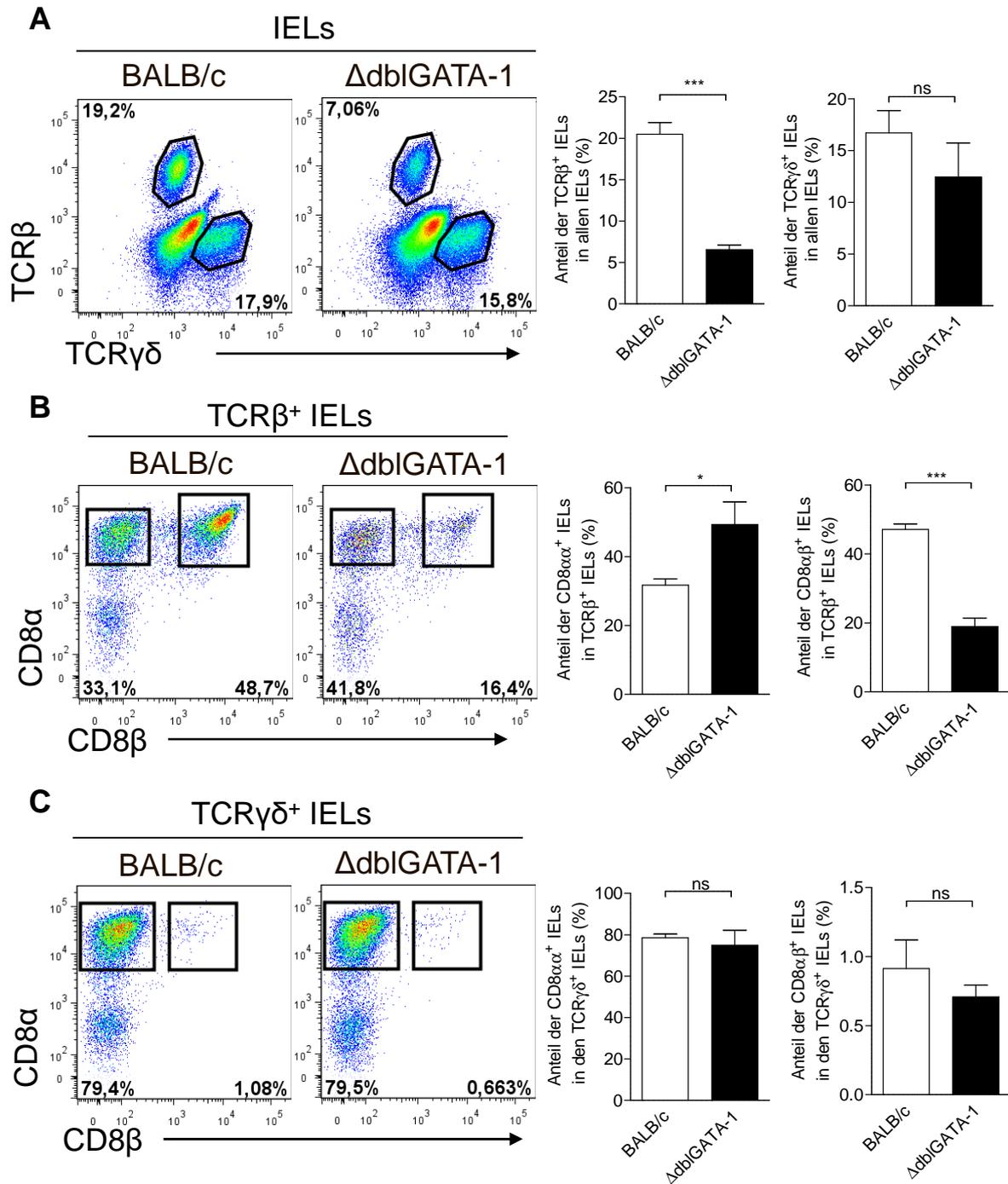


Abbildung 13: Verringerte Population der TCRβ⁺ CD8αβ⁺ IELs im Dünndarm der ΔdblGATA-1 Mäuse.

Die IELs des Dünndarmes wurden durch die EDTA-Behandlung abgetrennt und mit Hilfe von Percoll aufgereinigt. Die Hauptpopulation der IELs wurde als die Menge der lebenden TCRβ⁺ bzw. TCRγδ⁺ Zellen definiert und eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der TCRβ⁺ (B) bzw. TCRγδ⁺ (C) IELs wurden anhand ihrer Expression von CD8α und CD8β unterschieden. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden IEL Populationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine ΔdblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil der untersuchten IEL Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

3.1.3 Analyse der der Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere.

3.1.3.1 Bestimmung der Größe und der Struktur von Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse

Die Analyse der Peyer Plaques ergab zunächst, dass die die Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse deutlich kleiner gegenüber den Kontrolltieren des BALB/c Stammes sind (Abbildung 14A). Gleichzeitig wurden keine Unterschiede in der Anzahl der Peyer Plaques zwischen den beiden festgestellt. Für die absoluten Zellzahlen bedeutet die verringerte Größe der Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere, dass diese im Vergleich zu den Wildtypen wesentlich reduziert sind.

Obwohl deren Größe verringert ist, besitzen die Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 eine reguläre Follikelstruktur mit der normalen Aufteilung in die B- (B220⁺) und T-Zellzonen (CD4⁺) (Abbildung 14B). Der Großteil der CD11c⁺ dendritischen Zellen der Peyer Plaques ist außerhalb des B-Zellfollikels im subepithelialen Raum lokalisiert (Abbildung 14B).

3. Ergebnisse

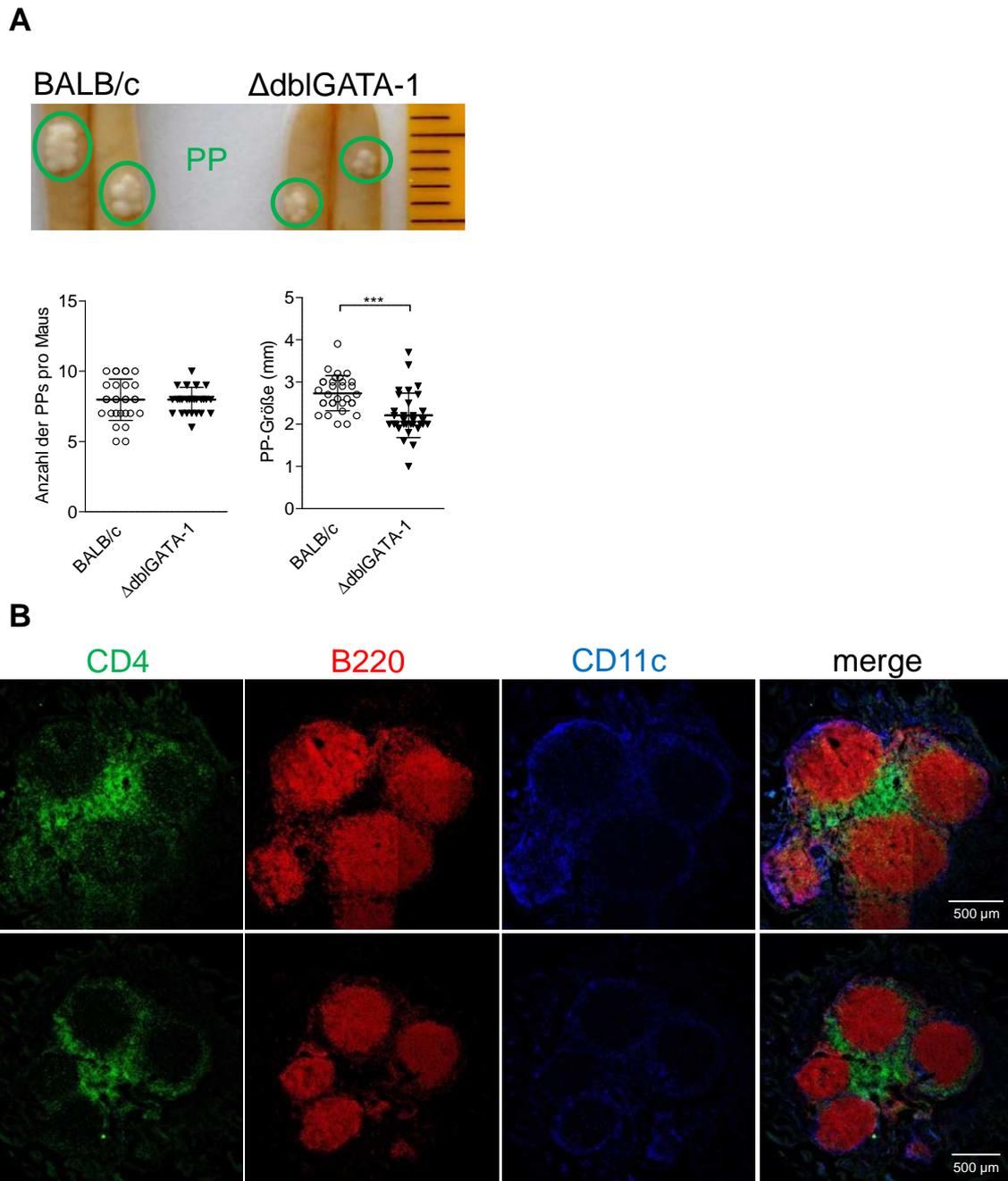


Abbildung 14: In der Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten ist die Größe der Peyer Plaques verringert

A: Der Dünndarm wurde in 10 %-iger Essigsäure fixiert und die Größe der PPs wurde mittels eines Stereomikroskops unter Vergrößerung bestimmt. Die Fotos der PPs für jeweils eine repräsentative BALB/c und Δ dblGATA-1 Maus sind gezeigt. Gezeigt sind zusammengefasste Ergebnisse der PP-Anzahl und der PP-Größe zweier unabhängiger Messungen mit drei bis fünf Mäusen pro Gruppe (unten). Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

B: Die T-Lymphozyten, die B-Lymphozyten und die dendritischen Zellen wurden mit den spezifischen Antikörpern gegen CD4 (grün), B220 (rot) und CD11c (blau) in den Gewebeschnitten der Peyer-Plaques mittels Konfokal-Mikroskopie visualisiert. Gezeigt sind die Abbildungen für eine repräsentative BALB/c (oben) und eine Δ dblGATA-1 Maus. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines 20x Objektivs durch die Verwendung einer Tile-Scan-Funktion.

3. Ergebnisse

3.1.3.2 Analyse der Zellpopulationen in der Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse

Trotz der normalen Follikelstruktur wurde eine Verschiebung in dem Verhältnis zwischen den B- und T-Lymphozyten in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse beobachtet. Die Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse enthalten prozentual weniger von den $CD3^+ CD4^+$ T-Lymphozyten (Abbildung 15B) bei der gleichzeitigen Erhöhung des prozentualen Anteils von den $B220^+$ B-Zellen (Abbildung 15A). Die absoluten Zahlen beider Lymphozyten-Populationen sind aufgrund der verringerten PP-Größe in den Δ dblGATA-1 Mäusen kleiner als in den Kontrolltieren des Wildtyps.

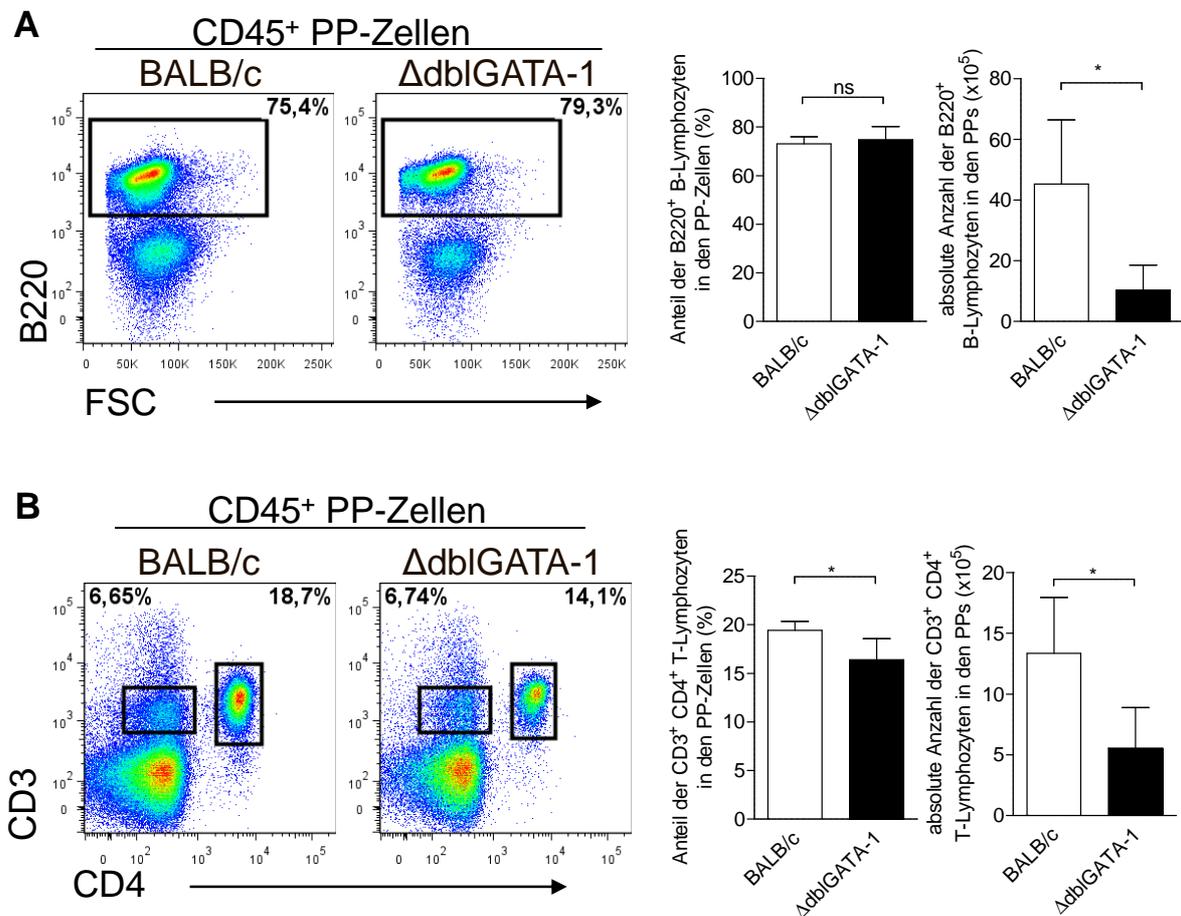


Abbildung 15: Das Verhältnis zwischen den B- und T-Lymphozyten in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere verschoben.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Population der $B220^+$ B-Zellen (A) sowie der $CD3^+ CD4^+$ T-Lymphozyten (B) wurden bestimmt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Zellpopulationen in den Peyer Plaques sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der untersuchten Zellpopulationen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Analyse der B220⁺ PNA^{hi} Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer Plaques mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass der prozentuale Anteil dieser Zellpopulation in den PPs der Δ dblGATA-1 Mäusen gegenüber den Kontrolltieren unverändert ist (Abbildung 16A). Die fluoreszenzmikroskopische Färbung der PP-Gewebeschnitte mit PNA bestätigte eine reguläre Struktur der Keimzentren in den PPs der Δ dblGATA-1 Tiere (Abbildung 16B).

Eine durchflusszytometrische Untersuchung der Keimzentrums-B-Zellen ergab, dass die Keimzentrums-B-Zellen der Δ dblGATA-1 Tiere den Klassenwechsel bevorzugt zu IgG1 und nicht zu IgA, wie es in den Wildtyptieren der Fall ist, führen (Abbildung 17A). Die Analyse der Gewebeschnitte von den Peyer Plaques bestätigte dieses Ergebnis (Abbildung 17B).

3. Ergebnisse

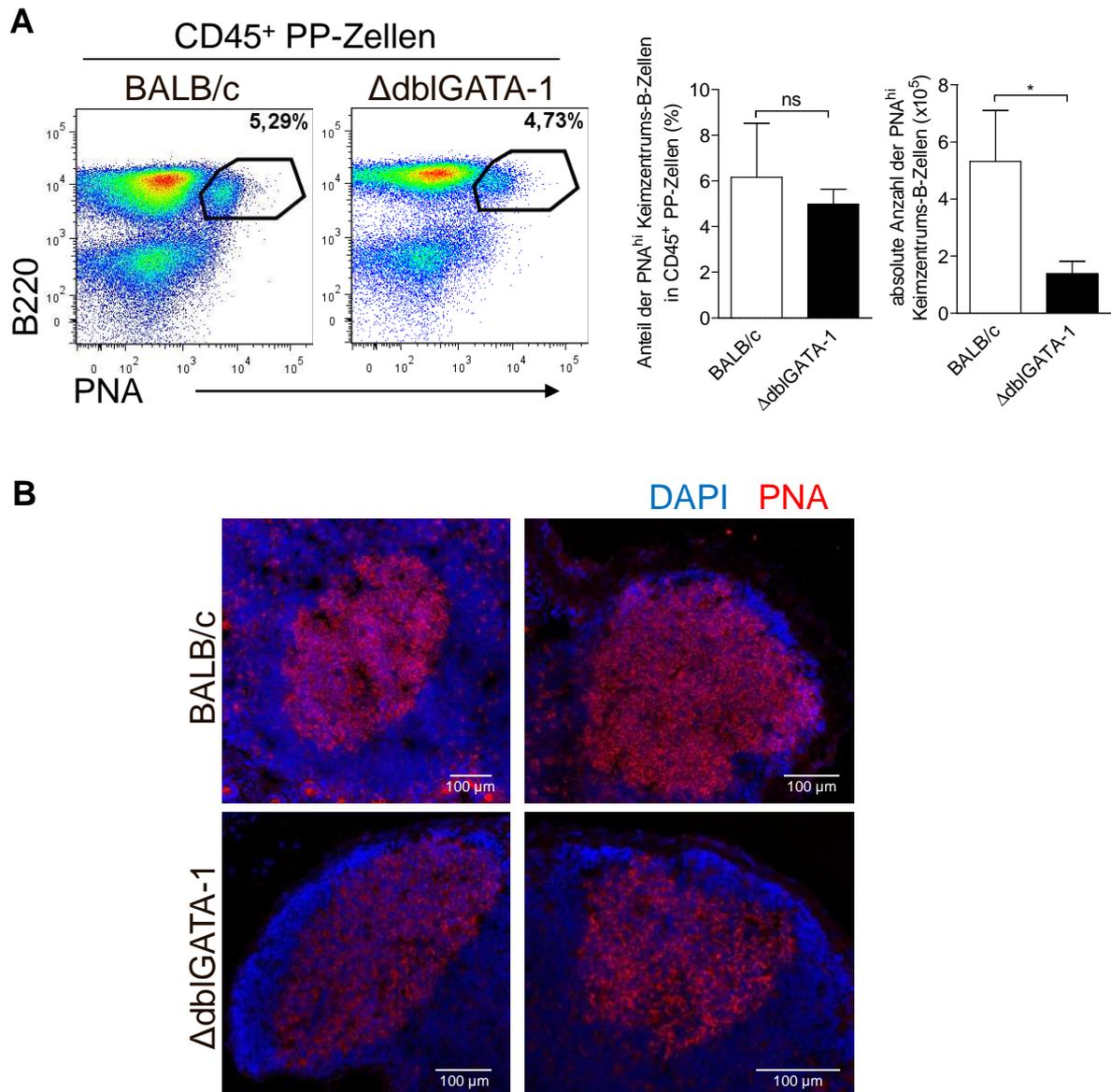


Abbildung 16: Die Subpopulation der Keimzentrums-B-Zellen ist in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäusen unverändert.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden mittels Durchflusszytometrie (A) und Fluoreszenzmikroskopie (B) analysiert. Die Keimzentrums-B-Zellen wurden anhand ihrer Fähigkeit an PNA zu binden als PNA^{hi} Zellen definiert (A und B). Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe.

A: Die Prozentsätze der B-Zellpopulationen sind angegeben für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der B-Zellpopulationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts).

B: Immunfluoreszenzfärbung der PP-Gewebeschnitten mit PNA (rot) und DAPI (blau). Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines 20x Objektivs an einem Konfokal-Mikroskop. Zwei repräsentative Abbildungen pro Mausstamm sind gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels abhängigem Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

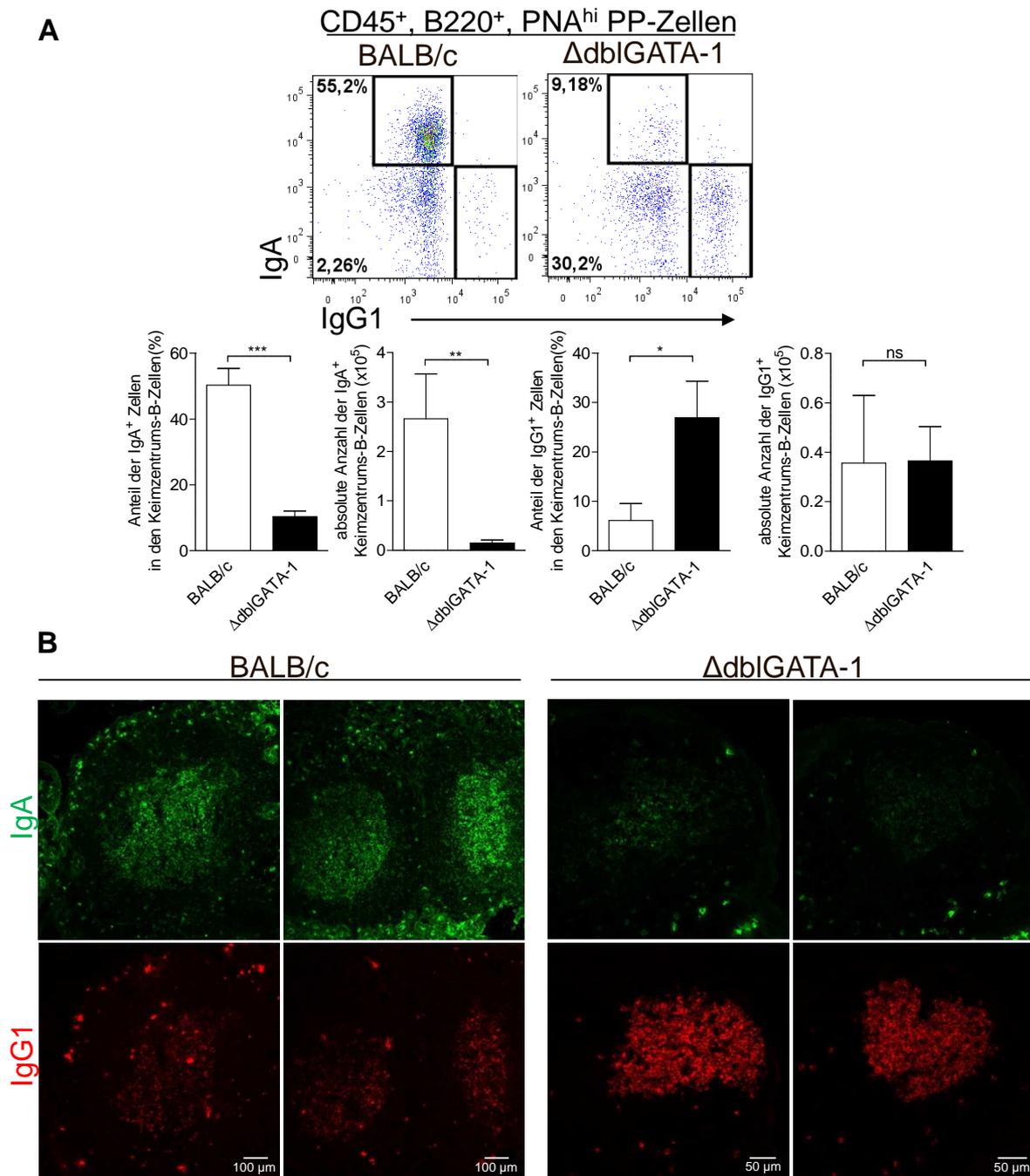


Abbildung 17: Die Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer-Plaques der ΔdbIGATA-1 Mäuse wechseln ihre Immunglobulinklasse vorrangig zu IgG1 und nicht zu IgA.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD45⁺ B220⁺ PNA^{hi} Keimzentrums-B-Zellen wurden anhand ihrer Immunglobulinklasse als IgA⁺ bzw. IgG1⁺ Keimzentrums-B-Zellen eingegrenzt (A). Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Keimzentrums-B-Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine ΔdbIGATA-1 Maus angegeben (oben). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie der absoluten Anzahl der entsprechenden B-Zellpopulationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (unten). C: Immunfluoreszenzfärbung der PP-Gewebeschnitten mit IgA (grün) und IgG1 (rot). Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines 20x Objektivs an einem Konfokal-Mikroskop. Eine repräsentative Abbildung pro Mausstamm ist gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Die B-Zellen, welche die Keimzentrumsreaktion durchlaufen, proliferieren mit einer sehr hohen Rate. Als Marker für die aktive Proliferation wird das Ki-67 Protein verwendet, welches in allen aktiven Zellphasen (G1, S, G2 und Mitose) exprimiert wird und während es in den ruhenden Zellen in der G0-Phase komplett fehlt.

Die intranukleäre Färbung von Ki-67 und die anschließende durchflusszytometrische Analyse von PP Keimzentrums-B-Zellen zeigte, dass der prozentuale Anteil der proliferierenden IgA-klassengewechselten B-Zellen in den Δ dblGATA-1 Tiere deutlich verringert ist gegenüber den BALB/c Mäusen (Abbildung 18A). Demnach exprimieren über 90% der IgA⁺ Keimzentrums-B-Zellen der Wildtypiere das Ki-67 Protein, während in den Δ dblGATA-1 Mäusen lediglich rund ein Drittel dieser Zellen sich in einer aktiven Zellphase befindet (Abbildung 18A).

Währenddessen ist der Anteil der Ki-67-exprimierenden Zellen innerhalb der IgG1⁺ Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse nicht verändert. Sowohl in den BALB/c, als auch in den Δ dblGATA-1 Tieren liegt der Anteil der proliferierenden IgG1⁺ Zellen über 90% (Abbildung 18B).

Um die Durchflusszytometrie-Daten zu verifizieren, wurde Ki-67 auch an den Gewebeschnitten der Peyer Plaques gefärbt. Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab ebenfalls, dass die Ki-67 exprimierende Zellen in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere zum größten Teil nicht IgA⁺ sind. Die Färbung der konsekutiven Schnitten mit einem anti-IgG1-Antikörper zeigte, dass diese Zellen IgG1 positiv sind. Währenddessen in den Peyer Plaques der Wildtypmäuse wurde eine Kolo-kalisation der IgA- und der Ki-67-Färbungen in denselben Zellen festgestellt (Abbildung 18C).

3. Ergebnisse

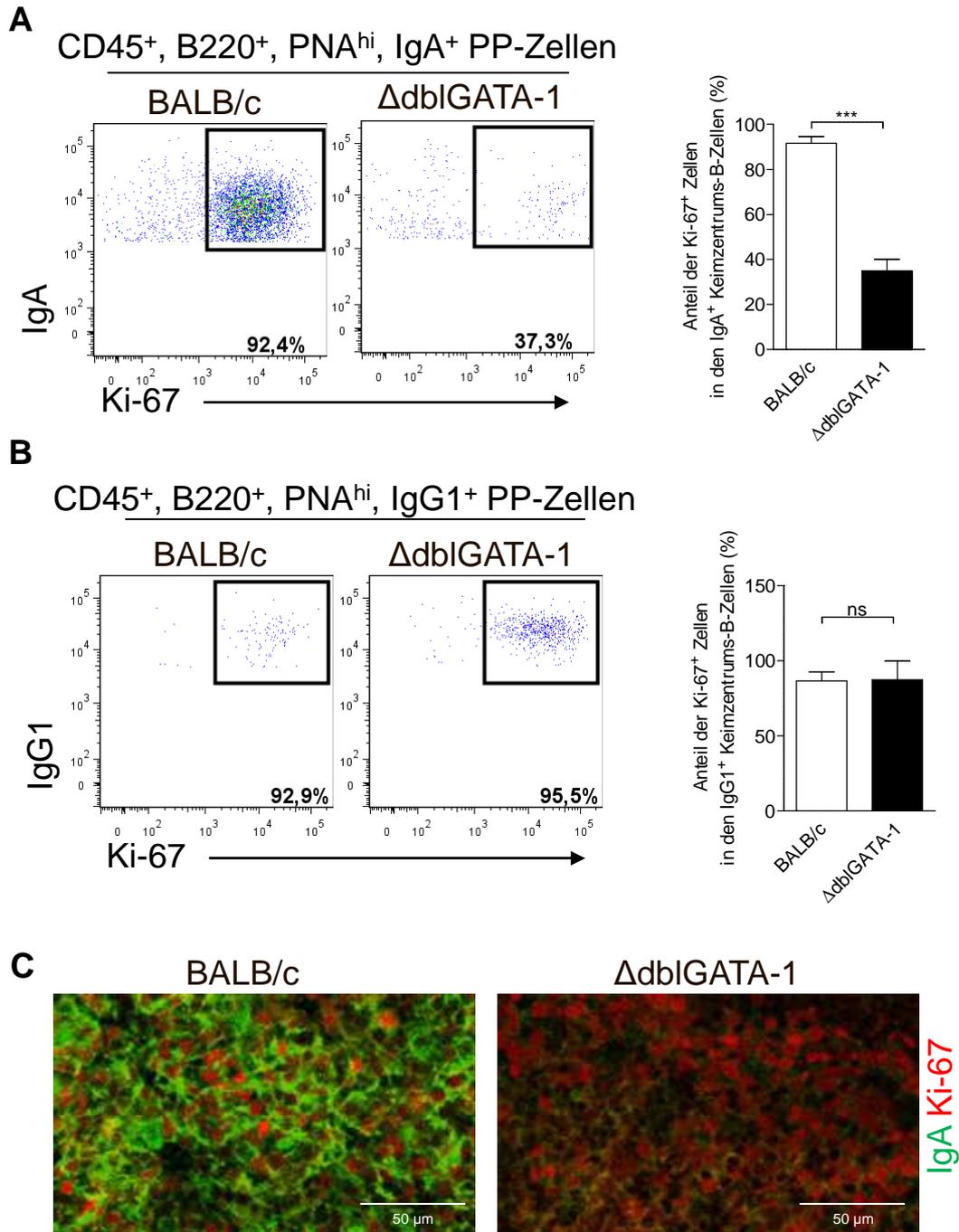


Abbildung 18: Die IgA⁺ Keimzentrums-B-Zellen (A) in den Peyer-Plaques der ΔdblGATA-1 Mäuse proliferieren weniger als in den Wildtypieren

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expression von Ki-67 Protein wurden in den IgA⁺ (A) bzw. IgG1⁺ (B) Keimzentrums-B-Zellen (CD45⁺ B220⁺ PNA^{hi}) analysiert. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Keimzentrums-B-Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine ΔdblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil der entsprechenden Ki-67⁺ Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). **C:** Immunfluoreszenzfärbung der PP-Gewebeschnitten mit IgA (grün) und Ki-67 (rot). Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines 20x Objektivs an einem Konfokal-Mikroskop. Eine repräsentative Abbildung pro Mausstamm ist gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Wie es bereits beschrieben wurde, ist der prozentuale Anteil der CD4⁺ T-Lymphozyten in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den Wildtyptieren verringert (Abbildung 15B). Gleichzeitig wurden keine Unterschiede in der Population von CD8⁺ T-Lymphozyten festgestellt (Abbildung 15B).

Eine Analyse von CXCR5⁺ PD-1⁺ TFH-Zellen in den Peyer Plaques ergab, dass der prozentuale Anteil dieser Zellpopulation in den Δ dblGATA-1 Mäusen im Vergleich zu den BALB/c Tieren signifikant reduziert ist (Abbildung 19A).

Ebenfalls wurde die Verringerung der Population von darmspezifischen CD103⁺ Foxp3⁻ non-T-regulatorischen Zellen (CD103⁺ nonTregs) beobachtet (Abbildung 19B), während die Populationen von FoxP3⁺ Tregs unabhängig ihrer CD103-Expression keine Veränderungen aufwiesen.

Im Gegensatz zu der Lamina propria konnten keine Veränderungen an der Population der ROR γ t⁺ Th17-Lymphozyten festgestellt werden (Abbildung 19C).

3. Ergebnisse

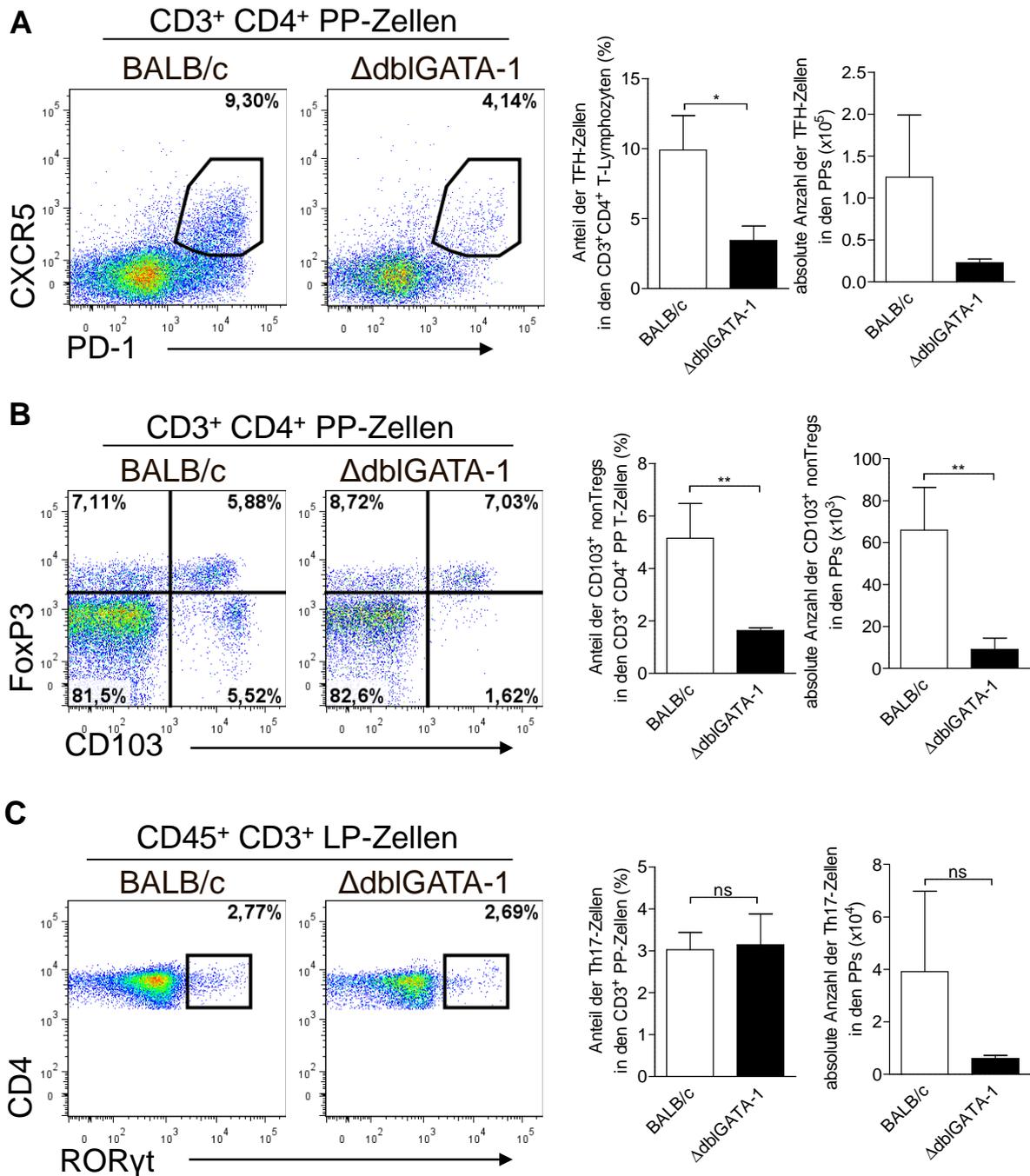


Abbildung 19: Die Population der T-Lymphozyten ist in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse verändert.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD4⁺ T-Lymphozyten wurden als lebende CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ Zellen eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CXCR5 und PD-1 (TFH-Zellen, B), FoxP3 und CD103 (Tregs und nonTregs, C) sowie ROR γ t (Th17-Zellen, D) definiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden T-Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Im Gegensatz zu den CD11c⁺ Zellen der Lamina propria wurden in den Peyer Plaques keine Unterschiede in der gesamten Population von CD11c⁺ Zellen zwischen BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen festgestellt (Abbildung 20A).

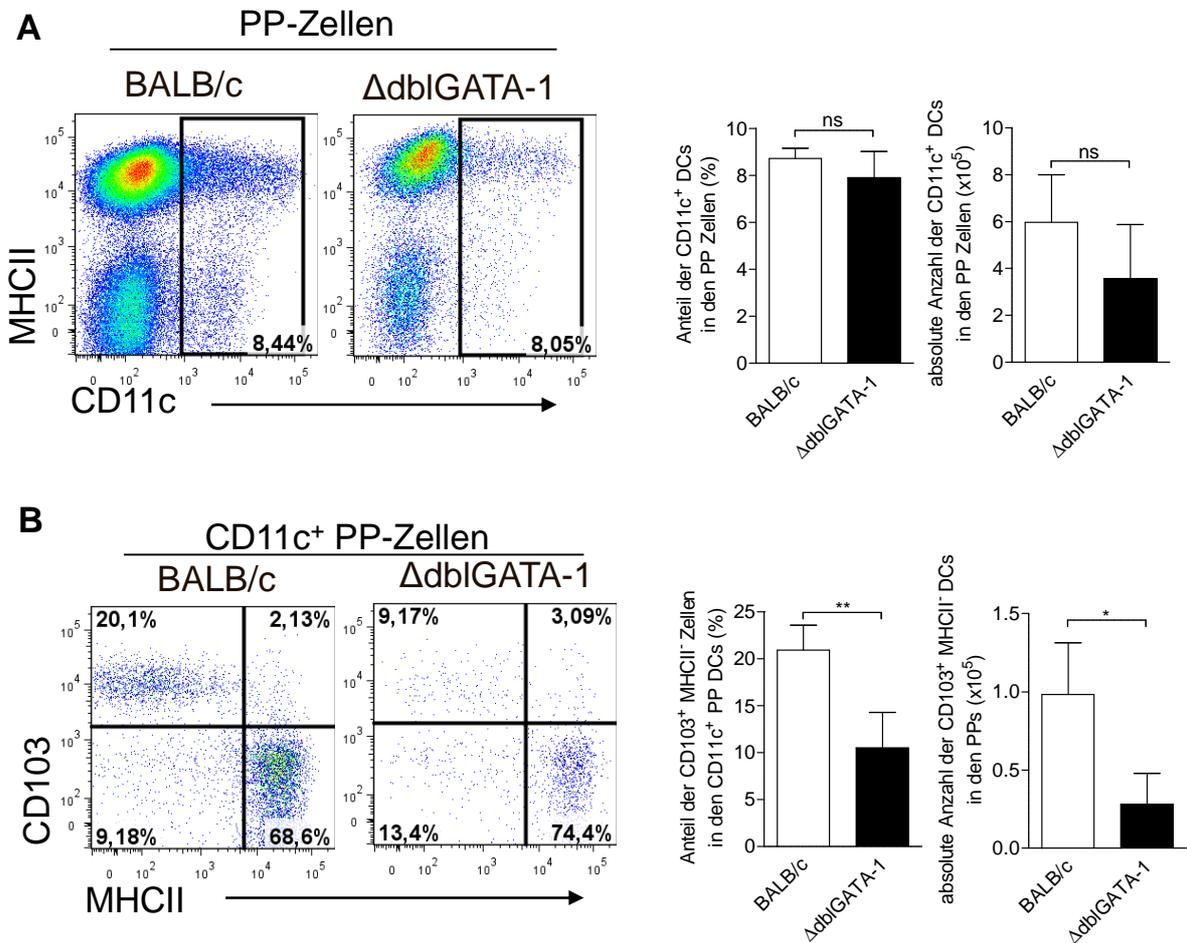


Abbildung 20: Die Populationen von CD11c⁺ Zellen sind in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere verändert.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD11c⁺ Zellen wurden als lebende CD45⁺ CD11c⁺ Zellen eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der CD11c⁺ Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD103 und MHCII definiert (B). Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Bei der Analyse der Subpopulationen von CD11c⁺ Zellen anhand ihrer CD103 und MHCII-Expression konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis zwischen den Zellsubpopulationen in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere verschoben ist. Die Population von CD103⁺ MHCII⁺ Zellen ist in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere im Vergleich zu den BALB/c Kontrollmäusen verringert (Abbildung 20B), während der prozentuale Anteil der MHCII⁺ CD103⁻ Subpopulation erhöht ist.

3.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurden zahlreiche Veränderungen in den Immunkompartimenten des Dünndarmes festgestellt. Zum einen sind mehrere zelluläre Komponenten in der Lamina propria der eosinophil-defizienten Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den BALB/c Kontrolltieren verändert. Die Populationen der IgA⁺ Plasmazellen (Abbildung 10A), CD103⁺ nonTreg- (Abbildung 11B) und der ROR γ t⁺ Th17-Lymphozyten (Abbildung 11C) sowie von CD103⁺ MHCII- Zellen (Abbildung 12C) sind in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse im Vergleich zu den BALB/c Kontrolltieren reduziert. Zusätzlich wurden phänotypische Veränderungen an den IgA⁺ Plasmazellen festgestellt, welche in der Lamina propria der eosinophil-defizienten Tiere eine höhere Expression von B220 und MHCII aufweisen (Abbildung 10B) und gleichzeitig kleinere Mengen von IgA zu sekretieren scheinen (Abbildung 10C). Auch die Population von TCR β ⁺ CD8 α β ⁺ IELs war in den untersuchten Δ dblGATA-1 Tieren gegenüber den Wildtypkontrolltieren verringert (Abbildung 13A und B).

Zum anderen wurde bei der Analyse von Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse festgestellt, dass die Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere deutlich kleiner sind (Abbildung 14A), besitzen aber dabei eine regulär ausgebildete Follikelstruktur (Abbildung 14B). Außerdem wurde festgestellt, dass der reguläre Klassenwechsel zu IgA in den Keimzentrums-B-Zellen beeinträchtigt ist (Abbildung 17A und B). Zusätzlich ist in den eosinophil-defizienten Tieren der Anteil der proliferierenden IgA⁺ Keimzentrums-B-Zellen niedriger (Abbildung 18A). Außerdem wurde gezeigt, dass die Populationen von CDXCR5⁺ PD-1⁺ TFH-Zellen (Abbildung 19A), CD103⁺ nonTregs (Abbildung 19B) sowie von den CD103⁺ MHCII⁺ Zellen (Abbildung 20B) in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren reduziert sind.

3. Ergebnisse

3.2 Die Entwicklung der Peyer-Plaques in den eosinophil-defizienten Mäusen

Um die verringerte Größe der Peyer Plaques in den eosinophil-defizienten Tieren zu untersuchen wurden in den folgenden Experimenten die PP-Entwicklung sowie dafür wichtige Zellpopulationen von LT_i- und LT_o-Zellen analysiert.

3.2.1 Entwicklung der Peyer Plaques in der Ontogenese

Da die eosinophilen Granulozyten den Dünndarm bereits während der pränatalen Entwicklung besiedeln¹³⁹ und den entsprechenden Einfluss auf die Formation von Peyer Plaques ausüben könnten, sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ab welchem Zeitpunkt die Differenzierung der PP-Größe zwischen BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen sichtbar wird.

Dazu wurde die Größe der Peyer Plaques in den BALB/c und Δ dblGATA-1 Jungtieren im Alter von drei, vier, fünf und sechs Wochen bestimmt. In der Abbildung 21 sind die ermittelten Größen der Peyer Plaques beider Mausstämme in Abhängigkeit von dem Tieralter zusammenfassend dargestellt. Bei den drei Wochen alten Tieren konnten keine Unterschiede in der PP-Größe zwischen den eosinophil-defizienten Δ dblGATA-1 und den BALB/c Mäusen festgestellt werden (Abbildung 21). Ab dem Alter von vier Wochen fangen die Peyer Plaques der Wildtypiere an zu wachsen, während die durchschnittliche PP-Größe von Δ dblGATA-1 konstant bleibt. Ab dem Alter von fünf Wochen sind die Unterschiede in der PP-Größe beider Mausstämme deutlich ausgeprägt (Abbildung 21).

3. Ergebnisse

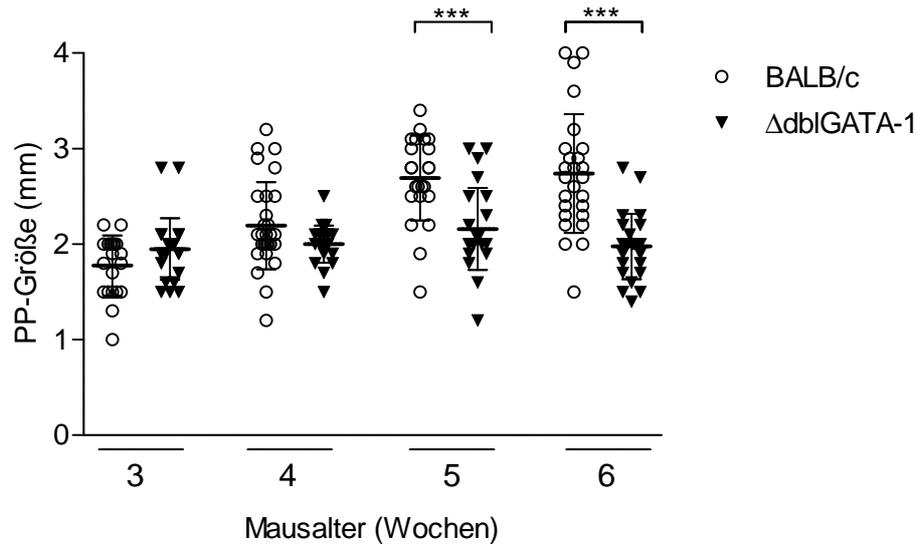


Abbildung 21: Deutliche Differenzen in der PP-Größe zwischen den BALB/c und den Δ dblGATA-1 Mäusen sind erst ab dem Alter von fünf Wochen sichtbar.

Die Größe der PPs der BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse eines bestimmten Alters wurde bestimmt. Gezeigt sind die Daten von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3.2.2 Untersuchung der Lymphozyten-Einwanderung in die Peyer Plaques

Es ist beschrieben, dass die Einwanderung von B- und T-Lymphozyten in die Peyer Plaques durch bestimmte Chemokine gesteuert wird^{57, 59, 118}. Um die Frage zu beantworten, ob die Verringerung der PP-Größe durch eine beeinträchtigte Einwanderung der Lymphozyten in die Peyer Plaques zustande kommt sollte zunächst die Expression von Chemokinen CXCL13, CCL19, CCL21 und CCL25 in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den BALB/c Kontrolltieren bestimmt werden. Dazu wurde die RNA aus dem kompletten homogenisierten Peyer Plaques-Gewebe extrahiert. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression der oben erwähnten Chemokine in den Peyer Plaques beider Mausstämme bestimmt.

In der Abbildung 22A ist die zur β -Aktin relative Expression von CXCL13, CCL19, CCL21 und CCL25 Chemokinen gezeigt. Die relative Expression von diesen Chemokinen in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse unterscheidet sich nicht von den Expressionswerten der BALB/c Tiere.

3. Ergebnisse

Eine weitere mögliche Ursache der verringerten Größe der Peyer Plaques in den eosinophil-defizienten Mäuse könnte eine beeinträchtigte Adhäsion der Lymphozyten an die Blutgefäßwände, welche der Extravasation der Lymphozyten vorangeht. Die Adhäsion der Lymphozyten wird im Wesentlichen durch die Expression von zwei Adhäsionsmoleküle an den Endothelzellen ermöglicht: E-Cadherin und MadCAM-1. Die Expression von diesen Adhäsionsmolekülen in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse und der BALB/c Kontrolltiere wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Ähnlich zu der Expression der Chemokine sind keine Unterschiede in der Expression von E-Cadherin und MadCAM-1 in den Peyer Plaques beider Mausstämme zu erkennen.

Um die Frage zu beantworten, ob die reguläre Formation der hochendothelialen Venole (HEV), durch welche die Lymphozyten in die Peyer Plaques einwandern, in den eosinophil-defizienten Mäusen gestört ist, wurden die Gewebeschnitte von Peyer-Plaques der BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse mit einem MadCAM-1 spezifischen Antikörper gefärbt und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In der Abbildung 22C sind die gefärbten Gewebeschnitte der Peyer Plaques dargestellt. Die HEV-Ausbildung in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere schien im Vergleich zu den BALB/c Mäusen keine Auffälligkeiten aufzuweisen.

3. Ergebnisse

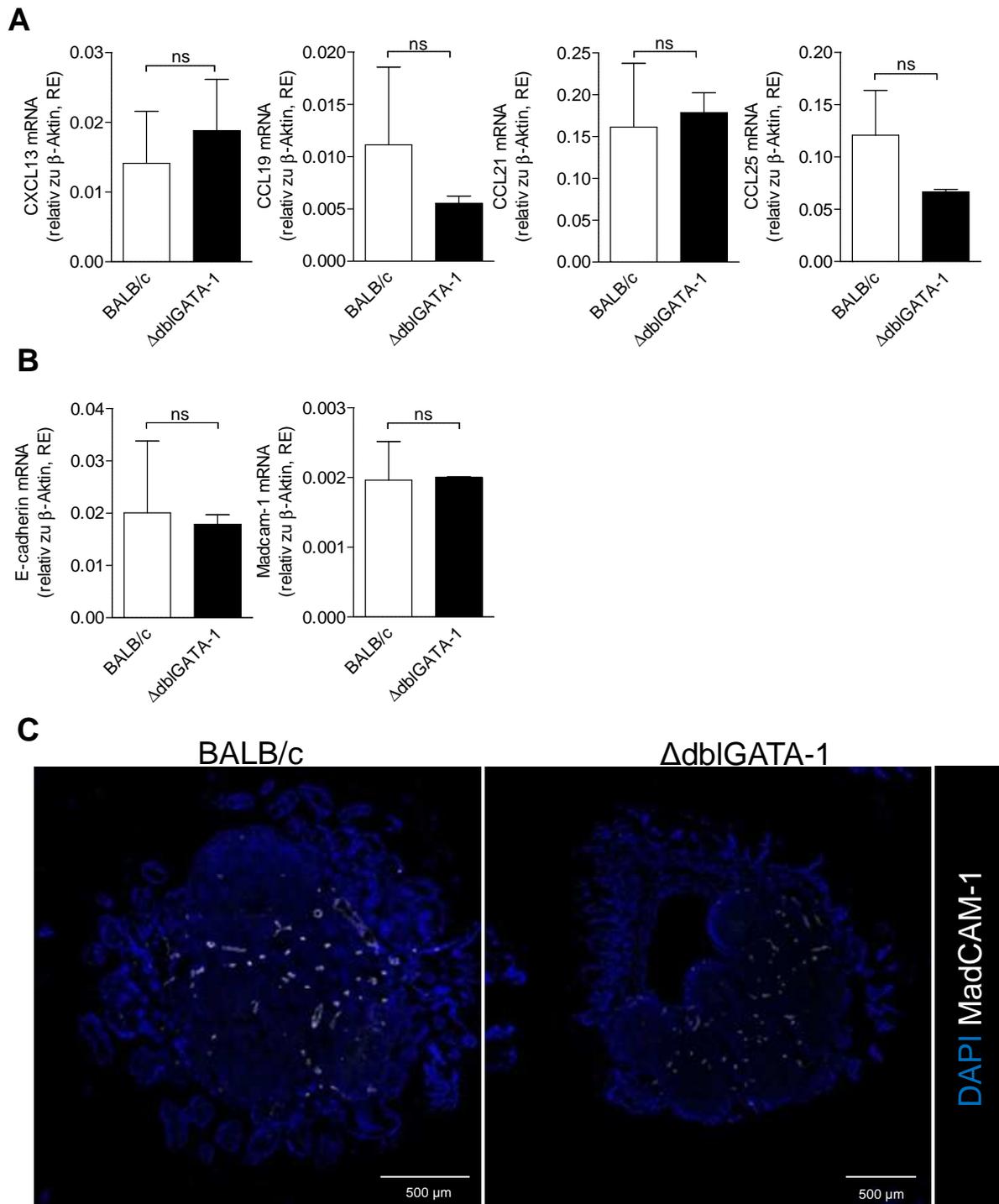


Abbildung 22: Die Einwanderung von Lymphozyten in die Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse ist unbeeinträchtigt.

A und B: Die Expression der Chemokine und der Adhäsionsmoleküle im gesamten PP-Gewebe der Δ dblGATA-1 und BALB/c Mäuse wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit 3 Mäusen pro Gruppe.

C: Die Gewebeschnitte der Peyer-Plaques der BALB/c (oben) und Δ dblGATA-1 (unten) Tiere wurden mit einem MadCAM-1 spezifischen Antikörper (grau) gefärbt und mittels Konfokal-Mikroskopie analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Abbildung pro Mausstamm. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines 20x Objektivs durch die Verwendung einer Tile-Scan-Funktion an einem Konfokal-Mikroskop.

3. Ergebnisse

3.2.3 Analyse der LTi-Zellpopulation in den Peyer Plaques

Die $CD3^- ROR\gamma t^+ CD4^+$ LTi-Zellen sind kritisch für die Ausbildung von den PP-Anlagen³¹. Die Frage, ob diese Zellpopulation in den Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere beeinträchtigt ist, sollte durch die durchflusszytometrische Analyse von $CD3^- ROR\gamma t^+ ILC3$ -Zellen und ihrer $CD4^+ c-Kit^+$ Subpopulation der LTi-Zellen beantwortet werden.

Die Untersuchung der ILC3-Zellpopulation in den Peyer Plaques der BALB/c und $\Delta dbpGATA-1$ Tiere ergab, dass der prozentuale Anteil dieser Zellen in den Peyer Plaques der $\Delta dbpGATA-1$ Tiere gegenüber den Wildtypkontrollmäusen erhöht ist (Abbildung 23A). Der Vergleich der absoluten Anzahl der $CD3^- ROR\gamma t^+ ILC3$ zeigte, dass diese Zellpopulation in den Peyer Plaques der $\Delta dbpGATA-1$ Mäuse unverändert ist (Abbildung 23A).

Ebenfalls die $CD4^+ c-Kit^+$ Subpopulation der ILC3-Zellen, die LTi-Zellen, ist in den Peyer Plaques der $\Delta dbpGATA-1$ Mäuse in Vergleich zu den BALB/c Tieren unverändert (Abbildung 23B).

Um das Phänotyp der LTi-Zellen in den Peyer Plaques von BALB/c und $\Delta dbpGATA-1$ Mäusen in der Hinsicht ihres Reifungsstadiums zu vergleichen, wurden die Expressionen von einigen LTi-wichtigen Markern mittels der MFI-Berechnung bestimmt. Demnach unterscheiden sich die LTi-Zellen in den Peyer Plaques beider Mausstämmen in ihrer Expressionshöhe von IL-7R α , Arg-1, c-Kit und ROR γt nicht (Abbildung 23C).

3. Ergebnisse

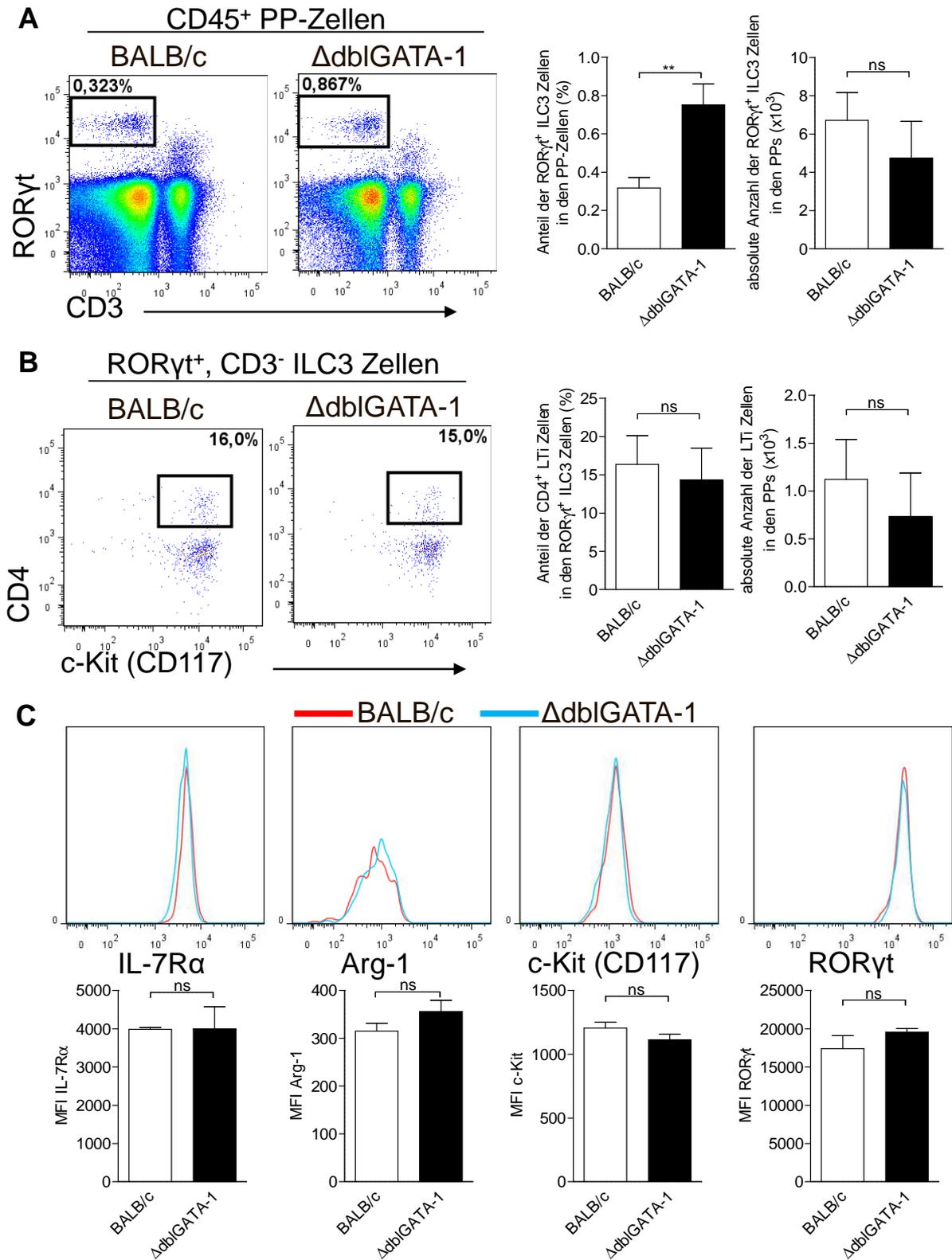


Abbildung 23: Die Population von CD3⁻ RORγt⁺ CD4⁺ LTI-Zellen ist in den Peyer Plaques der ΔdblGATA-1 Mäuse unverändert.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die ILC3 Zellen wurden als lebende CD45⁺ CD3⁻ RORγt⁺ Zellen eingegrenzt (A). Die Subpopulation der RORγt⁺ ILC3-Zellen wurde anhand ihrer Expression von CD4 und c-Kit definiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von einem von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Zellpopulationen sind für

3. Ergebnisse

eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind mittels Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die Expression von IL-7R α , Arg-1, c-Kit und ROR γ t durch die LTi-Zellen der BALB/c (rot) und der Δ dblGATA-1 Tiere (blau) wurde durch die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels der FlowJo7.6.5 Software bestimmt. Die repräsentativen Graphen pro Mausstamm (unten) sowie die zusammenfassende Auswertung (oben) sind gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3.2.4 Analyse der LTo-Zellpopulation in den Peyer Plaques

Neben den LTi-Zellen sind die LTo-Stromazellen für die Entwicklung der Peyer Plaques von Bedeutung³⁰. Um diese Zellpopulation aus den Peyer Plaques isolieren und untersuchen zu können, sollte das Gewebe nach dem gleichen Protokoll wie die Lamina propria verarbeitet werden (siehe Kapitel 2.2.2.2). Dazu wurden die Peyer Plaques mit einem Skalpell klein geschnitten und anschließend mit dem Proteasen-Cocktail verdaut. Die erhaltene Zellpopulation wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Analyse der CD45⁻ Pecam-1⁻ Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Zellpopulation in den Peyer Plaques wurde an den BALB/c und Δ dblGATA-1 Tieren im Alter von drei (Abbildung 24A) und sechs Wochen (Abbildung 24B) durchgeführt. In dem Alter von drei Wochen wurden keine Unterschiede in der PP-Größe zwischen den beiden Mausstämmen festgestellt (Abbildung 21). In Übereinstimmung damit wurden keine Differenzen in der Populationsgröße der LTo-Zellen zwischen den BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen in diesem Alter festgestellt werden (Abbildung 24A). Im Gegensatz dazu konnten bei den Tieren in dem Alter von sechs Wochen mit dem ausgeprägten Unterschied in der PP-Größe (siehe Abbildung 21) eine Veränderung in der LTo-Zellepopulation in den Peyer Plaques festgestellt werden. Während die CD45⁻ Pecam-1⁻ Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Zellpopulation in den Peyer Plaques der BALB/c Tiere größer wird, erfährt die entsprechende Zellpopulation in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere keine Veränderungen gegenüber den drei Wochen alten Mäusen (Abbildung 24B).

3. Ergebnisse

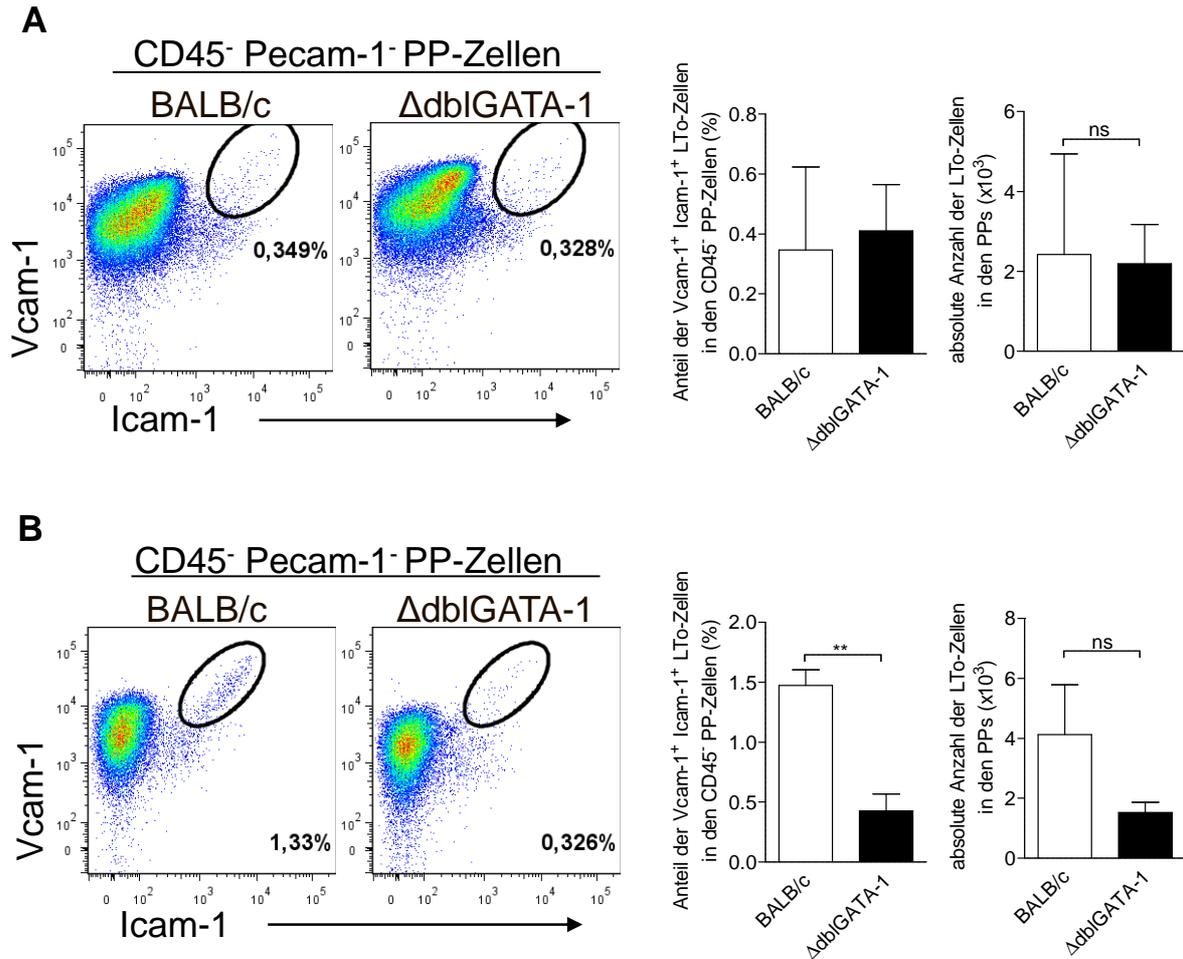


Abbildung 24: Die Population der LTo-Stromazellen ist in den Peyer Plaques der sechs Wochen alten Δ dblGATA-1 Tiere verringert.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD45⁻ Pecam-1⁻ Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Stromazellen wurden in den nicht vergesellschafteten drei Wochen alten (A) und sechs Wochen alten (B) BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen untersucht. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der LTo-Stromazellpopulation sind angegeben für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie der absoluten Anzahl LTo-Stromazellen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

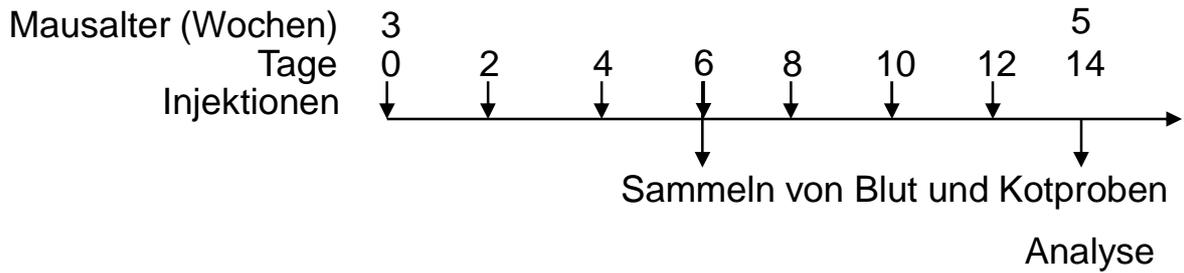
3.2.5 Einfluss der Depletion der eosinophilen Granulozyten auf die Immunkomponenten des Dünndarmes

Um den Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die Entwicklung des Darmimmunsystems zu analysieren, wurden 3 Wochen alte BALB/c Mäuse für 2 Wochen mit einem Siglec-F spezifischen Antikörper behandelt. Tiere einer Kontrollgruppe wurden mit der gleichen Menge eines Kontrollantikörpers (Ratte IgG2a) behandelt. Da anti-Siglec-F Antikörper Apoptose in eosinophilen Granulozyten auslösen, können so eosinophile Granulozyten spezifisch eliminiert werden. Somit kann direkt gezeigt werden, ob in dieser kritischen Phase der Entwicklung eosinophile Granulozyten eine Rolle für den Aufbau der Immunstrukturen im Darm zukommt. Abbildung 35A zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

Die Effizienz der Eosinophil-Eliminierung wurde anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung der eosinophilen Granulozyten im Blut überprüft (Abbildung 25B). Es zeigte sich, dass bereits nach drei Injektionen (Tag 6) keine eosinophile Granulozyten im Blut der behandelten BSALB/c Mäuse nachzuweisen sind (Abbildung 25B). In der Lamina propria, die nach 14 tägiger Behandlung untersucht wurde, konnte nur eine Reduzierung der eosinophilen Granulozyten aber keine vollständige Depletion beobachtet werden. Die restlichen Eosinophilen zeigten eine deutlich niedrigere Expression von Siglec F. Es wurde bisher nicht gezeigt, ob es sich dabei um unreife oder vielleicht nicht-aktivierte Eosinophilen handelt, die so wenig Siglec-F Expression exprimieren, dass keine Apoptose induziert wurde.

3. Ergebnisse

A



B

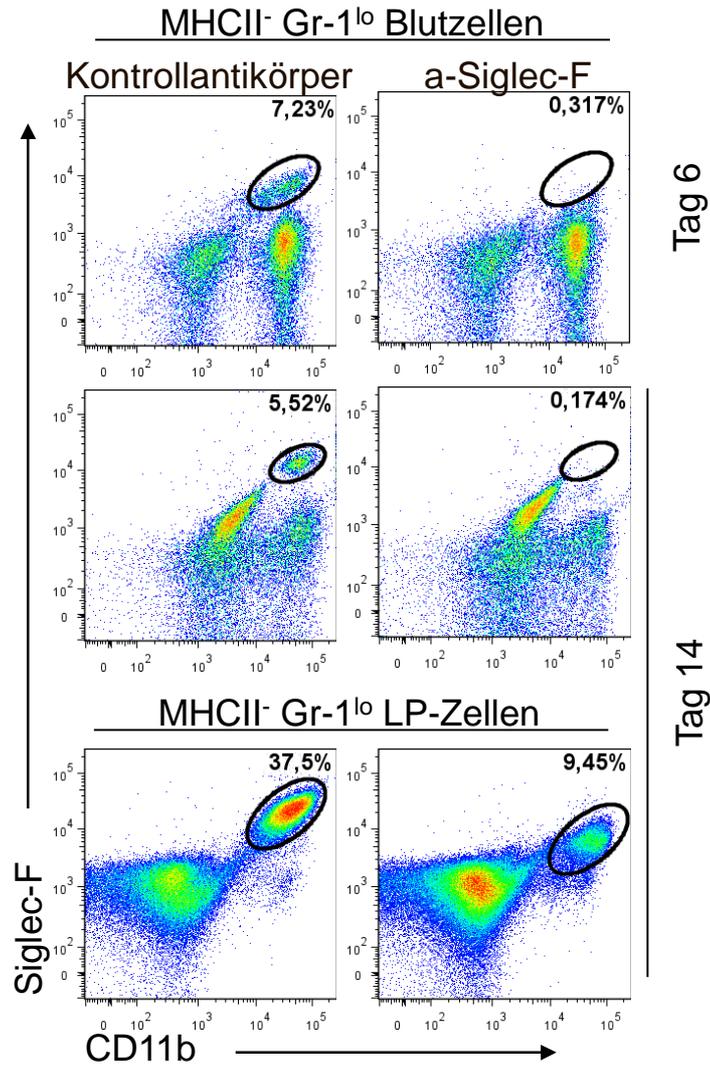


Abbildung 25: Eosinophil-Depletion im Blut und im Gewebe der LP

Drei Wochen alte BALB/c Mäuse wurden mit je 20 µg anti-Siglec-F (Depletionsgruppe, links) bzw. Ratten IgG2a Kontrollantikörper (rechts) jeden zweiten Tag i.v. behandelt. An den Tagen 6 und 14 wurden die Tiere geblutet (A), am Tag 14 der Prozentsatz der eosinophilen Granulozyten in der LP durchflusszytometrisch bestimmt (B). Eosinophilen wurden als MHCII⁻ Gr-1^{lo} Siglec-F⁺ CD11b⁺ Zellen eingegrenzt. Der Prozentsatz der Eosinophilen ist angegeben. Repräsentative Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe sind gezeigt.

3. Ergebnisse

3.2.5.1 Die Depletion der eosinophilen Granulozyten bewirkt keinen messbaren Effekt an dem Gewicht der Peyer Plaques

Aufgrund dessen, dass die Abweichung in der Größe der Peyer Plaques zwischen den Wildtyp BALB/c und den eosinophil-defizienten Δ dblGATA-1 Mäusen ab dem Alter von ungefähr vier Wochen stattfindet, wurde die Eosinophil-Depletion bei den BALB/c Tieren ab dem Alter von drei Wochen durchgeführt. Das Gewicht der Peyer Plaques wurde zwei Wochen später durch das Einwiegen bestimmt. Parallel wurde das PP-Gewicht von den unbehandelten nicht vergesellschafteten BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen des gleichen Alters gemessen.

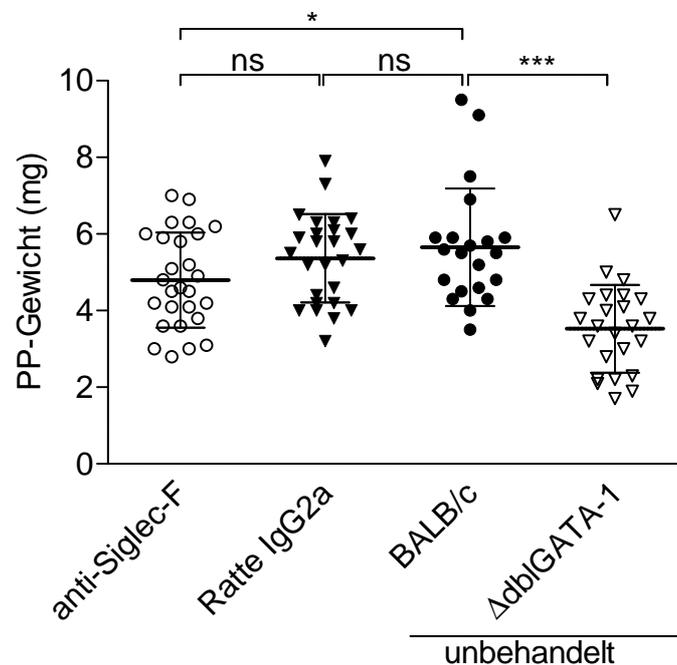


Abbildung 26: Die Veränderung des PP-Gewichtes der BALB/c Mäuse durch die Depletion der Eosinophilen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht messbar.

Die drei Wochen alten BALB/c Tiere wurden zwei Wochen lang wie in der Abbildung 16A gezeigt mit dem anti-Siglec-F bzw. Kontrollantikörper behandelt. Das Gewicht der PPs wurde nach zwei Wochen mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt. Gezeigt sind die vorläufigen Ergebnisse eines Einzelexperimentes mit 4 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Die Bestimmung des PP-Gewichtes in den anti-Siglec-F behandelten BALB/c Mäusen zeigte keine signifikante Veränderung gegenüber den Werten der Kontrollgruppe (behandelt mit Ratte IgG2a) (Abbildung 26). Der Vergleich der Daten von eosinophil-eliminierten BALB/c

3. Ergebnisse

Mäuse mit den Werten von unbehandelten BALB/c Tieren des gleichen Alters ergab die Differenz zwischen diesen zwei Tiergruppen (Abbildung 26), während kein Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit Ratte IgG2a behandelten BALB/c Mäusen festgestellt wurde (Abbildung 26).

3.2.5.2 Die Depletion der eosinophilen Granulozyten in den BALB/c Mäusen führt zu den Veränderungen der IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria

Die Untersuchung der Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer Plaques der BALB/c Mäuse nach der Eosinophil-Depletion zeigte keine Veränderungen im Klassenwechsel im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 27).

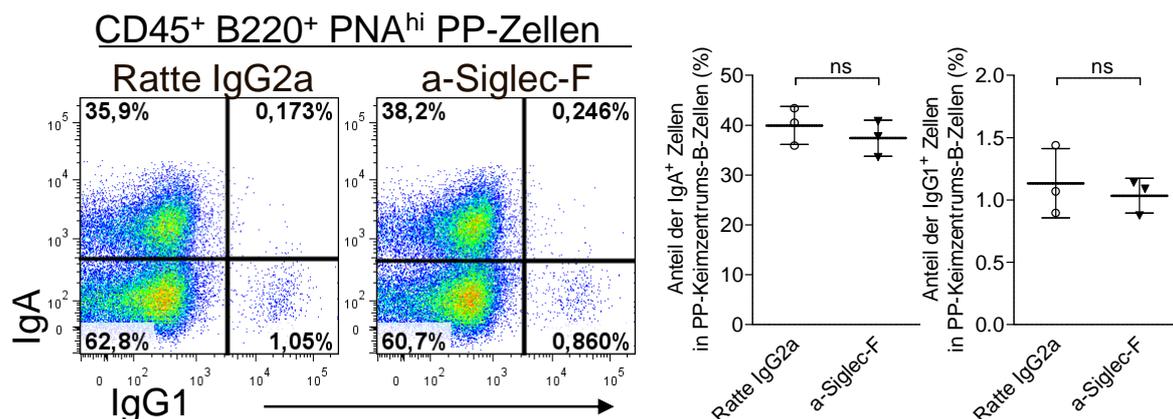


Abbildung 27: Die Eosinophil-Depletion bewirkt keine Veränderungen im Klassenwechsel der Keimzentrums-B-Zellen.

Die drei Wochen alten BALB/c Tiere wurden zwei Wochen lang wie in der Abbildung 16A gezeigt mit dem anti-Siglec-F bzw. Kontrollantikörper behandelt. Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD45⁺ B220⁺ PNA^{hi} Keimzentrums-B-Zellen wurden anhand ihrer Immunoglobulinklasse als IgA⁺ bzw. IgG1⁺ Keimzentrums-B-Zellen eingegrenzt. Gezeigt sind die vorläufigen Ergebnisse eines Einzelexperimentes mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Keimzentrums-B-Zellpopulationen sind für jeweils eine repräsentative Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil der entsprechenden B-Zellpopulationen sind in Punktdiagrammen gezeigt (rechts). Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Die durchflusszytometrische Analyse der IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria nach der Eosinophil-Eliminierung ergab, dass der prozentuale Anteil dieser Zellpopulation in den eosinophil-depletierten BALB/c Mäusen sich nicht von den Tieren der Kontrollgruppe unterscheidet (Abbildung 28A). Dennoch wurde eine Tendenz zur Reduktion der absoluten

3. Ergebnisse

Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria der anti-Siglec-F behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt (Abbildung 28A).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression von B220 und MHCII durch die IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria nach der anti-Siglec-F-Behandlung sichtbar erhöht wird (Abbildung 28B).

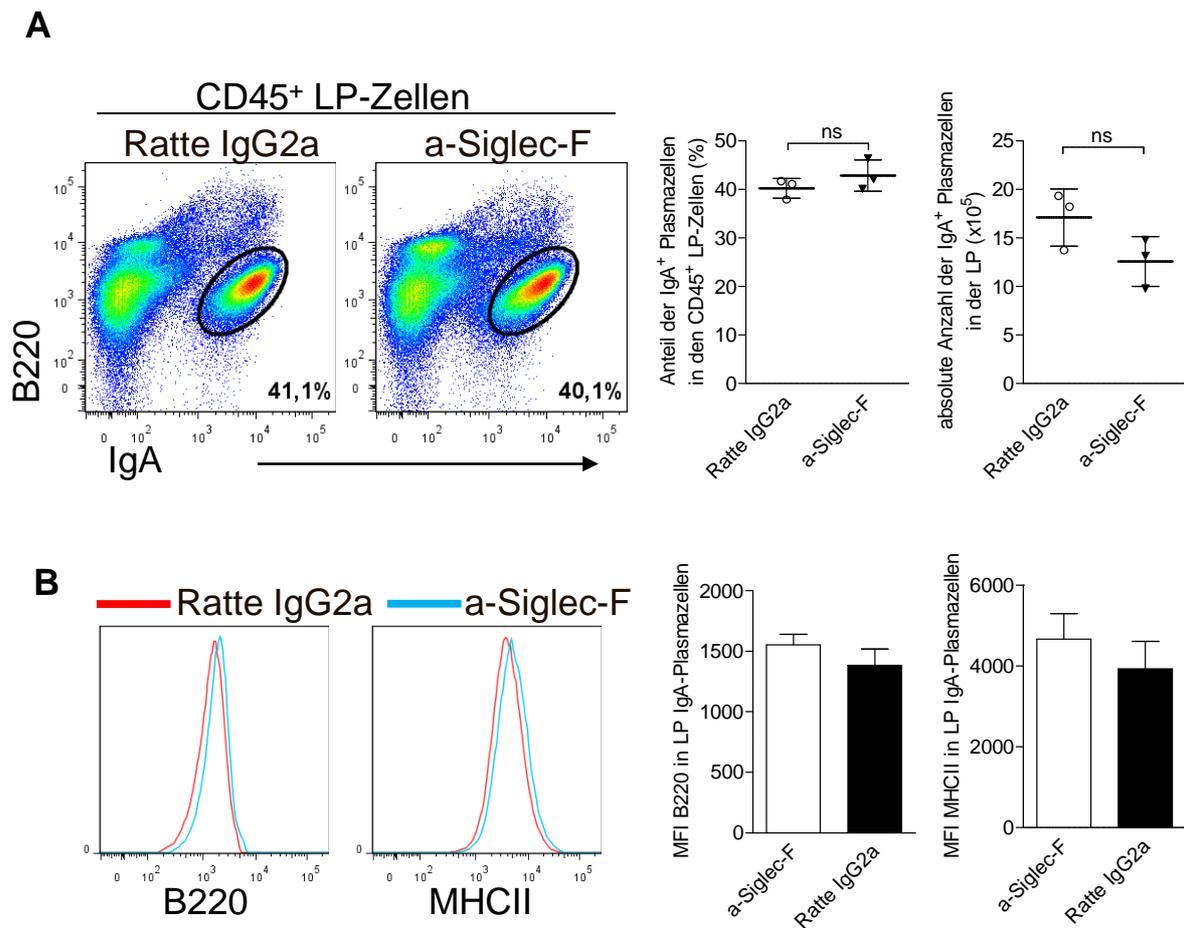


Abbildung 28: Die Depletion der eosinophilen Granulozyten über zwei Wochen zeichnet die Veränderungen an den IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria ab.

3 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden für zwei Wochen (siehe Abbildung 29A) mit anti-Siglec-F bzw. Kontrollantikörper behandelt. Die Lamina propria Zellen wurden aus dem Dünndarm der Tiere präpariert und durchflusszytometrisch analysiert.

A: Gezeigt sind FACS-Plot Ergebnisse für lebende CD45⁺ B220⁺ IgA⁺ Plasmazellen. Der Prozentsatz der IgA⁺ Plasmazellen in der LP ist für eine repräsentative Maus aus jeder Gruppe angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts).

B: Die Expression von B220 und MHCII auf LP Plasmazellen von Siglec-F behandelten (rot) bzw. Kontrolltieren (blau) wurde durch die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels der FlowJo7.6.5 Software bestimmt. Die repräsentativen Graphen einzelner Tiere (links) sowie die zusammenfassende Auswertung (rechts) sind gezeigt. Die Daten zeigen Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe.

3. Ergebnisse

An den Tagen 6 und 14 nach dem Start der Eosinophil-Depletion wurden Blut- sowie Kotproben (am Tag 14) eingesammelt (Abbildung 25A). Die Bestimmung des IgA-Gehaltes in den eingesammelten Proben mittels ELISA-Assay zeigte, dass der Gehalt des löslichen IgA im Blutserum sich bereits sechs Tage nach dem Start der Eosinophil-Depletion senkte (Abbildung 29A). Die Reduzierung des IgA-Gehaltes im Blutserum wurde ebenfalls nach zwei Wochen der anti-Siglec-F-Behandlung festgestellt (Abbildung 29A). Ein ähnlicher Effekt wurde in den Mauskotproben beobachtet. Die Depletion der Eosinophilen für zwei Wochen führte zu einer Reduktion des löslichen IgA in den Fäzes der behandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 29B).

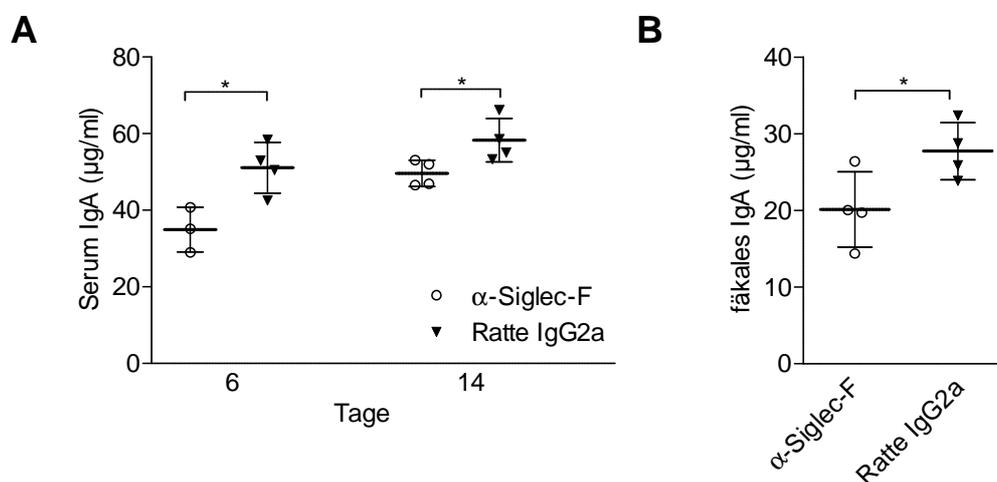


Abbildung 29: Depletion der Eosinophilen verlangsamt den Aufbau des IgA-Titers in Serum und Fäzes.

3 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden für zwei Wochen (siehe Abbildung 29A) mit anti-Siglec-F bzw. Kontrollantikörper behandelt. Der IgA-Titer wurde mittels ELISA bestimmt und die absolute Menge im Blutserum (A) und in den Fäzes (B, Tag 14) der analysierten Tiere ist gezeigt. Gezeigt sind Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

In den Abbildungen 27 - 29 sind die vorläufigen Daten eines Einzelexperimentes gezeigt. Dennoch können diese Daten unter Vorsicht ausgewertet werden.

Die Eliminierung der eosinophilen Granulozyten mittels anti-Siglec-F Antikörpers führt zu den Veränderungen in der Population der IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria. Die mit dem anti-Siglec-F Antikörper behandelten Mäuse wiesen eine Tendenz zur Reduktion der absoluten Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen auf. Zusätzlich exprimierten die IgA⁺ Plasmazellen nach einer zwei Wochen langen Eliminierung der Eosinophilen mehr B220 und MHCII

3. Ergebnisse

Moleküle an ihrer Oberfläche. Außerdem verfügten die Mäuse, bei denen die Eosinophilen depletiert wurden über weniger IgA sowohl im Blutserum, als auch in den Fäzes gegenüber den Tieren aus der Kontrollgruppe.

3.2.6 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass die Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Δ dblGATA-1 Mäuse sich bis zum Alter von drei Wochen absolut normal entwickeln, was ihre Größe betrifft (Abbildung 21). Erst ab dem Alter von fünf Wochen konnten deutliche Unterschiede in der PP-Größe zwischen den BALB/c und Δ dblGATA-1 Tieren festgestellt werden (Abbildung 21).

Die Bestimmung der Expression der Chemokine und Adhäsionsmoleküle sowie die Untersuchung der HEV-Ausbildung ergaben keine Unterschiede zwischen den untersuchten Mausstämmen (Abbildung 22).

Ebenfalls schien die Population von LT_i-Zellen in den Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Mäuse gegenüber dem Wildtyp unverändert zu sein (Abbildung 23). Allerdings ergab die Analyse der LT_o-Zellen, dass diese Zellpopulation in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den Kontrolltieren verringert ist (Abbildung 24).

Die Veränderungen in den Darmmimmunkompartimenten nach der Eosinophil-Depletion in den drei Wochen alten BALB/c Tieren können als Tendenzen aufgefasst werden. Eine tendenzielle Verringerung der absoluten Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria der eosinophil-depletierten Tiere (Abbildung 28A) sowie tendenziell erhöhte Expression von B220 und MHCII an diesen Zellen (Abbildung 28B) wurden beobachtet. Zusätzlich wiesen die Peyer Plaques der mit anti-Siglec-F behandelten Mäuse eine Tendenz zum verringerten PP-Gewicht im Vergleich zu der Gruppe der Kontrolltiere (Abbildung 26).

3. Ergebnisse

3.3 Der Einfluss der Mikroflora auf die Immunkompartimente des Dünndarmes

In den darauffolgenden Experimenten sollte die Mikroflora der Wildtyp BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse analysiert und verglichen werden. Zusätzlich sollte der Einfluss der Darmflora auf die Immunkomponenten des Dünndarmes untersucht werden.

3.3.1 Die BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse besitzen unterschiedliche Mikroflora

Zunächst sollte die Zusammensetzung der Darmmikroflora in den beiden Mausstämmen analysiert werden. Dazu wurden die frischen Fäzes von BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen gesammelt und die bakterielle DNA mit Hilfe des QIAamp DNA Stool Mini Kits von Qiagen extrahiert. Das Vorkommen von bestimmten Darmfloragruppen wurde mittels qRT-PCR und spezifischen 16S rDNA Primersequenzen (siehe Tabelle 13) quantifiziert.

Die Analyse der zur 16S rDNA der Eubacteria relativen Expressionswerten von untersuchten 16s rDNA Sequenzen ergab, dass die Zusammensetzung der Darmflora sich zwischen den beiden Mausstämmen unterscheidet. Die Fäzes der BALB/c Tiere, welche von Charles River Einrichtung bezogen wurden, enthalten wesentlich mehr der Bakterien aus den Gattungen Lactobacillus/Enterococcus (Lact) und SFB (*segmented filamentous bacteria*) (Abbildung 30).

3. Ergebnisse

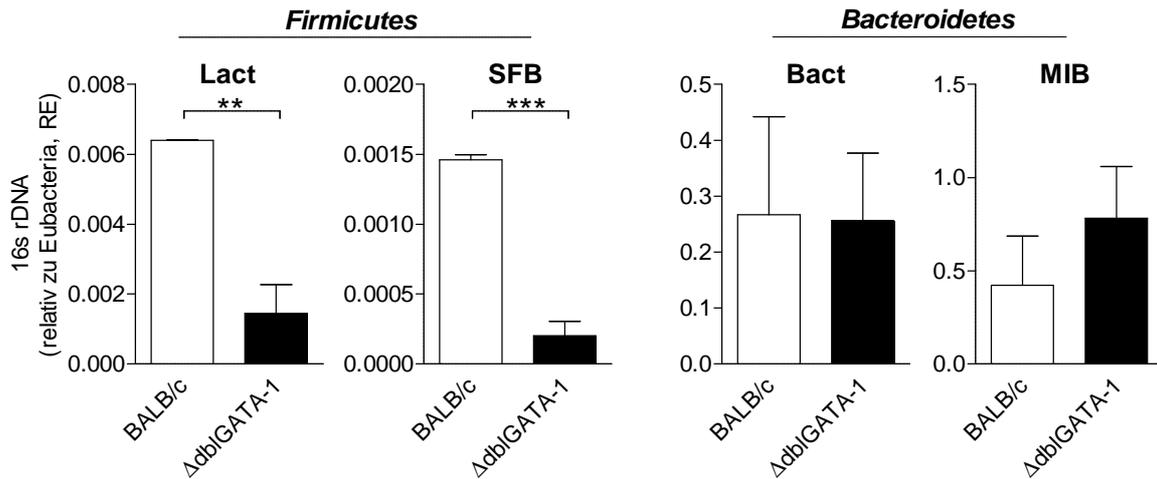


Abbildung 30: Die unterschiedliche Zusammensetzung der Mikroflora in den BALB/c und Δ dblGATA-1 Tieren.

Frische Mausfäzes wurden gesammelt und die bakterielle DNA daraus wurde mittels QIAamp DNA Stool Mini Kits von Qiagen nach den Hinweisen des Herstellers isoliert. Die Detektion der einzelnen Mikrofloraarten erfolgte mit Hilfe von qRT-PCR und wurde auf die Gesamtmenge der Eubacteria normalisiert. Gezeigt sind die Daten von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 5 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Währenddessen enthält der Kot der Δ dblGATA-1 Mäuse mehr von MIB (*mouse intestinal bacteria*) (Abbildung 30). Um den Einfluss der veränderten Mikroflora auf die zuvor beschriebene Veränderungen in den Immunkompartimenten von Dünndarm der Δ dblGATA-1 Tiere zu untersuchen, sollten die Tiere beider Stämme in einem Käfig untergebracht werden. Dieser Vorgang namens Vergesellschaftung dient dem Austausch der Darmflora zwischen den Mäusen aufgrund ihres Koprophagie-Verhaltens.

Um zu untersuchen, ob die Vergesellschaftung der Tiere die Angleichung der Darmflora zwischen den BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen bewirkt, wurden die Tiere des gleichen Alters in einem Verhältnis eins zu eins in demselben Käfig untergebracht. Nach drei Wochen Vergesellschaftung wurden die Fäzes eingesammelt und, wie oben beschrieben wurde, untersucht.

3. Ergebnisse

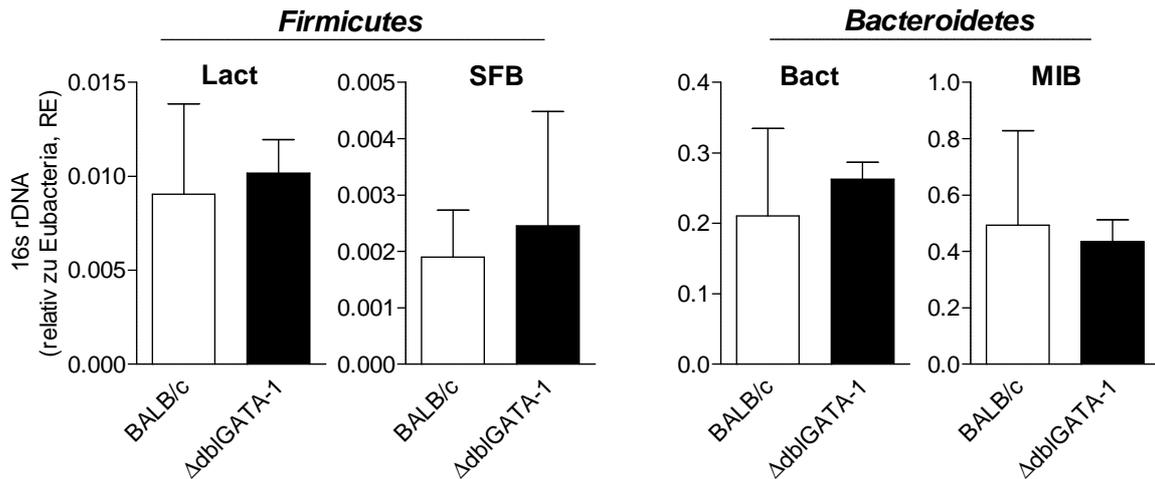


Abbildung 31: Die Vergesellschaftung der Tiere führt zur gleichen Zusammensetzung der Mikroflora von BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse.

Frische Mausfäzes wurden gesammelt und die wie unter der Abbildung 16 bereits beschrieben analysiert. Die Detektion der einzelnen Mikrofloraarten erfolgte mit Hilfe von qRT-PCR und wurde auf die Gesamtmenge der Eubacteria normalisiert. Gezeigt sind die Daten von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Die Analyse der Zusammensetzung der Darmflora ergab, dass die Vergesellschaftung der Tiere einen Ausgleich der Mikroflora zwischen den beiden Mausstämmen bewirkte (Abbildung 31). Dabei wurde festgestellt, dass die Mikroflora der Δ dblGATA-1 Tiere sich an die der Wildtypmäuse anglich, während die Darmflora der BALB/c Tiere keine Veränderungen durch den Austausch mit den Δ dblGATA-1 Mäusen aufwies (Abbildung 31).

3.3.2 Die Analyse des Einflusses der Vergesellschaftung auf die Immunkomponenten der Lamina propria

Zunächst wurde der Gehalt des löslichen IgA in den Fäzes der vergesellschafteten und der nicht vergesellschafteten BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse mittels ELISA-Assay bestimmt. Die Analyse zeigte, dass die IgA-Titer der nicht vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse weit unter den Werten der Wildtypiere (Abbildung 32A) sind. Gleichzeitig wurde eine Angleichung der IgA-Titer der BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse festgestellt, wenn die Tiere vergesellschaftet wurden (Abbildung 32A).

3. Ergebnisse

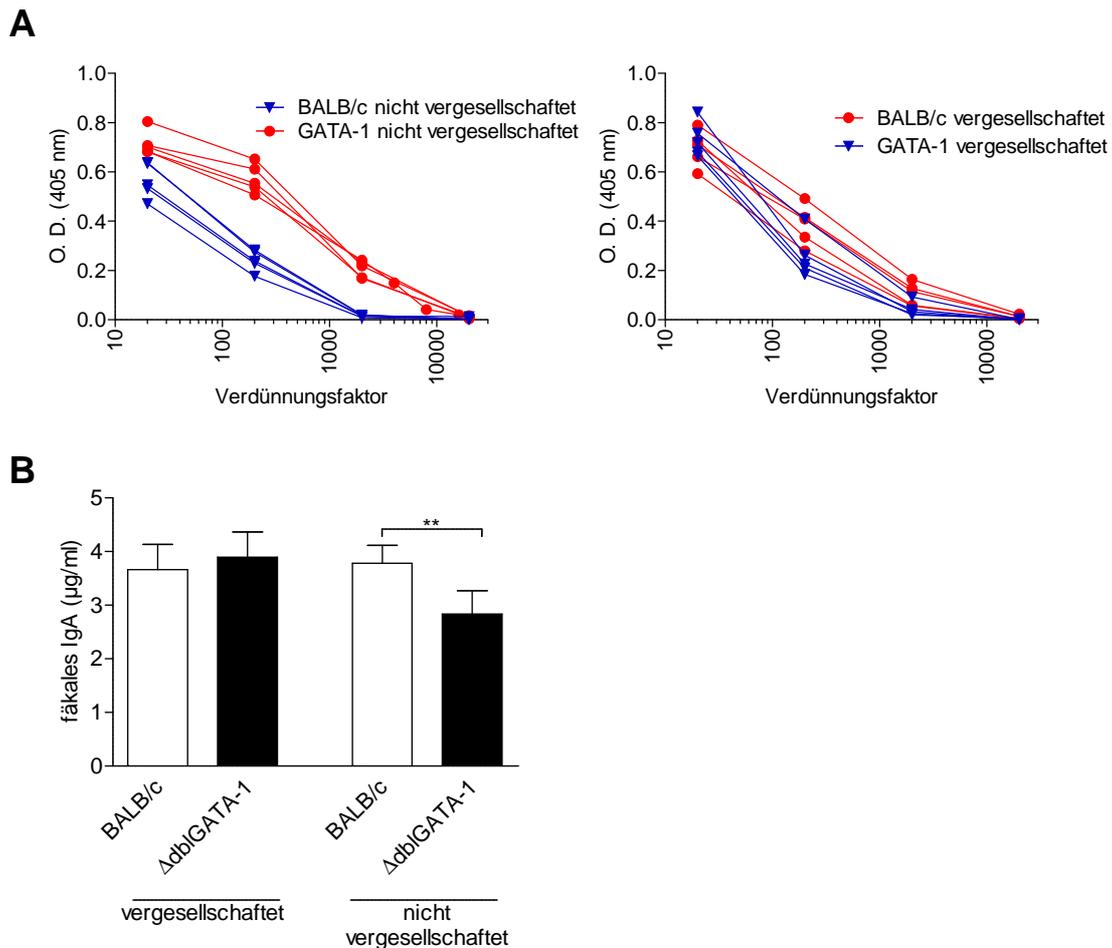


Abbildung 32: Die Vergesellschaftung der Δ dblGATA-1 Mäuse mit den BALB/c Tieren führt zur Erhöhung des löslichen IgA in Fäzes der eosinophil-defizienten Tiere.

Die BALB/c und Δ dblGATA-1 Tiere wurden einem Verhältnis 1:1 in einem Käfig für mindestens drei Wochen vergesellschaftet. Anschließend wurden ihren Fäzes eingesammelt, eingewogen und in PBS resuspendiert. Der IgA-Gehalt wurde mittels ELISA bestimmt. Die IgA-Titer (A) sowie die absoluten Mengen von IgA (B) in Fäzes der vergesellschafteten und nicht vergesellschafteten Tiere sind gezeigt. Gezeigt sind Ergebnisse von einem von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Die Berechnung der absoluten IgA-Mengen in den Fäzes ergab ebenfalls, dass der Mikrofloraustausch durch die Vergesellschaftung beider Mausstämmen zur Wiederherstellung des IgA-Spiegels in den Fäzes der Δ dblGATA-1 Mäuse führt.

Um zu untersuchen, ob der Anstieg des IgA-Titers in den Fäzes der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse mit der Veränderung der Population von IgA-produzierenden Plasmazellen in der Lamina propria korreliert, wurden die BALB/c und Δ dblGATA-1 Tiere vor der Analyse drei bis vier Wochen lang vergesellschaftet. Die Analyse ergab, dass die Populationsgröße der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse nach

3. Ergebnisse

der Vergesellschaftung vollständig wiederhergestellt wurde und sich nicht von der entsprechenden Zellpopulation der BALB/c Tiere unterschied (Abbildung 33A). Nichtsdestotrotz wiesen die IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Tiere eine höhere Expression B220- und MHCII-Molekülen auf als die IgA⁺ Plasmazellen der BALB/c Mäuse (Abbildung 33B).

Die Bestimmung der mittleren Fleckgröße pro Vertiefung mit Hilfe des ELISpot-Assay führte zur Erkenntnis, dass die IgA⁺ Plasmazellen der Δ dblGATA-1 Tiere trotz der Vergesellschaftung kleinere Mengen von dem löslichen IgA sekretieren, als es in den Wildtyptieren der Fall ist (Abbildung 33C).

3. Ergebnisse

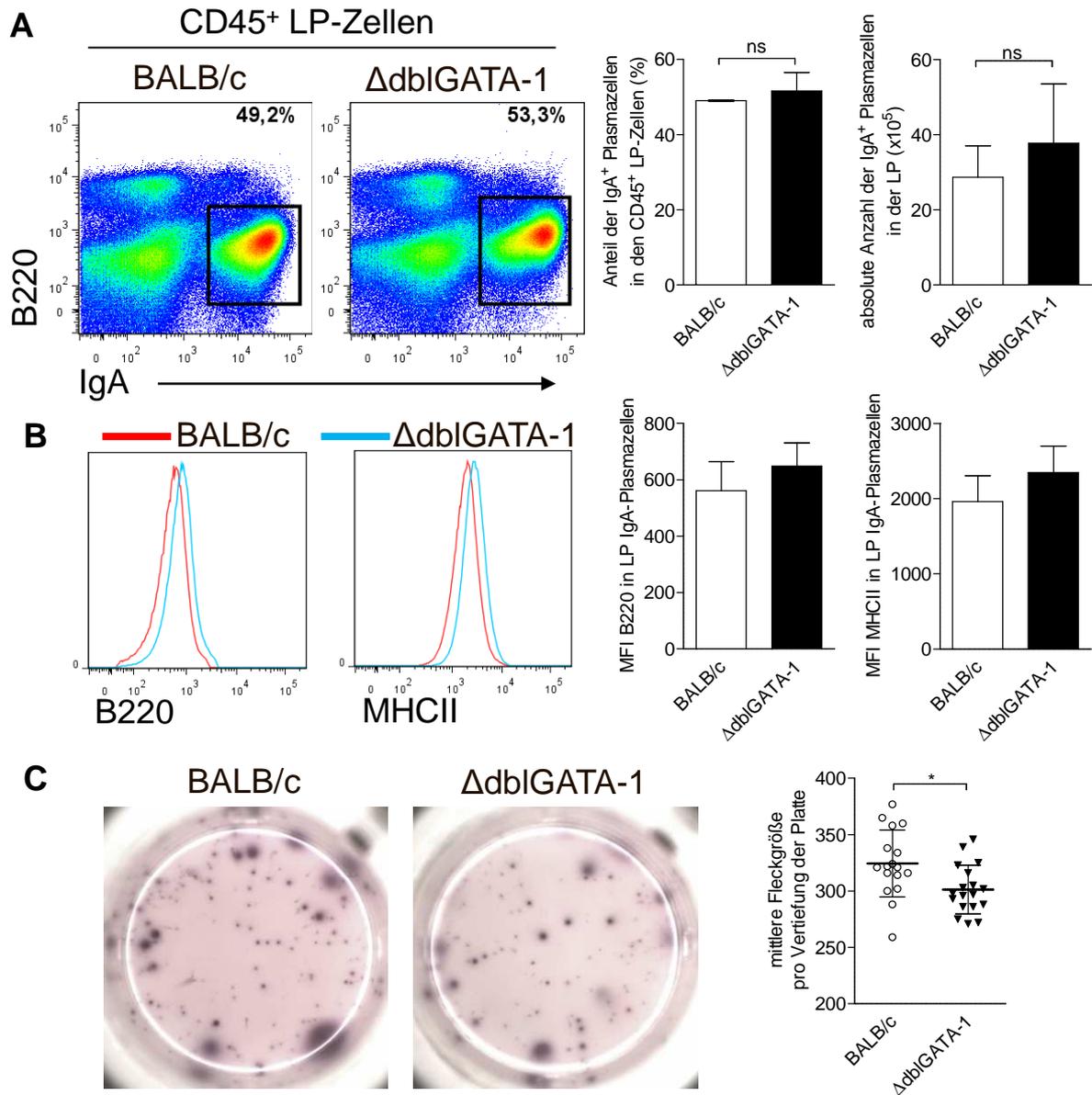


Abbildung 33: Die Vergesellschaftung stellt die Population von LP IgA⁺ Plasmazellen der Δ dblGATA-1 Mäuse wiederher.

Die BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse wurden vor der Analyse zwei Wochen lang vergesellschaftet. Die Lamina propria Zellen wurden aus dem Dünndarm der Tiere präpariert und durchflusszytometrisch (A und B) bzw. mittels ELISpot (C) analysiert.

A: Gezeigt sind FACS-Plot Ergebnisse für lebende CD45⁺ B220⁻ IgA⁺ Zellen. Der Prozentsatz der IgA⁺ Plasmazellen in der LP ist für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe.

B: Die Expression von B220, MHCII und CD19 an den LP IgA⁺ Plasmazellen der BALB/c (rot) und der Δ dblGATA-1 Tiere (blau) wurde durch die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels der FlowJo7.6.5 Software bestimmt. Die repräsentativen Graphen pro Mausstamm (links) sowie die zusammenfassende Auswertung (rechts) sind gezeigt

C: Unter Verwendung einer 96 Lochplatte wurde in einer Verdünnungsreihe die Zahl der Plasmazellen in der LP von BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen mittels ELISpot bestimmt (links). Das Auslesen der Platte und die Bestimmung der mittleren Fleckgröße pro Vertiefung (rechts) erfolgte am EliSpot Reader Classic Gerät (AID)

3. Ergebnisse

mittels EliSpot6 Software. Die Daten zeigen vorläufige Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Analog wurde der Einfluss der Vergesellschaftung auf weitere Lamina propria Zellpopulationen der Δ dblGATA-1 Mäuse untersucht.

Die Analyse der T-Zellpopulationen nach der zweiwöchigen Vergesellschaftung ergab, dass die Population von CD103⁺ nonTregs in der Lamina propria von Δ dblGATA-1 Mäusen beinahe die Größe der entsprechenden Zellpopulation in den Wildtyptieren erreichte (Abbildung 34A).

Ebenfalls wurde die Wiederherstellung der ROR γ t⁺ Th17-Zellpopulation durch den Mikroflora austausch festgestellt (Abbildung 34B).

3. Ergebnisse

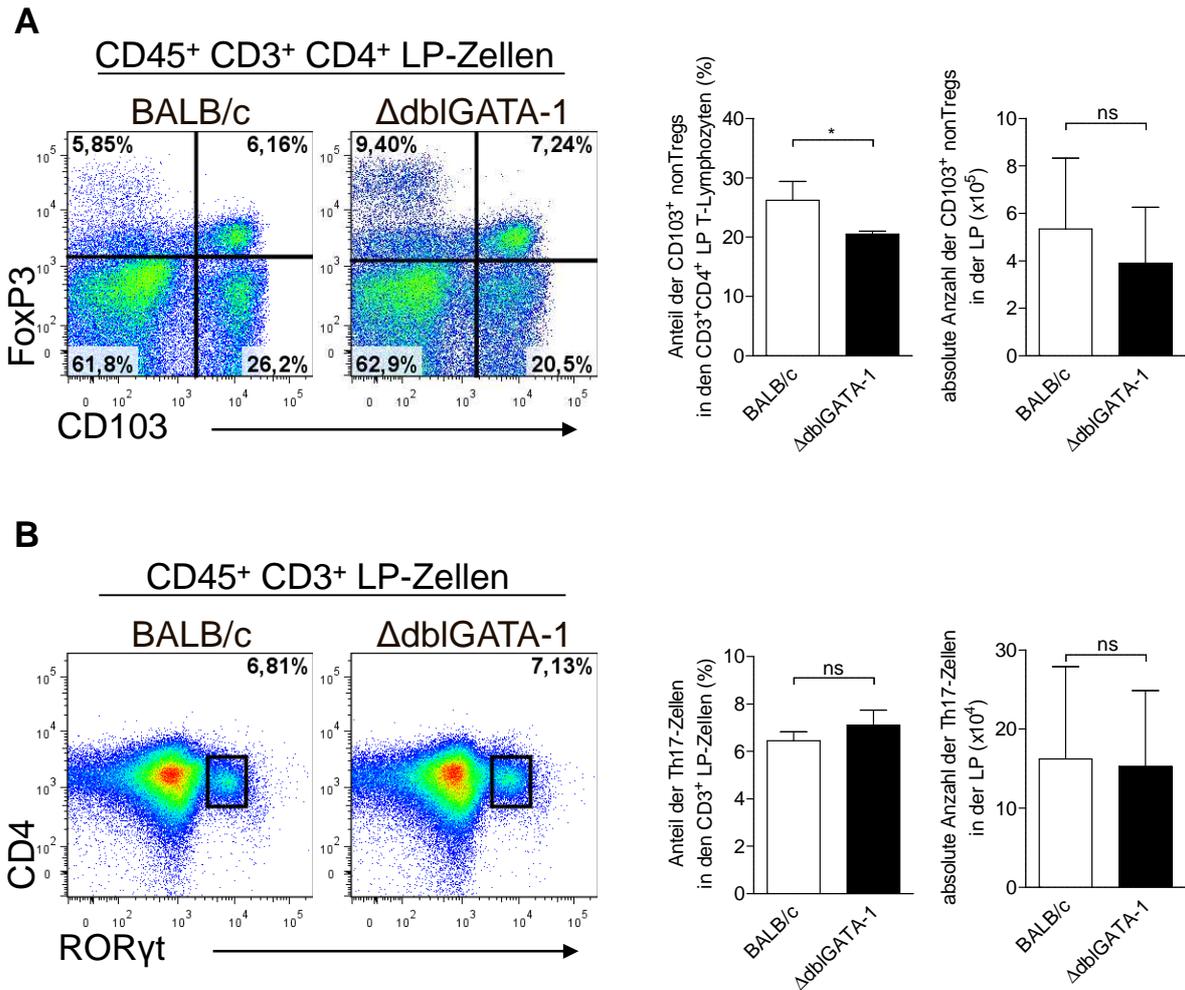


Abbildung 34: Die T-Lymphozytenpopulationen werden durch den Ausgleich der Mikroflora wiederhergestellt.

Die BALB/c und ΔdblGATA-1 Mäuse wurden vor der Analyse zwei Wochen lang vergesellschaftet. Die Zellen der Lamina propria wurden wie unter Abbildung 19 beschrieben isoliert und analysiert. Die Population der CD4⁺ T-Lymphozyten wurde als lebende CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ Zellen definiert und eingegrenzt. Die Subpopulationen der CD3⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten wurden anhand der Expression der populationspezifischen Transkriptionsfaktoren FoxP3 (Tregs, A) und RORγt (Th17, B) sowie des Markers CD103 (A) unterschieden. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden T-Lymphozytenpopulationen in der LP sind für eine repräsentative BALB/c und eine ΔdblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der untersuchten T-Lymphozytenpopulationen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Die Untersuchung von CD103⁺ MHCII⁻ Zellen in der Lamina propria der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäusen ergab, dass diese Zellpopulation, analog zu den T-Zellpopulationen, durch den Mikrobiotaausgleich fast auf die Populationsgröße der Wildtypiere wiederhergestellt wurde (Abbildung 35).

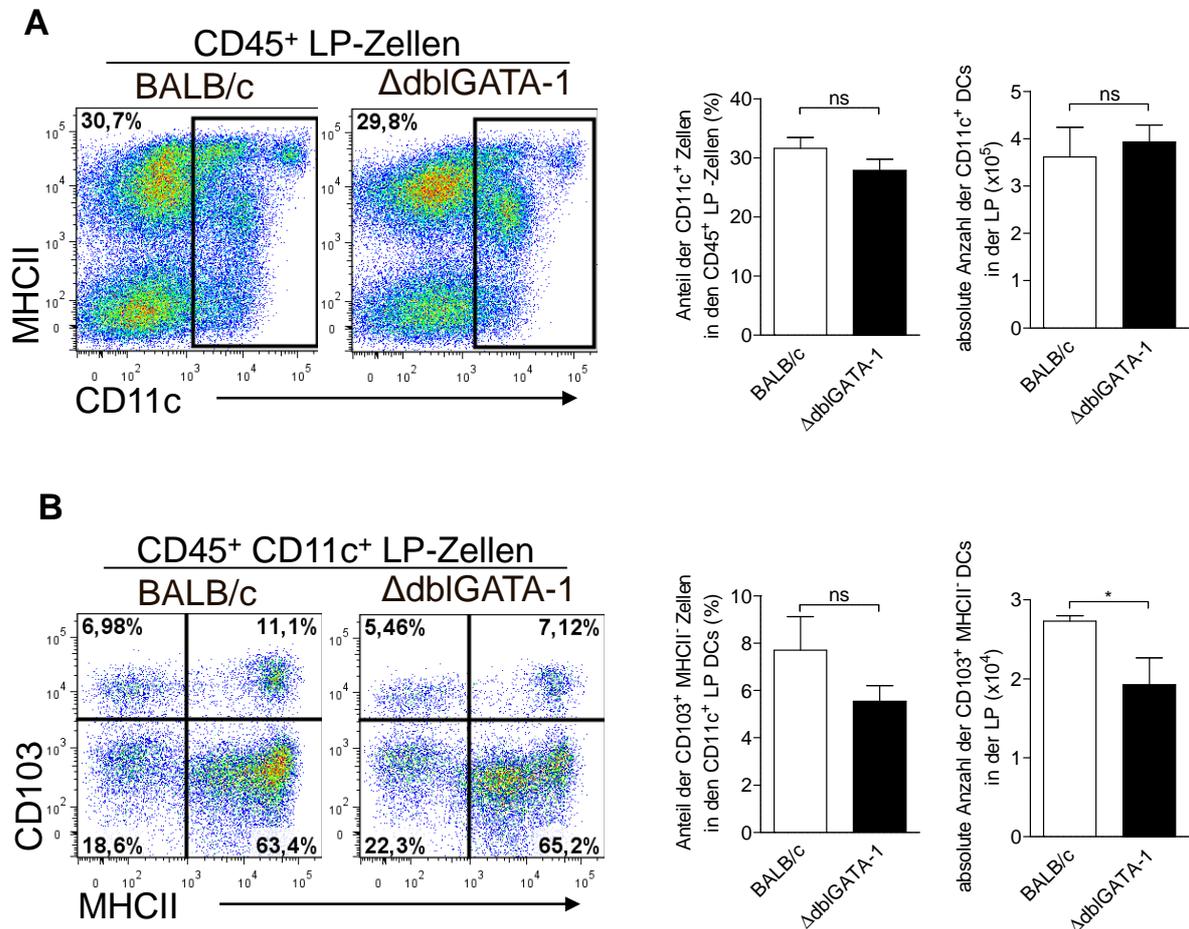


Abbildung 35: Wiederherstellung der CD11c⁺ Zellpopulationen in der Lamina propria von Δ dblGATA-1 Mäusen wird durch die Vergesellschaftung mit BALB/c Tieren realisiert.

Die BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse wurden vor der Analyse zwei Wochen lang vergesellschaftet. Die Zellen der Lamina propria wurden wie unter Abbildung 19 beschrieben isoliert und analysiert. Die Population der CD11c⁺ Zellen wurde als lebende CD45⁺ CD11c⁺ Zellen definiert und eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der CD11c⁺ Zellen wurden anhand der Expression der Marker CD103 und MHCII (B) unterschieden. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Zellpopulationen in der LP sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der untersuchten DC Populationen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

3.3.3 Analyse der IEL-Populationen in den vergesellschafteten Tieren

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Populationen der intraepithelialen Lymphozyten durch die Vergesellschaftung verändert werden.

Es wurde festgestellt, dass Mikrofloraaustausch zwischen den Tieren eine vollständige Wiederherstellung der $\text{TCR}\beta^+ \text{CD8}\alpha\beta^+$ IEL-Population in den $\Delta\text{dblGATA-1}$ Mäusen bewirkt (Abbildung 36A und B), während die Population von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ IELs keine Veränderungen durch die Vergesellschaftung erfuhr (Abbildung 36C).

3. Ergebnisse

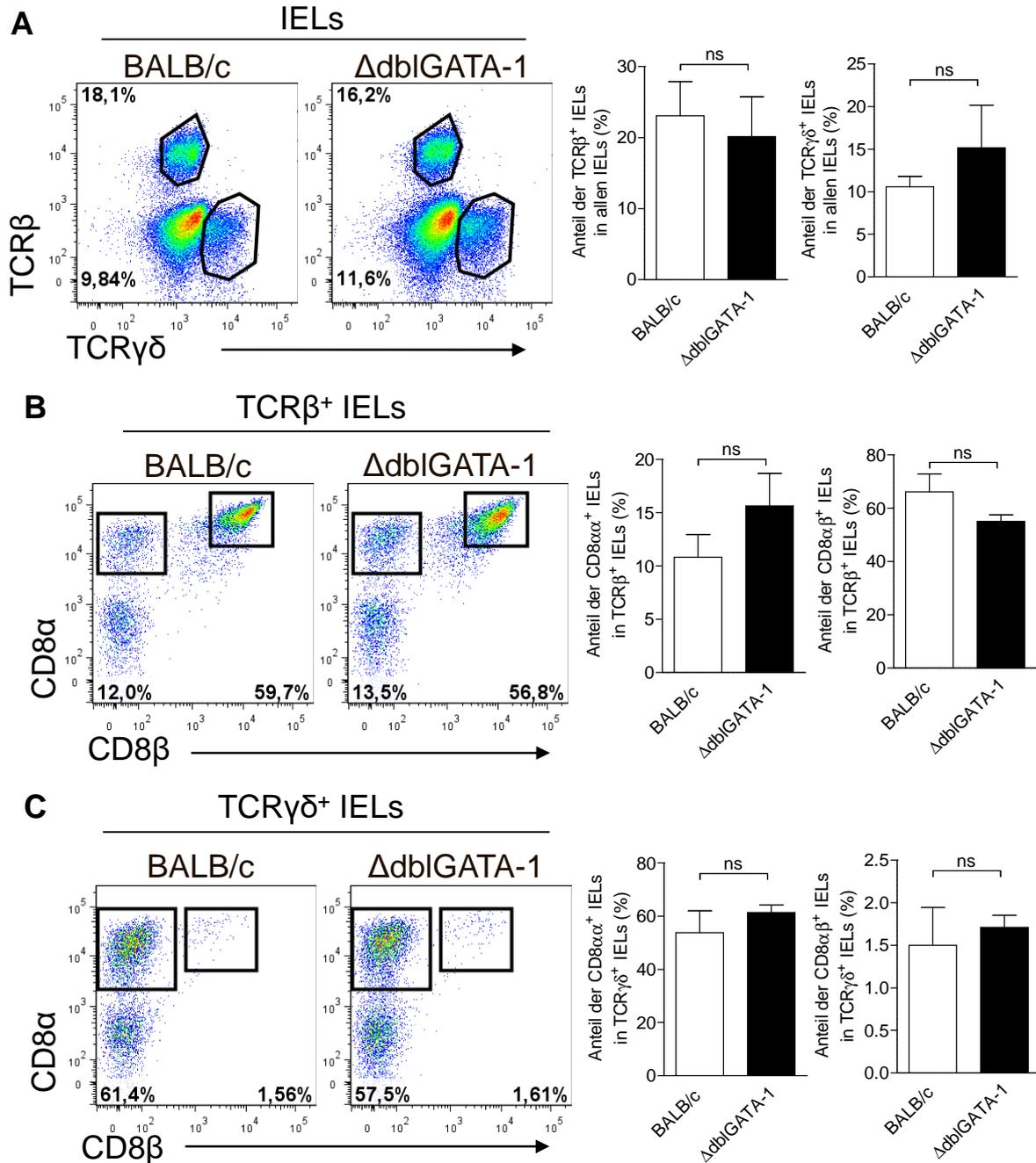


Abbildung 36: Nach dem Mikrofloraausgleich der Δ dblGATA-1 Mäuse stimmen die Populationen der IELs mit denen der Wildtyptiere überein.

Die BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse wurden vor der Analyse zwei Wochen lang vergesellschaftet. Die IELs des Dünndarmes wurden durch die EDTA-Behandlung abgetrennt und mit Hilfe von Percoll aufgereinigt. Die Hauptpopulation der IELs wurde als lebende TCR β^+ bzw. TCR $\gamma\delta^+$ Zellen definiert und eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der TCR β^+ (B) bzw. TCR $\gamma\delta^+$ (C) IELs wurden anhand ihrer Expression von CD8 α und CD8 β unterschieden. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden IEL Populationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil der untersuchten IEL Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

3.3.4 Auswirkung der Vergesellschaftung auf die Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Mäuse

Aufgrund dessen, dass die Vergesellschaftung der Δ dblGATA-1 Mäuse mit den BALB/c Wildtyptieren starke Veränderungen in den immunologischen Komponenten der Lamina propria und der intraepithelialen Lymphozyten auslöst, wurden zusätzlich die zellulären Bestandteile der Peyer Plaques nach dem Mikroflora austausch untersucht.

3.3.4.1 Mikroflora ausgleich bewirkte Veränderungen in den Immunfunktionen der Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse

Die Verschiebung des Verhältnisses zwischen den B- und T-Lymphozyten in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse wurde trotz der Vergesellschaftung festgestellt. Die Peyer Plaques der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse enthalten weiterhin prozentual weniger der $CD3^+ CD4^+$ T-Lymphozyten (Abbildung 37B) bei der gleichzeitigen Erhöhung des prozentualen Anteils der $B220^+$ B-Zellen (Abbildung 37A).

3. Ergebnisse

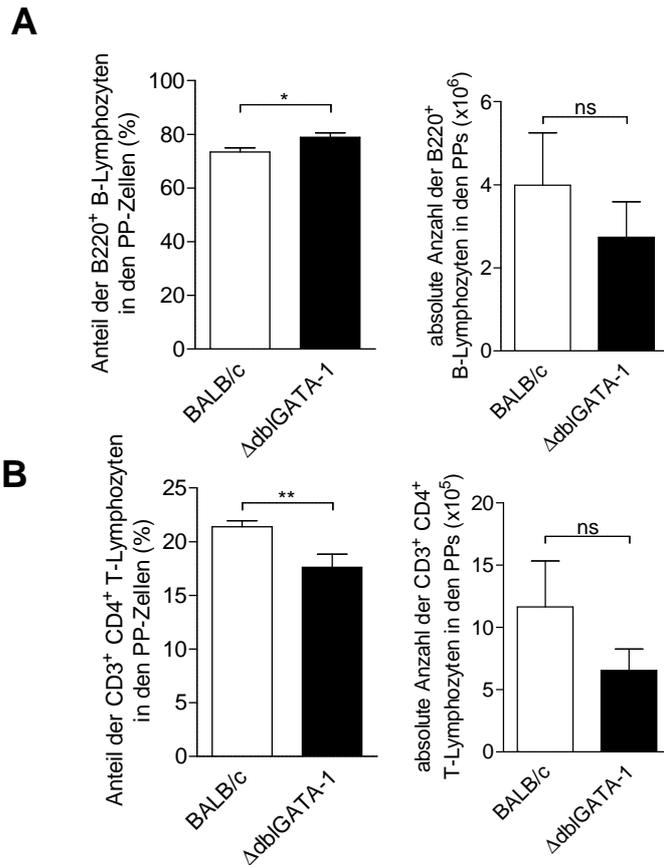


Abbildung 37: Die Verschiebung des Verhältnisses zwischen den B- und T-Lymphozyten bleibt in den Peyer Plaques der *dblGATA-1* Tiere nach der Vergesellschaftung erhalten.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Population der B220⁺ B-Zellen (A) sowie der CD3⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten (B) wurden bestimmt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der untersuchten Zellpopulationen in der LP sind in Balkendiagrammen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Die Analyse der Keimzentrums-B-Zellen ergab, dass die Vergesellschaftung den Anteil der IgA-klassengewechselten Keimzentrums-B-Zellen deutlich erhöht (Abbildung 38A). Gleichzeitig wurde Reduktion des IgG1-Klassenwechsels in den Keimzentrums-B-Zellen der Δ dblGATA-1 Mäuse beobachtet (Abbildung 38A). Die Bestimmung der Ki-67-Expression in den IgA⁺ Keimzentrums-B-Zellen zeigte, dass der Anteil der sich proliferierenden Zellen den Wert der Kontrolltiere vom Wildtyp von über 90 % erreicht (Abbildung 38B). Die Proliferation von IgG1⁺ Keimzentrums-B-Zellen, welche bereits bei den nicht vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäusen nicht verändert war (siehe Abbildung 18), wurde durch die Vergesellschaftung beider Mausstämmen nicht beeinflusst (Abbildung 38C).

3. Ergebnisse

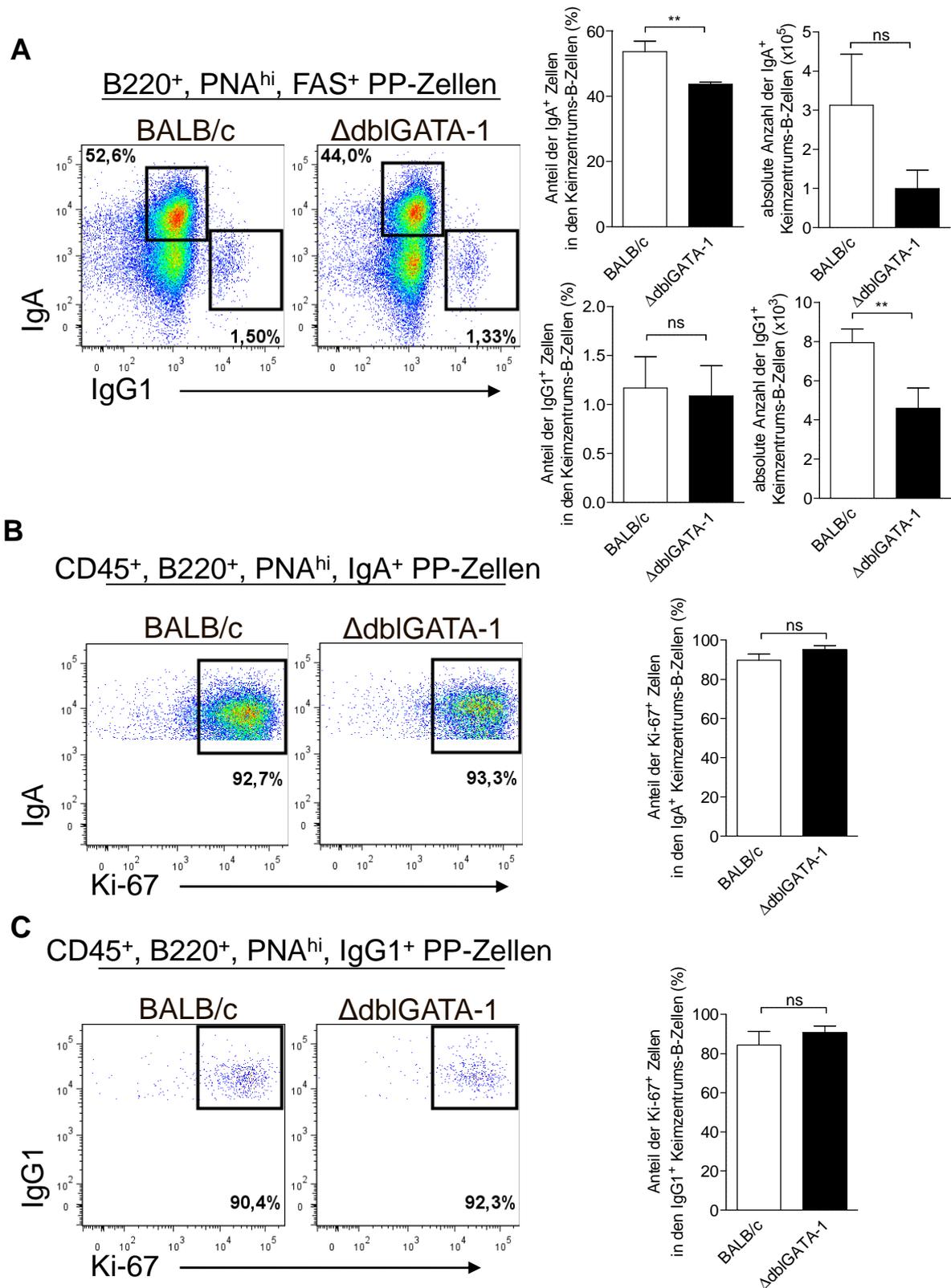


Abbildung 38: Der Mikrobiotaausgleich durch die Vergesellschaftung stellt in den Peyer-Plaques der $\Delta dbiGATA-1$ Mäuse den IgA-Klassenwechsel wieder her.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die lebenden CD45⁺ B220⁺ PNA^{hi} FAS⁺ Keimzenters-B-Zellen wurden anhand ihrer Immunglobulinklasse als IgA⁺ bzw. IgG1⁺ Keimzenters-B-Zellen eingegrenzt (A). Die Ki-67-Expression wurde in den IgA⁺ (B) bzw. IgG1⁺ (C) Keimzenters-B-Zellen

3. Ergebnisse

analysiert. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden Keimzentrums-B-Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie der absoluten Anzahl der entsprechenden B-Zellpopulationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

Die Analyse der TFH-Zellpopulationen ergab, dass die Vergesellschaftung der Tiere die Population von CXCR5⁺ PD-1⁺ TFH-Lymphozyten in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse wiederherstellt (Abbildung 39A).

Um die Ursache für den veränderten Klassenwechsel in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse und seine Wiederherstellung nach der Vergesellschaftung zu untersuchen, wurden die CXCR5⁺ PD-1⁺ TFH-Lymphozyten aus den nicht vergesellschafteten sowie vergesellschafteten BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäusen mittels Durchflusszytometrie aufgereinigt um die Genexpression von IL-4 und TGF- β zu bestimmen. Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Abbildung 39B) und durch die Bestimmung der Expressionshöhe von CXCR5-mRNA (Abbildung 36C) bestimmt.

Nach der Bestimmung der Genexpression von IL-4 und TGF- β , wurde das Verhältnis zwischen den TGF- β und IL-4 Expressionswerten berechnet (Abbildung 39C). Ist dieses Verhältnis größer (wie in den BALB/c Mäusen oder vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Tieren), führen die Keimzentrums-B-Zellen den Klassenwechsel zu IgA durch. Ist das Verhältnis zwischen der TGF- β und IL-4 Expression verringert, wechseln die Keimzentrums-B-Zellen ihre Immunglobulinklasse verstärkt zu IgG1 (nicht vergesellschaftete Δ dblGATA-1 Mäuse) (Abbildung 39C).

3. Ergebnisse

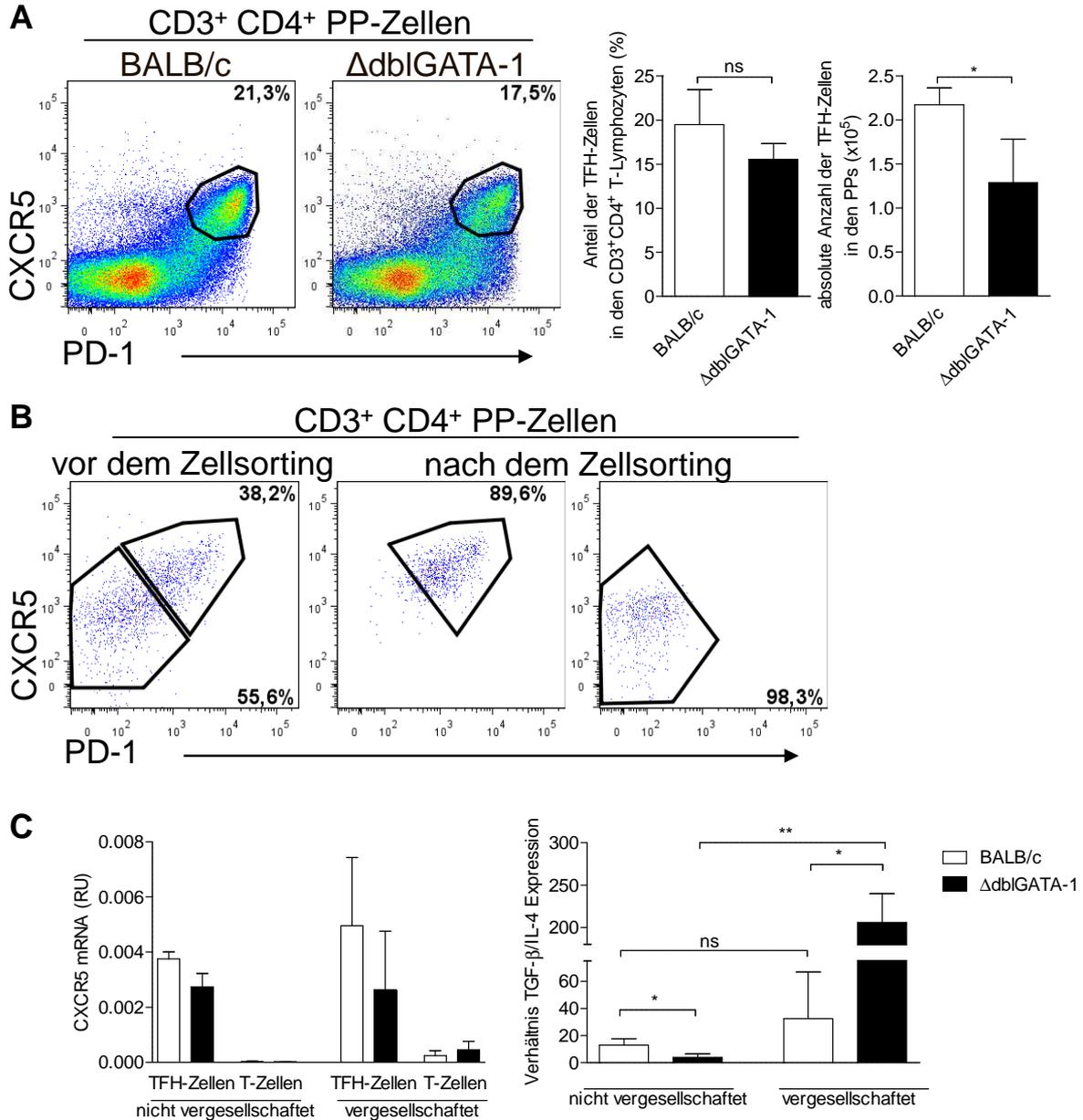


Abbildung 39: Die Vergesellschaftung verändert das Verhältnis in der Produktion von TGF-β und IL-4 in den TFH-Zellen der ΔdblGATA-1 Mäuse

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (A) oder aufgereinigt (B). Die TFH-Lymphozyten wurden als lebende CD3⁺ CD4⁺ CXCR5⁺ PD-1⁺ Zellen eingegrenzt.

A: Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden T-Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine ΔdblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts).

B: Die Reinheit der isolierten TFH- und nonTFH-Populationen wurde nach der Isolierung durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der isolierten T-Zellpopulationen sind für eine repräsentative Zellsolierung angegeben.

C: Genexpressionsanalyse in den TFH- und non-TFH-Lymphozyten mittels qRT-PCR. Gezeigt sind Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Tieren pro Gruppe. Die Expression von CXCR5 mRNA relativ zur β-Aktin Expression (links) sowie das Verhältnis zwischen der Expression von TGF-β und IL-4 (rechts) sind gezeigt.

3. Ergebnisse

Die Analyse anderer T-Lymphozytenpopulationen nach dem Mikroflora-austausch ergab, dass die Vergesellschaftung eine vollständige Wiederherstellung der CD103⁺ Foxp3⁻ nonTregs sowie RORγt⁺ Th17 T-Zellpopulationen (Abbildung 40A und B) in den Peyer Plaques der ΔdblGATA-1 Mäuse bewirkte.

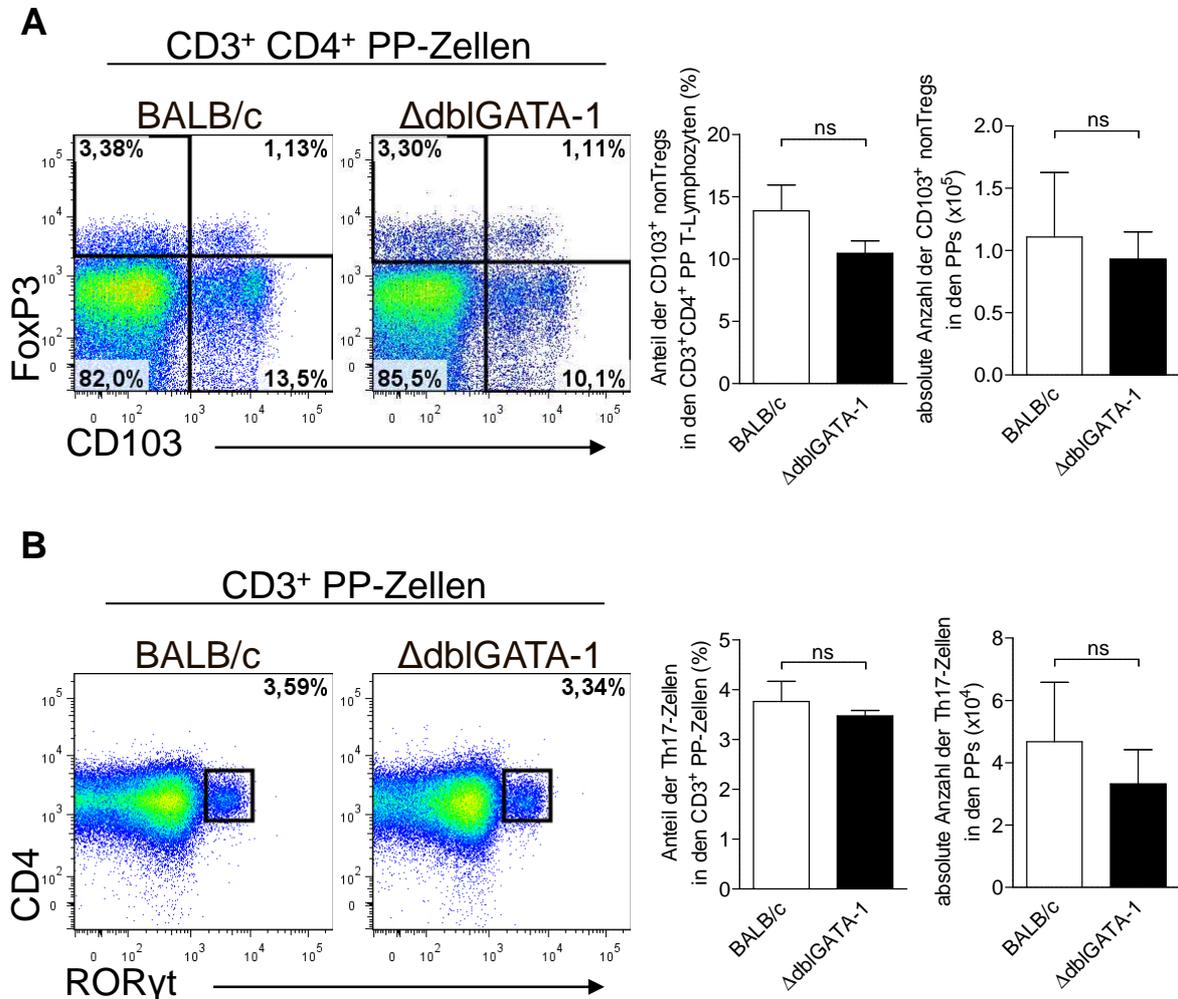


Abbildung 40: Der Austausch der Mikroflora induziert die Entwicklung der CD103⁺ nonTreg-Population.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD4⁺ T-Lymphozyten wurden als lebende CD3⁺ CD4⁺ Zellen eingegrenzt. Die Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von FoxP3 und CD103 (Tregs und nonTregs, B) sowie RORγt (Th17-Zellen, C) definiert. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden T-Zellpopulationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine ΔdblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten bewirkte Austausch der Darmflora keine komplette Wiederherstellung von CD11c⁺ CD103⁺ MHCII⁻ Zellen in den Peyer Plaques der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse (Abbildung 41B). Trotz der Vergesellschaftung wurde eine Verschiebung zugunsten der CD11c⁺ CD103⁻ MHCII⁺ Zellpopulation in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse beobachtet (Abbildung 41B).

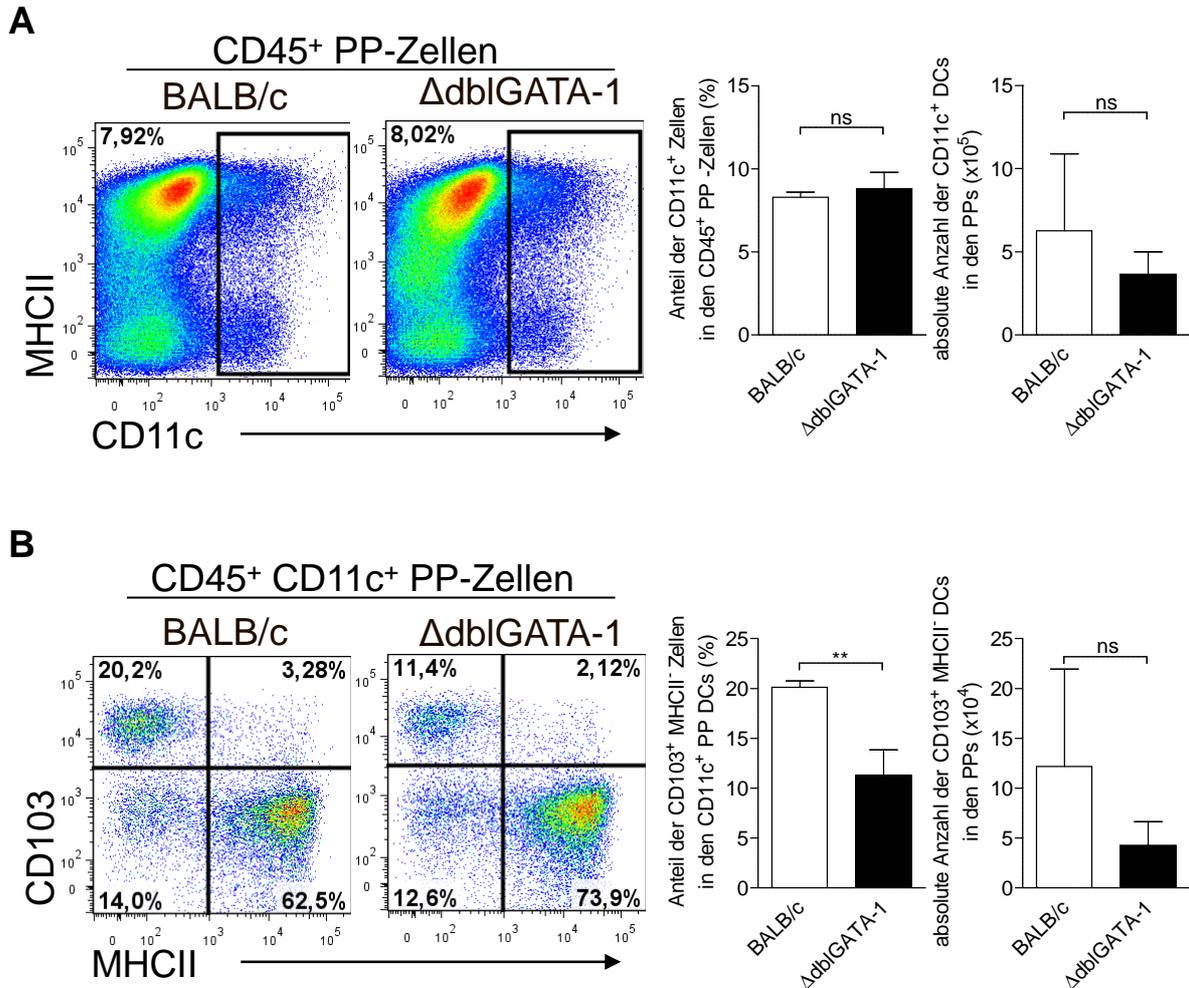


Abbildung 41 Trotz der Vergesellschaftung treten veränderte Populationen von CD11c⁺ Zellen in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere auf.

Die Zellen der Peyer Plaques wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD11c⁺ dendritischen Zellen wurden als lebende CD45⁺ CD11c⁺ Zellen eingegrenzt (A). Die Subpopulationen der CD11c⁺ T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD103 und MHCII definiert (B). Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der entsprechenden DC-Populationen sind für eine repräsentative BALB/c und eine Δ dblGATA-1 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

3.3.4.2 Der Austausch der Mikroflora beeinflusst nicht die Größe der Peyer-Plaques in den eosinophil-defizienten Mäusen

In dem Kapitel 3.1.3 wurde gezeigt, dass die Größe der Peyer Plaques in den eosinophil-defizienten Tieren gegenüber den Kontrolltieren verringert war (Abbildung 14). Im folgenden Experiment sollte der Einfluss der Vergesellschaftung auf die Größe der Peyer Plaques untersucht werden.

Wie bereits gezeigt wurde, sind die Größenunterschiede in den Peyer Plaques der BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse erst ab der fünften Lebenswoche messbar (Abbildung 21). Aus diesem Grund wurden drei Wochen alten BALB/c und Δ dblGATA-1 Tiere vergesellschaftet. Die Analyse dieser Tiere erfolgte nach zwei Wochen der Vergesellschaftung, wenn die Tiere den Alter von fünf Wochen erreichten (Abbildung 42A). An diesem Zeitpunkt wurde das Gewicht der Peyer Plaques bestimmt (Abbildung 42B).

Die Bestimmung des Gewichtes der Peyer Plaques ergab, dass das Gewicht von Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse sich trotz der Vergesellschaftung signifikant von dem PP-Gewicht der Kontrolltiere unterscheidet (Abbildung 42B). Eine zusätzliche durchflusszytometrische Analyse der Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Zellen zeigte, dass diese Zellpopulation in den Peyer Plaques der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse gegenüber den Kontrolltieren verringert ist (Abbildung 42C).

3. Ergebnisse

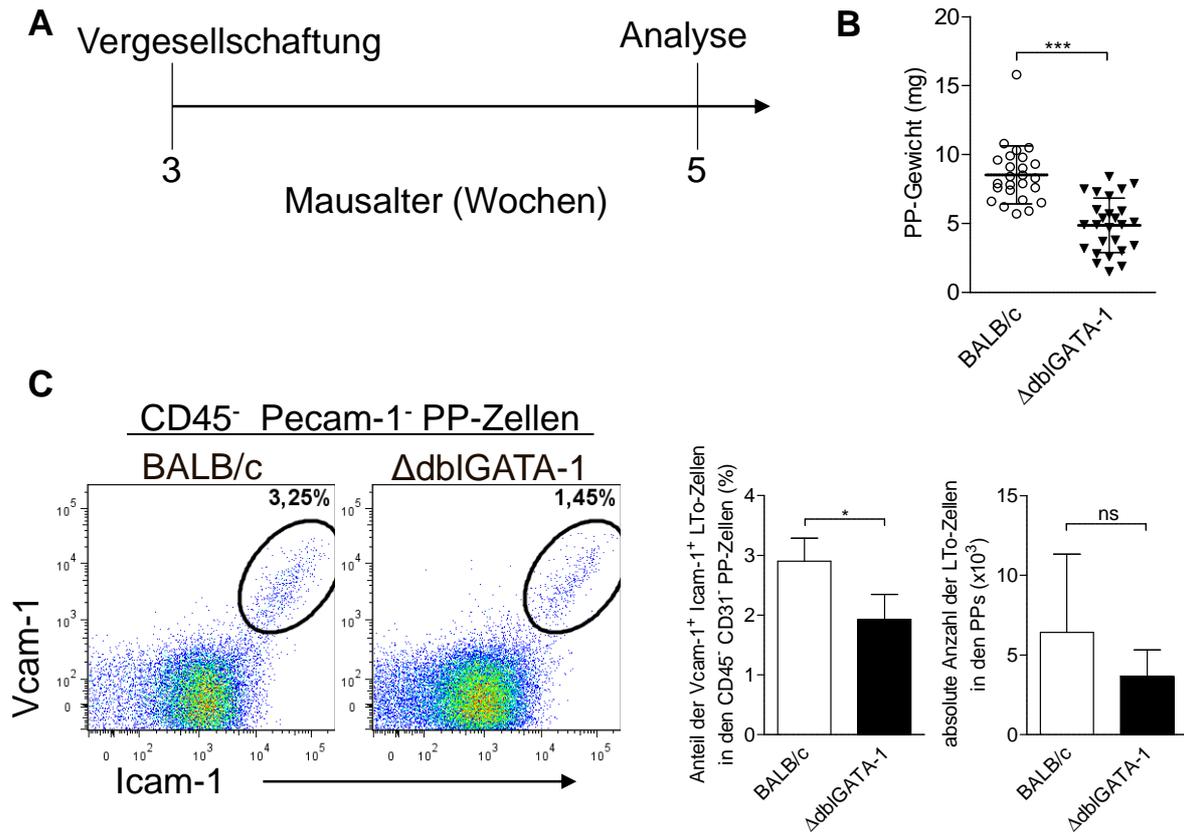


Abbildung 42: Die Größe der Peyer-Plaques der eosinophil-defizienten Tiere ist durch die Vergesellschaftung nicht beeinflusst.

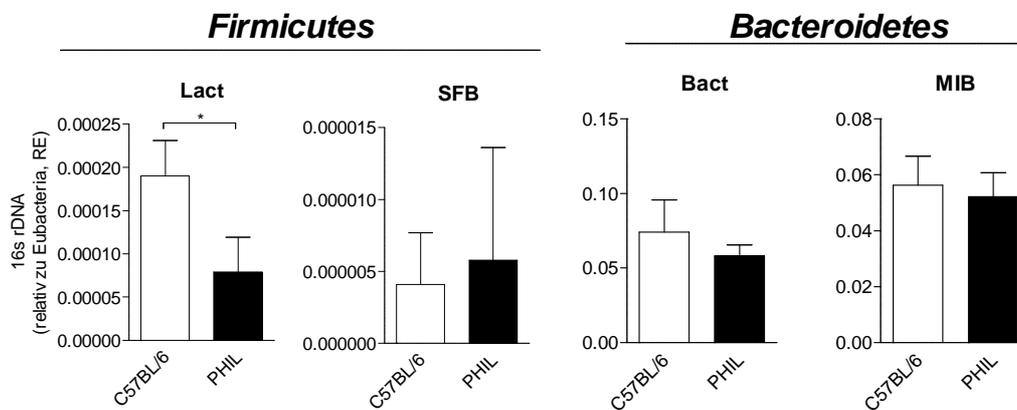
BALB/c und Δ dbiGATA-1 Tiere wurden ab dem Alter von drei Wochen zwei Wochen lang vergesellschaftet und das PP-Gewicht anschließend bestimmt (A). Das Gewicht der isolierten Peyer-Plaques wurde mittels einer Feinwaage bestimmt und in (B) dargestellt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von einem von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

3.3.5 Die Analyse der Darmimmunkompartimente der PHIL-Mäuse

Um den Einfluss der Darmmikroflora bzw. der Eosinophilen zu verifizieren, wurde in den folgenden Experimenten ein anderer eosinophil-defizienter Mausstamm, die PHIL-Mäuse, untersucht. Weil die Eosinophil-Defizienz der PHIL-Mäuse auf einer, von den Δ dblGATA-1 Tieren unterschiedlichen, genetischen Modifikation beruht (siehe Kapitel 2.2.1.1), werden die PHIL-Mäuse heterozygot gezüchtet. Das bedeutet, dass es sich bei den eosinophil-defizienten PHIL-Mäusen und ihren Wildtypkontrolltieren des C57BL/6-Stammes um die Wurfgeschwister handelte, welche von den gleichen Eltern abstammten und lebenslang vergesellschaftet waren.

A



B

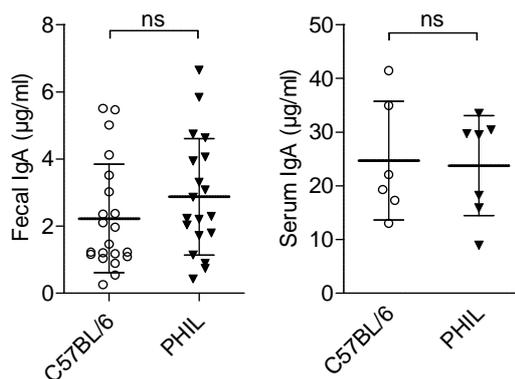


Abbildung 43: Zwischen den PHIL- und C57BL/6-Mäusen liegen kaum Mikrofloraunterschiede vor.

A): Frische Mausfäzes wurden gesammelt und wie unter der Abbildung 16 bereits beschrieben analysiert. Die Detektion der für die einzelnen Mikrofloraarten spezifischer Gene erfolgte mit Hilfe von qRT-PCR und wurde auf die Gesamtmenge der Eubacteria normalisiert. Gezeigt sind die repräsentativen Daten eines von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe.

B): Der IgA-Gehalt wurde mittels ELISA bestimmt. Die absoluten Mengen von IgA in Fäzes (links) und Blutserum (rechts) der PHIL- und C57BL/6-Mäuse sind gezeigt. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit 4 bis 19 Tieren pro Gruppe. Statistische Auswertung: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Die Analyse der Zusammensetzung der Darmmikroflora der PHIL-Mäuse und ihrer C57BL/6-Wurfgeschwister zeigte nur kleinere Abweichungen beider Mausstämmen voneinander (Abbildung 43A).

Die Bestimmung des löslichen IgA im Kot und Blutserum ergab, dass die IgA-Mengen in den Fäzes und dem Blutserum der PHIL-Mäuse sowie deren Kontrolltiere sehr stark variierten, so dass keine Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen feststellbar waren (Abbildung 43B).

Die Untersuchung der Immunzellen der Lamina propria ergab, dass die Population der IgA⁺ Plasmazellen in den eosinophil-defizienten PHIL-Mäusen gegenüber ihren Kontrolltieren verringert ist (Abbildung 44A). Im Gegensatz zu den Δ dblGATA-1 Mäusen wurde gleichzeitig keine Erhöhung der B220- und MHCII-Expression an der Oberfläche der IgA⁺ Plasmazellen der PHIL-Mäuse festgestellt (Abbildung 44B).

Ebenfalls die Bestimmung der IgA-Sekretion durch die IgA⁺ Plasmazellen der Lamina propria der PHIL-Mäuse mittels ELISpot zeigte keine Unterschiede zu den C57BL/6-Wildtypen (Abbildung 44C).

Die Analyse der CD103⁺ nonTreg-T-Zellpopulation (Abbildung 44D) sowie der CD11c⁺ CD103⁺ MHCII⁻ Zellpopulation (Abbildung 44E) ergab, analog zu den vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäusen, keine Unterschiede zwischen den PHIL- und C57BL/6-Tieren.

3. Ergebnisse

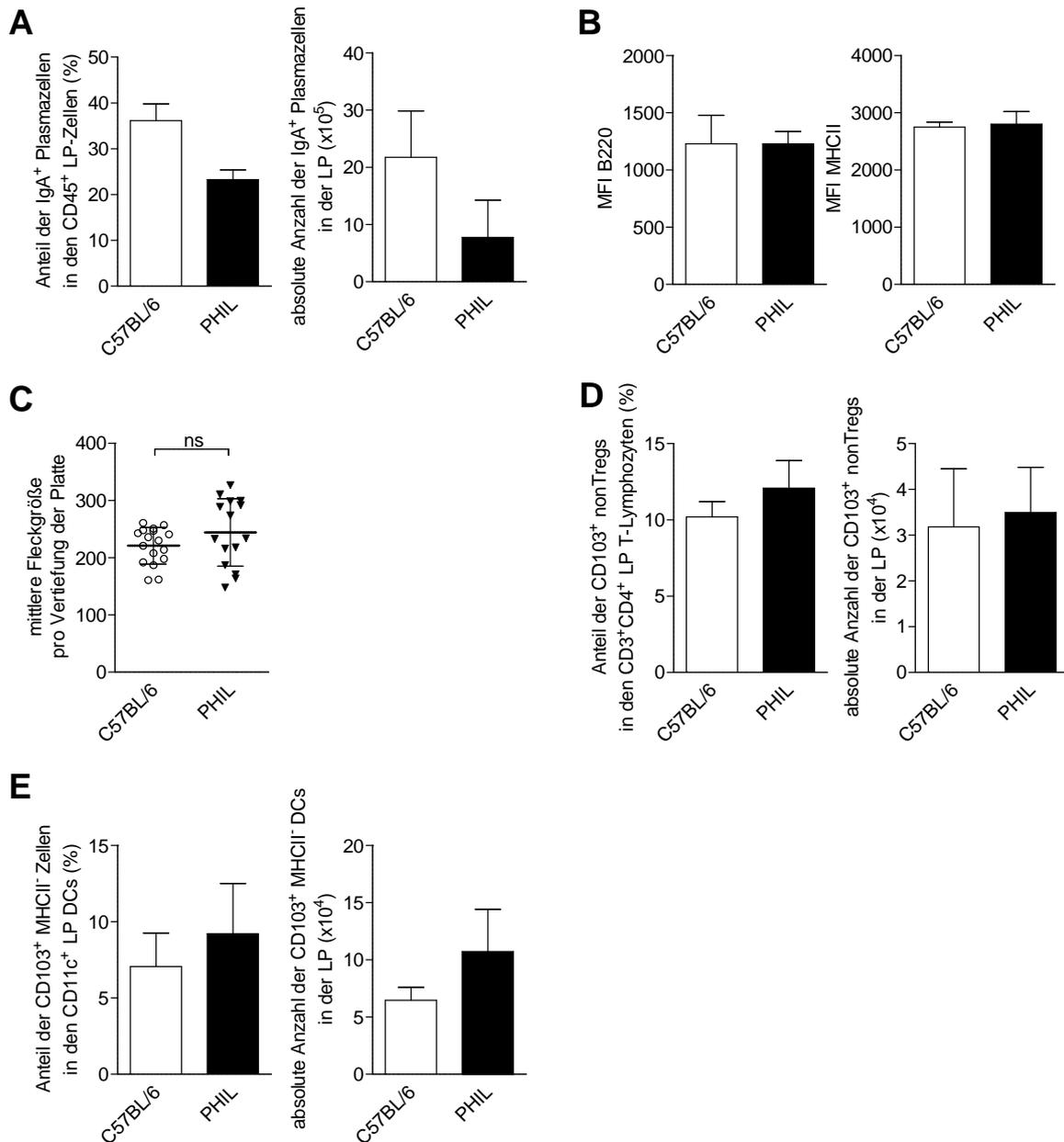


Abbildung 44: Die Population von IgA⁺ Plasmazellen ist in der Lamina propria der PHIL-Mäuse reduziert.

Gezeigt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen (A, B, D, E) bzw. mittels ELISpot (C) Untersuchung der Lamina propria Zellen der PHIL- und C57BL/6 Mäuse. Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil, die absolute Anzahl der IgA⁺ Plasmazellen (A), der CD103⁺ nonTregs (D) sowie der CD11c⁺ CD103⁺ MHCII⁺ Zellen (E) sind in Balkendiagrammen gezeigt. Die Expression von B220, MHCII an den LP IgA⁺ Plasmazellen der PHIL und C57BL/6 Tiere wurde durch die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mittels der FlowJo7.6.5 Software bestimmt (B). Die zusammenfassende Auswertung ist gezeigt. Die Bestimmung der IgA-Sekretion erfolgte durch die Berechnung der mittleren Fleckgröße pro Vertiefung mittels ELISpot (C). Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit 2 bis 5 Tieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Die Untersuchung der intraepithelialen Lymphozyten zeigte keine Veränderungen in den deren Subpopulationen in den PHIL-Mäusen gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 45).

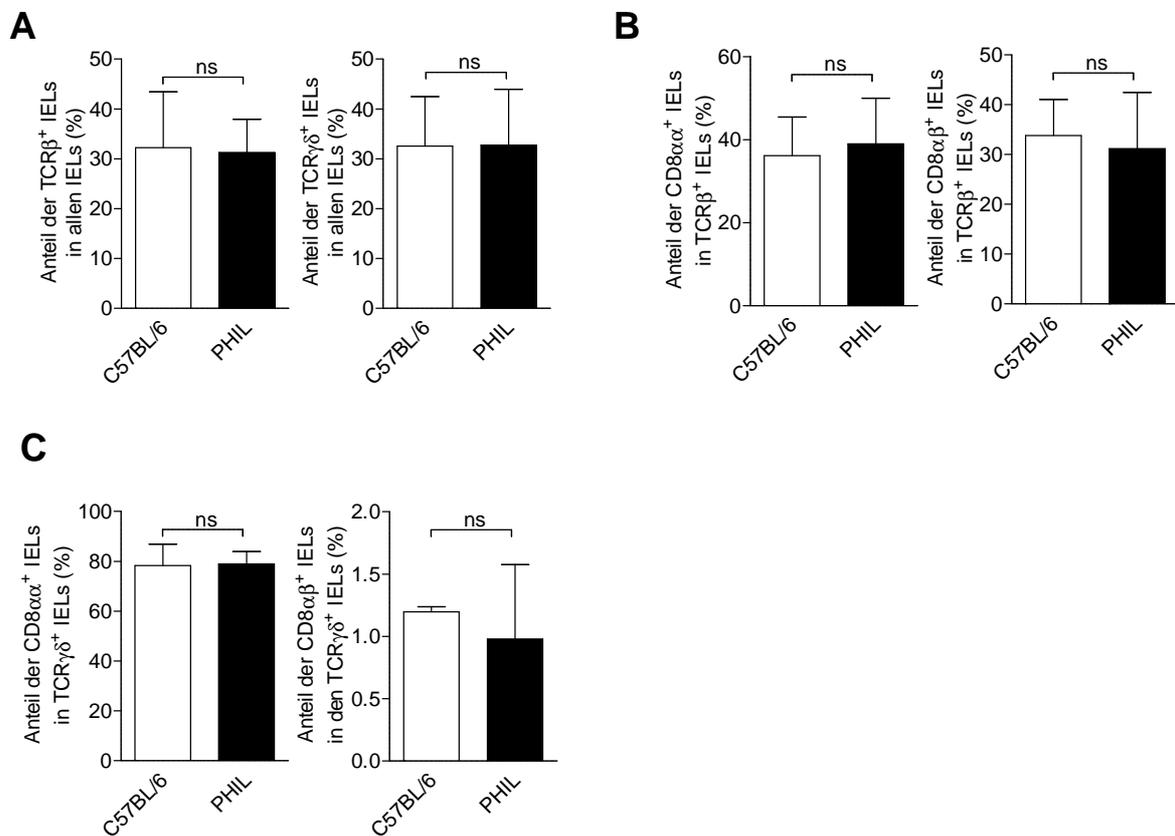


Abbildung 45: Die Populationen von IELs sind in den PHIL-Mäusen nicht verändert.

Die IELs des Dünndarmes wurden wie unter der Abbildung 4 beschrieben isoliert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Ergebnisse die zusammenfassenden repräsentativen Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe (A, B, C). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

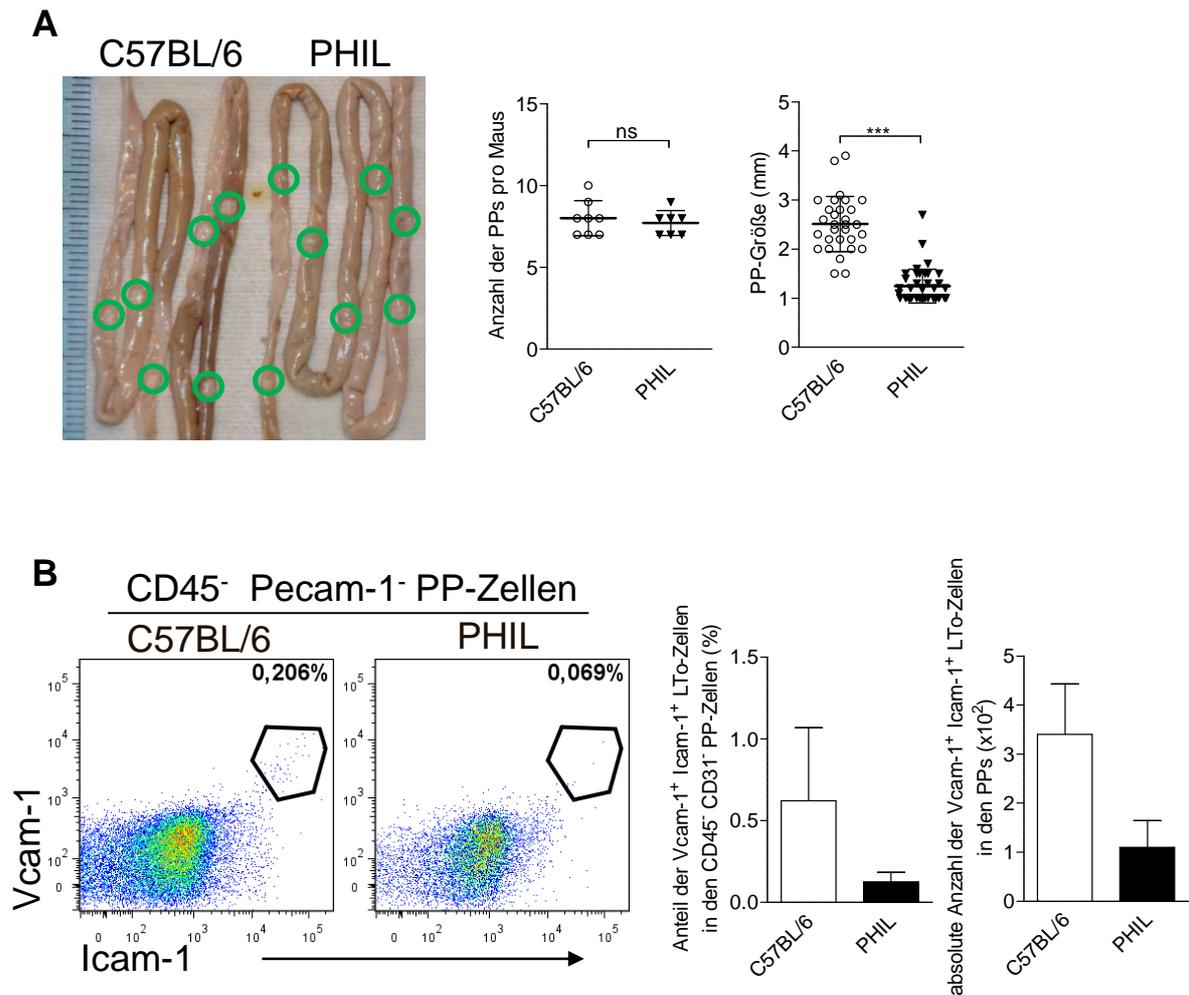


Abbildung 46: Die Größe der Peyer Plaques in den eosinophil-defizienten PHIL-Mäusen ist reduziert im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern vom Wildtyp.

A: Der Dünndarm wurde in 10 %-iger Essigsäure fixiert und die Größe der PPs wurde mittels eines Stereomikroskops unter Vergrößerung bestimmt. Die Aufnahmen der PPs für jeweils eine repräsentative C57BL/6 und PHIL Maus (A, links) sind gezeigt. Gezeigt sind die zusammenfassende Ergebnisse der PP-Anzahl und der PP-Größe von zwei unabhängigen Messungen mit 7 bis 8 Mäuse pro Gruppe (A, rechts).

B: Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen der Peyer Plaques. Die CD45⁻ Pecam-1⁻ Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Stromazellen wurden in den PHIL- und C57BL/6 Mäusen untersucht. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Experimentes mit jeweils 2 bis 5 Tieren pro Gruppe. Die Prozentsätze der LTo-Stromazellpopulation sind für eine repräsentative PHIL und C57BL/6 Maus angegeben (links). Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie der absoluten Anzahl LTo-Stromazellen sind in Balkendiagrammen gezeigt (rechts). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

In den Peyer Plaques der PHIL-Mäuse wurde eine leichte Erhöhung des prozentualen Anteils von FAS⁺ PNA^{hi} Keimzentrums-B-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren beobachtet (Abbildung 47A). Dabei wurde eine Reduktion der absoluten Zellzahl festgestellt, welche auf der verkleinerten Größe der Peyer Plaques zurückzuführen ist (Abbildung 14B). Diese Beobachtung gilt auch für andere Zellpopulationen der Peyer Plaques in den PHIL-Mäusen. Außerdem wurden keine Veränderungen in den prozentualen Anteilen der IgA-klassengewechselten Keimzentrums-B-Zellen (Abbildung 47B) sowie der sich proliferierenden Ki-67⁺ IgA⁺ Keimzentrums-B-Zellen (Abbildung 47C) festgestellt.

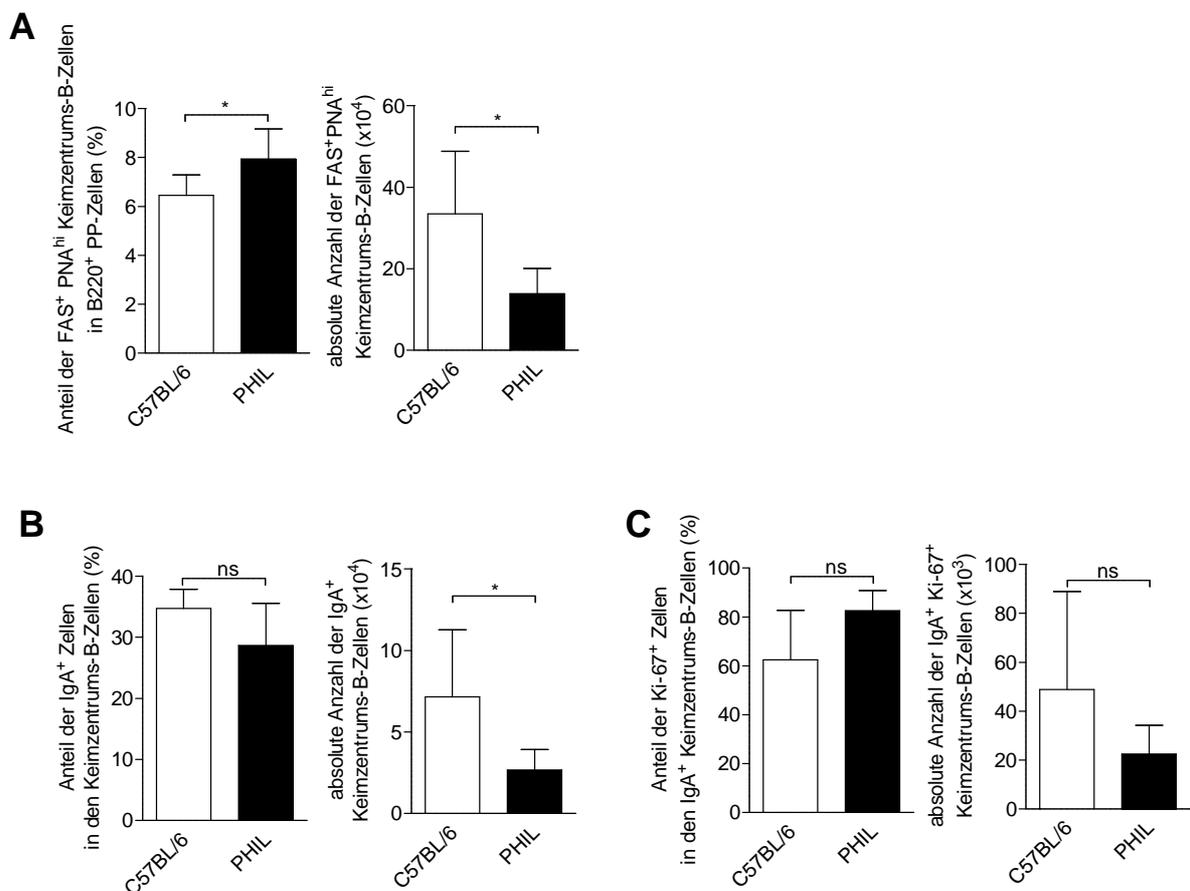


Abbildung 47: Der Klassenwechsel zu IgA ist in den Peyer Plaques der PHIL-Tiere nicht beeinträchtigt.

Die CD45⁺ B220⁺ PNA^{hi} FAS⁺ Keimzentrums-B-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 bis 5 Tieren pro Gruppe. Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie der absoluten Anzahl der entsprechenden B-Zellpopulationen sind in Balkendiagrammen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

Analog zu der Lamina propria wurden in den Peyer Plaques der PHIL-Mäuse keine Unterschiede in den Populationen der CD103⁺ non-Treg-Lymphozyten (Abbildung 48B) und der CD11c⁺ CD103⁺ MHCII⁻ Zellen (Abbildung 48C) im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet. Ebenfalls war die Population der CXCR5⁺ PD-1⁺ TFH-Zellen in den Peyer Plaques der PHIL-Mäuse nicht beeinträchtigt (Abbildung 48A).

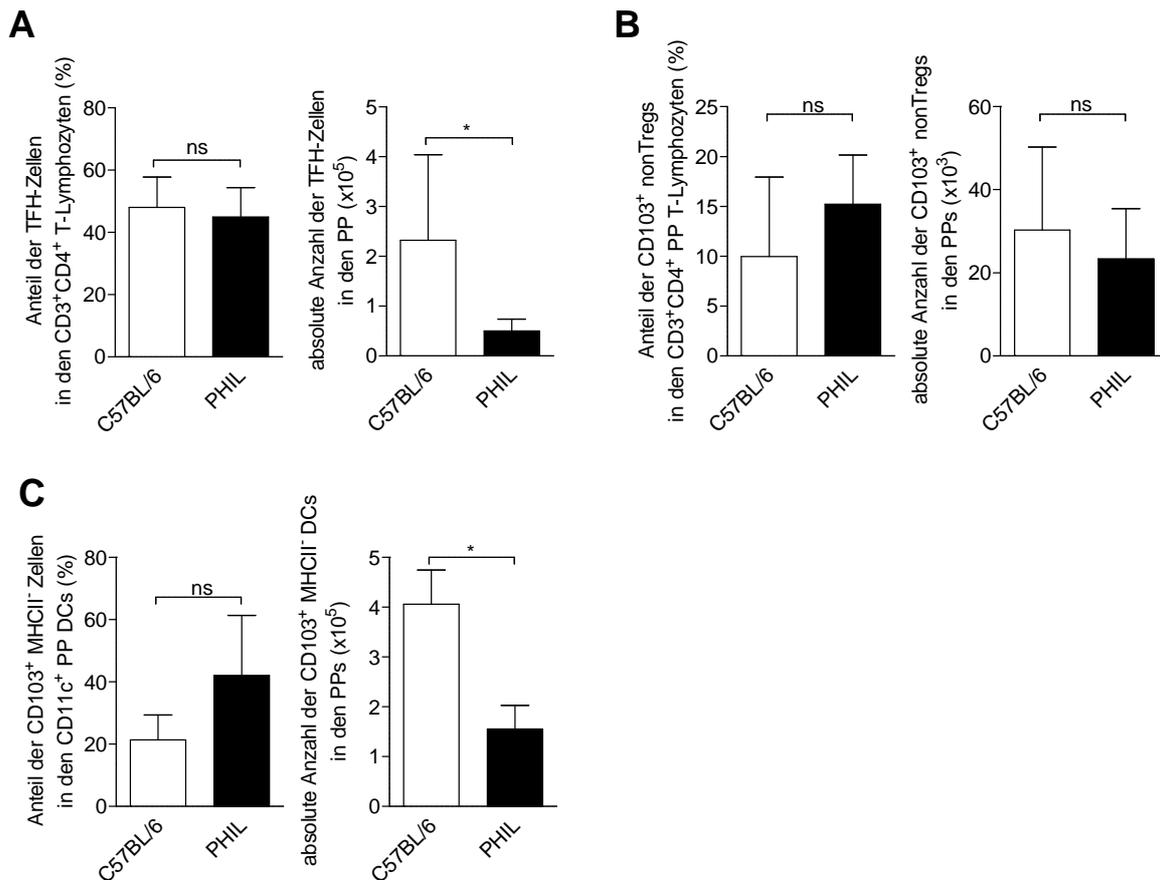


Abbildung 48: Die Populationen der T-Lymphozyten und der CD11c⁺ Zellen sind in den Peyer Plaques der PHIL-Mäusen nicht beeinträchtigt.

Die Populationen der T-Lymphozyten sowie der CD11c⁺ Zellen in den Peyer Plaques der PHIL-Mäuse wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die TFH-Population wurde als CD3⁺ CD4⁺ CXCR5⁺ und PD-1⁺ Zellen (A) und die CD103⁺ nonTreg-Lymphozyten als FoxP3⁻ und CD103⁺ (B) definiert. Zusätzlich sind die Daten der CD103⁺ MHCII⁻ DC-Population gezeigt (C). Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 bis 5 Tieren pro Gruppe. Zusammenfassende Ergebnisse für den prozentualen Anteil sowie die absolute Anzahl der entsprechenden Populationen sind in Balkendiagrammen gezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des abhängigen Zweistichproben-t-Testes: ns: nicht signifikant; *P-Wert<0,05; **P-Wert<0,01; ***P-Wert<0,001.

3. Ergebnisse

3.3.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend lieferte die Analyse der Immunzellen des Dünndarmes der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse ein Erkenntnis, dass viele Veränderungen in den Immunkompartimenten des Darmes, welche anfänglich in den Δ dblGATA-1 Tiere beeinträchtigt waren, sich durch den Mikroflora-austausch mit den BALB/c Wildtyp-Tieren korrigieren ließen. Die Populationen von IgA^+ Plasmazellen, CD103^+ FoxP3^- nonTregs, CD3^+ $\text{ROR}\gamma^+$ Th17-Lymphozyten in der Lamina propria, die reguläre Klassenwechsel sowie die Population und Zytokinexpression-Profil der TFH-Zellen in den Peyer Plaques wurden durch das Angleichen der Darmmikroflora wiederhergestellt. Zusätzlich wurde die vollständige Erholung der $\text{TCR}\beta^+$ $\text{CD8}\alpha\beta^+$ IEL-Population in den vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Tieren beobachtet.

Nichtdestotrotz blieben einige wenige Veränderungen der Δ dblGATA-1 Tiere durch die Vergesellschaftung unbeeinflusst und könnten somit Mikroflora-unabhängig sein. Dazu zählten eine erhöhte Expression von B220 und MHCII Molekülen an der Oberfläche von IgA^+ Plasmazellen sowie deren verringerte Immunoglobulinsekretion. Zusätzlich ließ sich die Population der CD11c^+ CD103^+ MHCII^- Zellen in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse durch den Mikroflora-austausch nicht wiederherstellen.

4. Diskussion

Das Gleichgewicht des Darmimmunsystems wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase spielt die Interaktion zwischen der Darmmikroflora und dem mukosalen Immunsystem. Ein neues und bisher wenig erforschtes Gebiet ist die Rolle der eosinophilen Granulozyten in diesem Prozess.

Eosinophile sind eine Hauptzellpopulation der Lamina propria, auch im Ruhezustand wenn keine Entzündung vorliegt. Was ihre Aufgabe sein könnte, darüber ist bisher nur sehr wenig bekannt und es gibt nur einige Publikationen, die sich damit beschäftigen. Es wurde gefunden, dass es in eosinophil-defizienten Tieren zu starken Veränderungen in den Immunstrukturen des Darmes kommt^{141, 142}. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass Eosinophile nur indirekt dafür verantwortlich sind. Sie werden benötigt für das Überleben der Plasmazellen und damit für die Aufrechterhaltung der normalen IgA-Antikörpertiter. Die Veränderungen, die in den Immunkompartimenten der eosinophil-defizienten Tiere gesehen werden, scheinen aber hauptsächlich die Folge einer veränderten Mikroflora zu sein.

4.1 Der Einfluss der Mikroflora auf die Entwicklung und die Funktion des mukosalen Immunsystems

Peyer Plaques sind der Ort, wo über dendritische Zellen direkter Zugang zu Antigenen des Darmlumens besteht und somit die Zellen des Immunsystems aktiviert werden. In eosinophil-defizienten Tieren findet eine Keimzentrumsreaktion statt, aber sie verläuft anders als in den Wildtyp-Tieren. Anstatt dass B-Zellen einen Klassenwechsel nach IgA durchführen, wurden hauptsächlich IgG1⁺ B-Zellen gefunden. Dieser Befund war ein erster Hinweis darauf, dass es in der Abwesenheit von Eosinophilen zu einer veränderten Aktivierung des Immunsystems kommen könnte. Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikroflora, die sowohl in der Arbeit von Chu et al. als auch in der Arbeit von Jung et al. beschrieben wurden, könnten somit für die beobachteten Effekte verantwortlich sein.

Die Besiedlung des Darmes durch die Mikroflora während und nach der Geburt ist entscheidend für die postnatale Entwicklung der Darmimmunität. Die Studien von keimfreien Mäusen ergaben, dass in Abwesenheit der Darmflora mit zahlreichen immunologischen Defekten, wie schlecht ausgebildeten Peyer Plaques sowie stark verminderten Populationen von IgA⁺ Plasmazellen und CD4⁺ T-Lymphozyten in der Lamina propria einhergeht^{147, 148}. Es

4. Diskussion

wurde gefunden, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms einen direkten Einfluss auf das Repertoire der IgA-Antikörper hat^{104, 149}. Auch der Aufbau des T-Zellkompartiments ist von der Zusammensetzung der Mikroflora abhängig. So wurde gezeigt, dass unterschiedliche Populationen der symbiotischen Mikroflora die Populationen von CD4⁺ FoxP3⁺ Tregs, Th17-Zellen und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten beeinflussen^{128, 131, 150}.

4.2. Der Einfluss des IgA auf das Mikrobiom

Andererseits haben IgA-Antikörper, die von Plasmazellen in der Lamina propria gebildet und durch das Darmepithel ins Darmlumen transportiert werden, einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms^{149, 151, 152}. Besonders deutlich zeigte sich die Bedeutung dieser Immunglobulin-Subklasse in AID-defizienten Mäusen, die aufgrund des fehlenden Klassenwechsels, kein IgA mehr bilden können. Diese Tiere zeigten eine ungewöhnlich hohe Expansion der SFB-Mikroorganismen¹⁵². Besonders die Studien der AID^{G23S} Mäuse, deren B-Zellen einen normalen IgA-Klassenwechsel, aber keine somatische Hypermutationen vollführen können, belegten, dass das IgA-Repertoire eine wichtige Rolle in der Zusammensetzung des Mikrobioms spielt¹³⁰.

Unabhängige Studien haben gezeigt, dass Eosinophile für die Aufrechterhaltung des normalen IgA-Antikörperspiegels benötigt werden. Nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der Lamina propria werden eosinophile Granulozyten für das Überleben der Plasmazellen benötigt^{140, 141}. In der Abwesenheit von Eosinophilen ist somit die IgA⁺ Plasmazellpopulation in der Lamina propria deutlich reduziert^{141, 142}. Neben den Δ dblGATA-1 und PHIL-Mäusen wurde dies ebenfalls bei Mausstämmen wie CCR3^{-/-} und CCL11/CCL24^{-/-} (Eotaxin-1/Eotaxin-2 Doppelknockout) gefunden¹⁴², die eine verminderte Einwanderung von Eosinophilen in die Lamina propria aufweisen^{138, 139}.

Der IgA-Antikörpertiter in eosinophil-defizienten Tieren ist nicht nur im Serum, sondern auch in Fäzes und Darmlumen deutlich verringert. Dies könnte der Grund dafür sein, dass es in der Abwesenheit von Eosinophilen zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora kommt. Sowohl die Arbeit von Chu et al. als auch die Arbeit von Jung et al. beschreiben eine veränderte Mikroflora, aber beiden Arbeiten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen^{141, 142}. Während die Studie von Jung et al. erhöhte Populationen von Mikroorganismen der Firmicutes-Gattung und eine verringertes Vorkommen der Bacteroidetes in den eosinophil-defizienten Δ dblGATA-1 Mäusen im Vergleich zu den Wildtyptieren ergab¹⁴¹, zeigte sich bei

4. Diskussion

Chu et al die umgekehrte Situation¹⁴². Die unterschiedlichen Ergebnisse der Mikroflora-Untersuchungen können durch mehrere Faktoren erklärt werden. Allein, dass die Mäuse für diese Studien aus verschiedenen Zuchteinrichtungen bezogen wurden, könnte die Ursache für die unterschiedliche Zusammensetzung des Mikrobioms in den untersuchten Tieren sein. Hinzu kommt, dass in den beiden Gruppen die Mikroflora aus unterschiedlichen Darmbereichen untersucht wurde. In der Arbeit von Jung et al wurde die Darmflora nach Spülung des Dünndarmes analysiert, in der Arbeit von Chu et al. die Fäzes untersucht¹⁴¹, welche die Mikroflora-Zusammensetzung im Dickdarm widerspiegelt. Außerdem könnte auch die Verwendung unterschiedlicher Messmethoden (*deep sequencing*¹⁴² bzw. qRT-PCR¹⁴¹) einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen unter den gleichen Bedingungen wie bei Chu et al. durchgeführt und seine Ergebnisse konnten bestätigt werden.

4.3. Einfluss der Vergesellschaftung auf das mukosale Immunsystem

Die Vergesellschaftung der zu untersuchenden Tiere, die zu einer Angleichung der Darmflora führt, ist ein sehr wichtiger Aspekt bei der Untersuchung der immunologischen Prozesse, insbesondere für die intestinale Immunität¹⁵³. Die Vergesellschaftung der Wildtyp BALB/c Tiere mit den eosinophil-defizienten Δ dblGATA-1 Mäusen führte zu einer Normalisierung vieler Veränderungen, die in der Abwesenheit von Eosinophilen gefunden wurden. Auch die Untersuchung von PHIL-Mäusen, die zusammen mit Wildtyp-Wurfgeschwistern aufgewachsen sind, zeigte deutlich, dass die Angleichung der Mikroflora ausreichend ist das mukosale Immunsystem zu normalisieren.

Der direkte Einfluss der Mikroflora auf die TFH-Zellen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Unsere Daten sprechen dafür, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms sowohl für die Populationsgröße als auch für die reguläre Funktion der TFH-Zellen wichtig ist. In der Literatur sind zwei Zellpopulationen als Vorläufer für die TFH-Zellen der Peyer Plaques beschrieben: die $CD4^+$ FoxP3⁺ Tregs¹¹⁰ und die $CD4^+$ ROR γ t⁺ Th17-Zellen¹¹². Unsere Daten zeigen, dass die Population der CXCR5⁺ PD-1⁺ TFH-Zellen in den Peyer Plaques der nicht vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Mäuse deutlich reduziert ist (Abbildung 19A), während die beiden als TFH-Vorläufer postulierten Zellpopulationen in den Peyer Plaques dieser Tiere nicht beeinflusst sind (Abbildung 19A und B). Allerdings wurde in der Lamina propria dieser Tiere gleichzeitig Reduktion der $CD4^+$ ROR γ t⁺ Th17-Zellen festgestellt (Abbildung 11C). Die Vergesellschaftung stellt die Population der TFH-Zellen in

4. Diskussion

den Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Mäuse wieder her und verändert das Zytokin-Produktionsprofil, was sich in dem verstärkten Klassenwechsel zu IgA in den Keimzentrums-B-Zellen resultiert (Abbildung 34). Die Angleichung der Mikroflora durch die Vergesellschaftung stellt die Population der Th17-Zellen in der Lamina propria (Abbildung 34B), sowie die Population der TFH-Zellen in den Peyer Plaques wieder her. Zusammenfassend könnten diese Daten bedeuten, dass die Mikroflora für die Differenzierung der TFH-Zellen aus den Vorläuferpopulationen, während die Ausbildung der Vorläuferzellpopulationen nicht von der Darmflora abhängig ist. Alternativ könnten die Th17-Lymphozyten der Lamina propria das größte Reservoir der TFH-Vorläufer darstellen, welches durch die Darmflora gesteuert wird. Der mögliche Einfluss der Mikroflora auf T-Lymphozytenpopulationen könnte durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Darmflorametaboliten wie SCFAs (*short chain fatty acids*) in den BALB/c und Δ dblGATA-1 erklärt werden^{154, 155}.

Die Veränderungen an den TFH-Zellen durch die geänderte Zusammensetzung der Darmmikroflora bringen die Keimzentrums-B-Zellen der Peyer Plaques den Klassenwechsel zu IgG1 statt zu IgA durchzuführen. Unklar in diesem Zusammenhang bleibt, ob die Aktivierung der TFH-Zellen direkt über die Mikroflora erfolgt, oder bestimmte antigenpräsentierende Zellen in diesen Vorgang involviert sind.

Des Weiteren bleibt offen, ob die TFH-Zellen der in der Abwesenheit der bestimmten bakteriellen Stimuli generell einen Th2-Phänotyp aufweisen sowie verstärkt IL-4 und weniger TGF- β produzieren oder es eine bestimmte Bakterienspezies in der Darmflora der nicht vergesellschafteten Mäusen gibt, welche den IgG1-Klassenwechsel aktiv unterstützt. Eine Arbeit der Gruppe von S. Fagarasan zeigt, dass die Übertragung der Mikroflora aus den Tieren nach der Kolitis-Induktion in die keimfreien Mäuse einen verstärkten IgG1-Klassenwechsel in den Peyer Plaques bewirkt¹⁵⁶. Obwohl die Δ dblGATA-1 Mäuse keine Kolitis entwickeln, sollte der Klassenwechsel in den Peyer Plaques der keimfreien Mäuse nach deren Kolonisierung mit der veränderten Darmflora der Δ dblGATA-1 Tiere untersucht werden.

Ebenfalls die Population TCR β^+ CD8 $\alpha\beta^+$ IELs (Abbildung 36) konnte durch die Vergesellschaftung wiederhergestellt werden. In der Literatur ist die Reduktion der IELs in den NOD2^{-/-} Mäusen beschrieben¹⁵⁷. Der NOD2-Aktivierung durch die Mikroflora ist wichtig für die Aufrechterhaltung der TCR $\gamma\delta^+$, TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ und TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$ IEL-Populationen. Unsere Untersuchungen ergaben einen selektiven Verlust der TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$

4. Diskussion

IELs. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ist in der Literatur eine Erhöhung der TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$ IEL-Population in den keimfreien Mäusen nach der SFB-Monokolonisierung beschrieben worden¹⁵⁸.

4.4 Direkter Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf das intestinale Immunsystem

Die Untersuchungen der vergesellschafteten Δ dblGATA-1 Tiere ermöglichten es uns zu zeigen, ob Eosinophile eine direkte Funktion in der Entwicklung der Darmimmunkompartimente haben. Die meisten Veränderungen, die in eosinophil-defizienten Tieren beobachtet wurden, konnten durch Vergesellschaftung mit Wildtyp-Tieren normalisiert werden. Dies war aber nicht so für die Entwicklung der Plasmazellen in der Lamina propria. IgA⁺ Plasmazellen der Δ dblGATA-1 Mäuse zeigten eine höhere Expression von MHCII und B220 und gleichzeitig eine niedrigere IgA-Sekretion auf (Abbildung 33B und C), was darauf hindeutet, dass die Population der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse einen weniger reifen, Plasmablast-ähnlichen Phänotyp als die entsprechende Zellpopulation der BALB/c Tiere besitzt^{159, 160}. Diese Befunde sind ein weiterer Hinweis darauf, dass eosinophile Granulozyten in der Lamina propria, ähnlich wie im Knochenmark¹⁴⁰, nicht nur für das Überleben von Plasmazellen benötigt werden, sondern auch entscheidend für die Ausreifung der Plasmazellen sind.

Trotz Abwesenheit von Eosinophilen kommt es nach Vergesellschaftung zu einem Anstieg der IgA-Antikörpertiter und man fragt sich, wie das zu erklären ist. Die Untersuchungen zeigten, dass der Austausch der Mikroflora zu einer Veränderung der Darmflora in Δ dblGATA-1 Tieren führt und dies könnte der Grund für die Aktivierung des Darmimmunsystems sein. Die Vergesellschaftung induziert eine verstärkte Produktion der IgA⁺ Zellen in den Peyer Plaques sowie eine rapide Populationsvergrößerung von IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria (Abbildung 33A). Dies könnte den schnellen Anstieg des IgA-Antikörpertiters zwei Wochen nach Vergesellschaftung erklären. In der Abwesenheit von Eosinophilen würde man nicht erwarten, dass die neugenerierten Plasmazellen für längere Zeit überleben können. Durch Markierung der neu-entstandenen IgA⁺ Plasmablasten mit EdU (5-Ethynyl-2-Deoxyuridin) sollte dies überprüft werden.

In PHIL-Mäusen, die seit Geburt mit ihren Wurfgeschwistern zusammen sitzen, konnten diese hohen Zahlen von Plasmazellen nicht gefunden werden. Wie man erwarten würde, haben es in

4. Diskussion

der Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten nur wenige Plasmablasten geschafft, zu reifen Plasmazellen auszudifferenzieren und eine normale IgA-Sekretion zu zeigen.

Bisher ist wenig über die Funktion der Eosinophilen in der Organentwicklung bekannt¹³⁷. Eosinophile Granulozyten besiedeln den Dünndarm noch während der pränatalen Entwicklung vor den Lymphozyten und der Darmflorakolonisierung¹³⁹.

Die Untersuchungen beider eosinophil-defizienten Tierstämme zeigten, dass die Größe bzw. das Gewicht der Peyer Plaques in diesen Tieren gegenüber den entsprechenden Wildtypkontrolltieren deutlich reduziert ist (Abbildung 14A und Abbildung 46A). Auch andere eosinophil-defiziente Mausstämme weisen diesen Phänotyp auf¹⁴². Unsere Analyse der drei Wochen alten BALB/c und Δ dblGATA-1 Tiere zeigte, dass es zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede in der PP-Größe vorliegen (Abbildung 21), was auf eine normale prä- sowie neonatale Entwicklung von Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse hinweist. Dies könnte bedeuten, dass die Eosinophilen trotz ihres Vorhandenseins keinen Einfluss auf die frühe PP-Entwicklung ausüben. Alternativ wäre es denkbar, dass der frühe Einfluss der eosinophilen Granulozyten sich erst später, ab der vierten Lebenswoche, manifestiert.

Zwei Zelltypen, die $CD45^- Vcam-1^+ Icam-1^+ LTo$ -Stromazellen³⁰ und die $CD3^- ROR\gamma t^+ CD4^+ c-Kit^+ LTi$ -Zellen³³, sind als entscheidende Zellpopulationen für die reguläre Formation der PP-Anlagen während der pränatalen Entwicklung beschrieben worden. Die Analyse der $CD3^- ROR\gamma t^+ CD4^+ LTi$ -Zellen ergab, dass diese Zellpopulation in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse nicht beeinträchtigt zu sein scheint (Abbildung 23B). Dieser Befund widerspricht den zuvor publizierten Ergebnissen, wo die Autoren eine signifikante Verringerung der $CD3^- ROR\gamma t^+ ILC3$ -Zellpopulation beschreiben¹⁴². Der $IL-7R\alpha$ und das Enzym Arginase-1 (Arg-1) wurden als wichtig für die Funktion und Reifung der LTi-Zellen beschrieben^{38, 161}. Die Untersuchung der Expression von diesen sowie anderen LTi-wichtigen Molekülen wie ROR γt und c-Kit zeigte keine Veränderungen (Abbildung 23C).

Kinetik der PP-Entwicklung zeigte, dass ab dem Alter von vier bis fünf Wochen die Peyer Plaques der BALB/c Mäuse einen rapiden Wachstum erfahren, während die Größe von Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere sich ab dem Alter von drei Wochen kaum verändert (Abbildung 21). Die verringerte Größe der Peyer Plaques ließ sich durch die Vergesellschaftung BALB/c und Δ dblGATA-1 Tiere in dem kritischen Alter von drei Wochen nicht umkehren (Abbildung 42B), was unwahrscheinlich macht, dass die veränderte Mikroflora für die verringerte PP-Größe verantwortlich ist. Der Zeitraum ab der dritten

4. Diskussion

Lebenswoche ist für die Darmimmunität auch wichtig, weil junge Mäuse ab ungefähr diesem Zeitpunkt von der Milch zu einer Festnahrung übergehen. Gleichzeitig findet eine verstärkte Kolonisierung des Darmes mit der Mikroflora statt^{162, 163}. Parallel beobachtet man den Anstieg des löslichen IgA im Darm der Jungtiere^{104, 164}.

In der Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PP-Größenentwicklung (Abbildung 21) beobachten wir eine Reduktion der Population von CD45⁻ Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Stromazellen in den Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere in dem Alter von sechs Wochen, während bei den drei Wochen alten Tieren keine Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 24). Genauso wie die verringerte Größe der Peyer Plaques ließ sich die Population der LTo-Zellen durch die Angleichung der Mikroflora nicht wiederherstellen (Abbildung 42). Der fehlende Einfluss der Darmflora auf die Größenverringering der Peyer Plaques während der Eosinophil-Defizienz wurde durch die entsprechenden Analysen der PHIL-Mäuse bestätigt. Obwohl diese Tiere über eine normale Mikroflora verfügen (Abbildung 43A), ist die Verringerung der PP-Größe gegenüber den Wurfgeschwistern vom Wildtyp sehr stark ausgeprägt (Abbildung 46A). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die verringerte PP-Größe sowie beeinträchtigte Population von CD45⁻ Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Stromazellen in den Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere sich nicht auf der veränderten Mikroflora beruhen, sondern eosinophil-abhängig sind. In den zusätzlichen Experimente sollte nicht nur die Populationsgröße der Vcam-1⁺ Icam-1⁺ LTo-Stromazellen untersucht werden. Mittels der qRT-PCR könnte die Analyse der Expression von IL-7 und CXCL12 durchgeführt werden, was eine Antwort über funktionelle Eigenschaften dieser Zellen in der Abwesenheit der Eosinophilen geben wird. Außerdem sollte der genaue Mechanismus des Eosinophil-Einflusses auf die LTo-Stromazellpopulation aufgeklärt werden.

Um den direkten Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf das Wachstum der Peyer Plaques in den BALB/c Mäusen ab der vierten Lebenswoche zu untersuchen, wurden drei Wochen alte Tiere zwei Wochen lang mit einem anti-Siglec-F Antikörper behandelt (Abbildung 25). Dabei haben wir keine Unterschiede in der PP-Größe zwischen den anti-Siglec-F-behandelten Mäusen und den Tieren der Kontrollgruppe festgestellt (Abbildung 26), Dies könnte mehrere mögliche Erklärungen haben.

In der Literatur wird diskutiert, ob die Siglec-F-Behandlung zum Verlust der Eosinophilen¹⁶⁵ oder zu einem simplen Verstecken der Siglec-F-Epitope¹⁶⁶ führt, wodurch die Eosinophilen für die Kontrollexperimente nicht als Siglec-F⁺ Zellen detektiert werden können. Unsere

4. Diskussion

Daten zeigen, dass die Siglec-F⁺ CD11b⁺ eosinophile Granulozyten bereits nach einer Woche Behandlung nicht mehr detektierbar sind (Abbildung 25). Eine alternative Auswertung dieser Daten nach den SSC^{hi} MHCII⁻ Gr-1^{lo} CD11b⁺ Zellen bestätigte die Richtigkeit der Annahme, dass die Bluteosinophilen durch die Behandlung mit dem anti-Siglec-F-Antikörper vollständig depletiert werden.

In der Lamina propria dagegen konnten wir keinen vollständigen Verlust der Eosinophilen auch nach zwei wöchiger Behandlung erreichen (Abbildung 25). Rund ein Drittel der MHCII⁻ Gr-1^{lo} Siglec-F⁺ CD11b⁺ Eosinophilen wurden in der Lamina propria nach der Depletion vorgefunden. Im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe zeigen diese Zellen verringerte Siglec-F-Expression (Abbildung 25). Unklar bleibt, ob es sich bei diesen Zellen um normale reife eosinophile Granulozyten, bei welchen ein Teil der Siglec-F Moleküle durch die vorangegangene Siglec-F-Behandlung maskiert sind, oder um Eosinophil-Vorläuferzellen, welche in der Abwesenheit der Eosinophilen eine Gelegenheit erhalten in die Lamina propria einzuwandern, handelt. Um diese Zellen eindeutig zu identifizieren, sind zusätzliche Untersuchungen mittels der Zytozentrifugation und qRT-PCR erforderlich.

Andererseits könnte der Einfluss der Eosinophilen auf die PP-Größe vor dem Alter von drei Wochen erfolgen und sich erst später entfalten. Die Gruppe der Kontrolltiere wies ebenfalls eine verringerte PP-Größe gegenüber den unbehandelten BALB/c Mäusen des gleichen Alters auf (Abbildung 26). Dieser Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass die eosinophilen Granulozyten den FcγII-Rezeptor exprimieren, welcher den IgG2a-Kontrollantikörper bindet¹⁶⁷. Die Bindung des IgG2a-Antikörpers an den Rezeptor könnte unterschiedliche Effekte, wie z.B. Degranulierung, in den Eosinophilen auslösen, was einen Einfluss auf die Entwicklung der Peyer Plaques haben könnte.

4.5 Der Einfluss der Mikroflora auf eosinophile Granulozyten

Die Entwicklung der PP-Größe und der LTo-Zellpopulation korrelieren mit dem Zeitpunkt der verstärkten Mikroflora-Kolonisierung^{162, 163} und dem Anstieg des intestinalen IgA^{104, 164}. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Eosinophilen viele Rezeptoren der TLR-Familie exprimieren^{141, 168, 169}. Zusätzlich exprimieren die Wildtyp-Eosinophilen der Lamina propria größere Mengen der APRIL, IL-6, TGF-β und BAFF mRNA, als die Lamina propria Eosinophilen ohne intakte TLR-Signalwege (MyD88/TRIF^{-/-})¹⁴¹. Ebenfalls zeigte eine *in vitro* Aktivierung der Wildtyp-Eosinophilen mit *caecum bacteria antigen* (CBA) einen Effekt auf

4. Diskussion

ihre Funktion¹⁴¹. Diese Daten zeigen, dass eosinophile Granulozyten durch die Mikroflora über die Rezeptoren der TLR-Familie aktiviert werden können, was sich auf die verstärkte Produktion der Zytokine auswirken kann.

4.6 Der Einfluss der IgA-Antikörper auf eosinophile Granulozyten

Eine andere mögliche Aktivierung der Eosinophilen könnte über IgA verlaufen. Für das menschliche System ist es gezeigt, dass das Überleben und Zytokin-Expression der Knochenmark-Eosinophilen mittels des löslichen IgA über den Fc α -Rezeptor I (CD86) erfolgen kann¹⁷⁰. Gleichzeitig ist es bekannt, dass die murinen eosinophilen Granulozyten das Fc α RI-Molekül nicht exprimieren. Unsere vorläufigen Daten zeigen, dass die murinen Lamina propria Eosinophilen den Fc α / μ -Rezeptor exprimieren, mit der Fähigkeit sowohl das IgA, als auch IgM zu binden¹⁷¹. Die Antwort auf die Frage, ob in der Maus die Eosinophilen über den Fc α / μ Rezeptor auf eine analoge Weise durch das IgA aktiviert werden können, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.7 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen den komplexen Zusammenhang zwischen dem intestinalen Immunsystem und dem Mikrobiom. Die Untersuchungen zeigen, wie das eingestellte Gleichgewicht schon durch geringfügige Einflüsse massiv verschoben werden kann. Die Vergesellschaftung von eosinophil-defizienten Tieren mit Wildtyp-Tieren ermöglichte das vielschichtige Zusammenspiel zwischen eosinophilen Granulozyten, der Mikroflora und den IgA Antikörpern besser zu verstehen. Die Daten sprechen dafür, dass eosinophile Granulozyten benötigt werden ein IgA-Antikörperrepertoire aufzubauen, das die Bildung einer „ausgeglichener“ Mikroflora unterstützt, die zur normalen Entwicklung des mukosalen Immunsystems führt. In Abwesenheit von Eosinophilen kann dies nur durch Vergesellschaftung mit Wildtyp-Tieren und einer damit einhergehenden Normalisierung des Mikrobioms erreicht werden. Es wird von großer Bedeutung sein, herauszufinden, welche Bakterienstämme für die normale Aktivierung des Darmimmunsystems, das heißt für die übliche Generierung von IgA⁺ Plasmazellen in den Peyer Plaques verantwortlich sind. Dies könnte auch von Bedeutung für das bessere Verständnis von Entzündungskrankheiten und anderen Störungen der Immunregulation im Verdauungstrakt sein.

5. Zusammenfassung

Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass eosinophile Granulozyten eine wichtige Rolle im Aufbau und der Funktion der Immunkompartimente des Darmes haben. Über das komplexe Zusammenspiel von Eosinophilen, der Mikroflora des Darmes, den IgA Antikörpern und den Immunzellen ist aber bisher nur sehr wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Beitrag der eosinophilen zu der gegenseitigen Regulierung von Immunsystem und Darmflora untersucht werden.

Ein Vergleich der eosinophil-defizienten Mausstämmen Δ dblGATA-1 und PHIL mit Wildtyptieren zeigte zahlreiche Veränderungen im Immunsystem des Darms. Diese Arbeit konnte zeigen, dass Eosinophilen aber nur indirekt für diese Unterschiede verantwortlich sind, da sich durch die Vergesellschaftung von eosinophil-defizienten und Wildtyptieren und somit der Angleichung der Mikroflora die meisten der Unterschiede beheben ließen. Vor allem die Generierung von IgA⁺ B-Zellen in den Peyer Plaques sowie die Populationen von T-Lymphozyten sowohl in den Peyer Plaques, als auch in der Lamina propria und intraepitheliale Schicht wurden durch die Vergesellschaftung wiederhergestellt. Dies bestätigt die primäre Rolle der Mikroflora bei den beobachteten Veränderungen.

Frühere Studien zeigen, dass eosinophile Granulozyten eine wichtige Rolle für das Überleben der IgA⁺ Plasmazellen in der Lamina propria und im Knochenmark haben. In Abwesenheit der Eosinophilen fällt der IgA-Spiegel im Darm und dies wirkt sich dann auf die Darmflora aus. Veränderungen im Mikrobiom sollten zu einer unterschiedlichen Aktivierung und Funktion der Immunzellen führen. Dies würde die veränderte Zytokinexpression der TFH-Zellen in den Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Tiere bewirken und wäre somit eine Erklärung für den präferentiellen Klassenwechsel nach IgG1 in der Abwesenheit von Eosinophilen.

Wie schon früher gezeigt wurde, sind Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Mausstämme Δ dblGATA-1 und PHIL deutlich kleiner als in den entsprechenden Wildtyptieren, weisen aber eine normale Entwicklung der T und B-Zell Follikel auf und auch die Keimzentrumsstrukturen scheint unverändert zu sein. Bereits während der pränatalen Entwicklung des Organismus, also zu einem Zeitpunkt, wenn die lymphatischen Strukturen noch nicht ausgebildet sind, besiedeln eosinophile Granulozyten den Dünndarm in sehr

5. Zusammenfassung

großen Zahlen. Der Gedanke, dass Eosinophilen eine Rolle bei der Ausbildung der Immunstrukturen im Darm eine Rolle spielen könnten ist daher naheliegend.

Eine Kinetik zur Entwicklung der Peyer Plaques zeigte aber, dass der PP-Größenunterschied erst ab dem Alter von vier Wochen messbar wurde, wenn der Darm durch Mikroflora kolonisiert und IgA-Produktion induziert wurde. Darüber hinaus war die PP-Größe auch in PHIL-Mäusen, die von Wildtyp-Müttern geboren wurden und mit Wildtyp-Wurfgeschwistern zusammen aufgewachsen sind, beeinträchtigt. Es spricht dafür, dass diese Entwicklungsstörung direkt auf das Fehlen von Eosinophilen zurückzuführen ist. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen, ob es einen direkten Einfluss der Eosinophilen auf die für die PP-Entwicklung wichtigen LTo-Zellen gibt. Veränderungen in der Stromazell-Retikulum könnten ein Hinweis für veränderte Interaktion zwischen den LTi- und den LTo-Zellen auftreten und somit für gestörte Entwicklung von Peyer Plaques der eosinophil-defizienten Mäuse.

Diese Arbeit bestätigt die entscheidende Rolle der Darmmikroflora für die reguläre Entwicklung und die Funktion der Immunstrukturen im Darm. Sie zeigt aber auch wie wichtig Eosinophile in diesem Prozess sind. Sie werden benötigt, um das Gleichgewicht zwischen dem Mikrobiom und dem Immunsystem aufrecht zu halten. In der Abwesenheit von Eosinophilen verändert sich die Mikroflora dahingehend, dass die normale Funktion der Peyer Plaques, die Bildung von IgA⁺ Plasmazellen, deutlich vermindert ist. Da eosinophile Granulozyten auch für das Überleben der Plasmazellen benötigt werden, kommt es zu einer starken Reduzierung des IgA-Spiegels, was sich auf die Mikroflora auswirkt.

Mit diesen Experimenten konnte ein Kreislauf von gegenseitigen Wechselwirkungen aufgezeigt werden, der für die Homöostase des Immunsystems ausschlaggebend ist und verhindert, dass es zu ungewollten Entzündungsprozessen im Darmtrakt kommt.

6. Summary

Recent studies suggest the important role of eosinophils in the organization and function of gut immunity. However, little is known about the complex interactions between eosinophils, microbiota, IgA antibodies and other immune cells in the gut. The aim of this work was to dissect the contribution of eosinophils to the mutual regulation of immune system and microbiota.

Numerous alterations in the gut immune cell composition were previously reported in the eosinophil-deficient mouse strains, Δ dblGATA-1 and PHIL, when compared with the corresponding wild type animals. This work showed that eosinophils are responsible for the differences in cell populations indirectly, since the co-housing of eosinophil-deficient and wild type mice and subsequent equilibration of intestinal microbiota restored most of the parameters. Especially the generation of IgA⁺ B cells in peyer's patches as well as T cell populations in both peyer's patches, lamina propria and intraepithelial layer of eosinophil-deficient mice were restored after cohousing. This confirms the primary role of microbiota for observed alterations.

Recent studies show the crucial contribution of eosinophils to the survival of plasma cells in lamina propria and bone marrow. In lamina propria the level of intestinal IgA sinks in the absence of eosinophils and affects thereby the microbiota. The microbiota changes may induce the different activation and function of the gut immune cells. This would cause the altered cytokine expression of the TFH cells in the peyer's patches of eosinophil-deficient mice and could be therefore an explanation for the preferential class switch to IgG1 in the absence of eosinophils.

As recently shown, peyer's patches of the eosinophil-deficient mouse strains, Δ dblGATA-1 and PHIL, are clearly smaller than in the corresponding wild type, but PPs exhibit a normal development of the T and B cell zones and the formation of the germinal centres seems to be not affected. The eosinophils colonise the small intestine in large numbers during the prenatal development of the gut already, when the lymphatic structures are not formed. Therefore, it is plausible that the eosinophils may contribute to the development of PPs.

Analysis of kinetic of PP development revealed that difference in the size was evident starting from four weeks after birth, when murine gut get colonized with microbiota and IgA is induced. Moreover, the peyer's patches size is affected in the PHIL mice too, which were

6. Summary

born from the wild type mothers and are grown up with their littermates together. It argues that this disruption can be explained by the direct effect of eosinophils absence. Further investigations are required to show, whether there is a direct effect of eosinophils on the LTo stromal cells, which are important for the peyer's patches development. The changes in the stromal cell reticulum could be an indication for altered interaction between LTi and LTo cells in therefore for disturbed development of the peyer's patches of eosinophil-deficient mice.

This work confirms the fundamental role of gut microbiota for the regular development and function of the gut immune structures. However, it shows the importance of the eosinophils in this process too. The eosinophils are required for keeping the balance between the microbiota and the gut immune system. In the absence of eosinophils the changes of microbiota lead to reduction of the normal peyer's patches function, the generation of IgA⁺ cells. Since eosinophils are required for the plasma cell survival as well, it all resulted in reduced IgA levels and may potentially modify microbiota composition.

These results suggest circle of reciprocal interactions, which are crucial for the gut immunity homeostasis and inhibits the unwanted inflammatory processes in the intestinal tract.

7. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

7. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

Chu VT, Beller A, Nguyen NT, Steihauser G, Berek C. The long-term survival of plasma cells. Scand J Immunol. 2011 Jun

Chu VT, Beller A, Rausch S, Strandmark J, Zänker M, Arbach O, Kruglov A, Berek C. Eosinophils Promote Generation and Maintenance of Immunoglobulin-A-Expressing Plasma Cells and Contribute to Gut Immune Homeostasis, Immunity, Volume 40, Issue 4, 17 April 2014.

8. Lebenslauf

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version

aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomischer Aufbau des Darmtraktes einer Maus.	8
Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Peyer Plaque.	9
Abbildung 3: Follikuläre Struktur einer Peyer Plaque.	10
Abbildung 4: Schematischer Aufbau einer Darmwand.....	11
Abbildung 5: Molekulare Vorgänge beim IgA-Klassenwechsel	19
Abbildung 6: T-Zell-unabhängige Generierung von IgA-Plasmazellen in der Lamina propria des Dünndarms	22
Abbildung 7: Die T-Zell-abhängige Generierung von IgA ⁺ Plasmazellen im PPs.....	24
Abbildung 8: Typisches Eingrenzungsschema bei der durchflusszytometrischen Analyse. ...	42
Abbildung 9: Genotypisierung der PHIL-Mäuse.	44
Abbildung 10: Veränderungen in den IgA ⁺ Plasmazellen der Lamina propria von Δ dblGATA-1 Mäusen.	53
Abbildung 11: Veränderungen in den Populationen der T-Lymphozyten in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Tiere.	55
Abbildung 12: Die Population von CD11c ⁺ CD103 ⁺ MHCII Zellen ist in der Lamina propria der Δ dblGATA-1 Mäuse verringert.	57
Abbildung 13: Verringerte Population der TCR β ⁺ CD8 $\alpha\beta$ ⁺ IELs im Dünndarm der Δ dblGATA-1 Mäuse.	59
Abbildung 14: In der Abwesenheit der eosinophilen Granulozyten ist die Größe der Peyer Plaques verringert.....	61
Abbildung 15: Das Verhältnis zwischen den B- und T-Lymphozyten ist den Peyer Plaques der dbIGATA-1 Tiere verschoben.....	62
Abbildung 16: Die Subpopulation der Keimzentrums-B-Zellen ist in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäusen unverändert.	64
Abbildung 17: Die Keimzentrums-B-Zellen in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse wechseln ihre Immunglobulinklasse vorrangig zu IgG1 und nicht zu IgA.....	65
Abbildung 18: Die IgA ⁺ Keimzentrums-B-Zellen (A) in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse proliferieren weniger als in den Wildtyptieren.....	67
Abbildung 19: Die Population der T-Lymphozyten ist in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse verändert.	69
Abbildung 20: Die Populationen von CD11c ⁺ Zellen sind in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere verändert.	70

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Deutliche Differenzen in der PP-Größe zwischen den BALB/c und den Δ dblGATA-1 Mäusen sind erst ab dem Alter von fünf Wochen sichtbar.	73
Abbildung 22: Die Einwanderung von Lymphozyten in die Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse ist unbeeinträchtigt.	75
Abbildung 23: Die Population von $CD3^- ROR\gamma t^+ CD4^+$ LTI-Zellen ist in den Peyer Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse unverändert.	77
Abbildung 24: Die Population der LTo-Stromazellen ist in den Peyer Plaques der sechs Wochen alten Δ dblGATA-1 Tiere verringert.	79
Abbildung 25: Eosinophil-Depletion im Blut und im Gewebe der LP	81
Abbildung 26: Die Veränderung des PP-Gewichtes der BALB/c Mäuse durch die Depletion der Eosinophilen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht messbar.	82
Abbildung 27: Die Eosinophil-Depletion bewirkt keine Veränderungen im Klassenwechsel der Keimzentrums-B-Zellen.....	83
Abbildung 28: Die Depletion der eosinophilen Granulozyten über zwei Wochen zeichnet die Veränderungen an den IgA^+ Plasmazellen der Lamina propria ab.	84
Abbildung 29: Depletion der Eosinophilen verlangsamt den Aufbau des IgA -Titers in Serum und Fäzes.....	85
Abbildung 30: Die unterschiedliche Zusammensetzung der Mikroflora in den BALB/c und Δ dblGATA-1 Tieren.	88
Abbildung 31: Die Vergesellschaftung der Tiere führt zur gleichen Zusammensetzung der Mikroflora von BALB/c und Δ dblGATA-1 Mäuse.....	89
Abbildung 32: Die Vergesellschaftung der Δ dblGATA-1 Mäuse mit den BALB/c Tieren führt zur Erhöhung des löslichen IgA in Fäzes der eosinophil-defizienten Tiere.....	90
Abbildung 33: Die Vergesellschaftung stellt die Population von LP IgA^+ Plasmazellen der Δ dblGATA-1 Mäuse wiederher.	92
Abbildung 34: Die T-Lymphozytenpopulationen werden durch den Ausgleich der Mikroflora wiederhergestellt.	94
Abbildung 35: Wiederherstellung der $CD11c^+$ Zellpopulationen in der Lamina propria von Δ dblGATA-1 Mäusen wird durch die Vergesellschaftung mit BALB/c Tieren realisiert.....	95
Abbildung 36: Nach dem Mikrofloraausgleich der Δ dblGATA-1 Mäuse stimmen die Populationen der IELs mit denen der Wildtypiere überein.....	97
Abbildung 37: Die Verschiebung des Verhältnisses zwischen den B- und T-Lymphozyten bleibt in den Peyer Plaques der dblGATA-1 Tiere nach der Vergesellschaftung erhalten.....	99

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38: Der Mikrofloorausgleich durch die Vergesellschaftung stellt in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Mäuse den IgA-Klassenwechsel wieder her.....	100
Abbildung 39: Die Vergesellschaftung verändert das Verhältnis in der Produktion von TGF- β und IL-4 in den TFH-Zellen der Δ dblGATA-1 Mäuse	102
Abbildung 40: Der Austausch der Mikroflora induziert die Entwicklung der CD103+ nonTreg-Population.....	103
Abbildung 41 Trotz der Vergesellschaftung treten veränderte Populationen von CD11c ⁺ Zellen in den Peyer-Plaques der Δ dblGATA-1 Tiere auf.	104
Abbildung 42: Die Größe der Peyer-Plaques der eosinophil-defizienten Tiere ist durch die Vergesellschaftung nicht beeinflusst.....	106
Abbildung 43: Zwischen den PHIL- und C57BL/6-Mäusen liegen kaum Mikrofloraunterschiede vor.....	107
Abbildung 44: Die Population von IgA ⁺ Plasmazellen ist in der Lamina propria der PHIL-Mäuse reduziert.	109
Abbildung 45: Die Populationen von IELs sind in den PHIL-Mäusen nicht verändert.	110
Abbildung 46: Die Größe der Peyer Plaques in den eosinophil-defizienten PHIL-Mäusen ist reduziert im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern vom Wildtyp.	111
Abbildung 47: Der Klassenwechsel zu IgA ist in den Peyer Plaques der PHIL-Tiere nicht beeinträchtigt.....	112
Abbildung 48: Die Populationen der T-Lymphozyten und der CD11c ⁺ Zellen sind in den Peyer Plaques der PHIL-Mäusen nicht beeinträchtigt.	113

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	30
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien und Kits.....	31
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	32
Tabelle 4: Puffer, Medien und Lösungen.....	33
Tabelle 5: Antikörper	35
Tabelle 6: Primersequenzen	36
Tabelle 7: Mausstämme	37
Tabelle 8: Mastermix für PHIL-Genotypisierung.....	43
Tabelle 9: Primersequenzen für PHIL-Genotypisierung.....	43
Tabelle 10: PCR-Reaktion für PHIL-Genotypisierung.....	44
Tabelle 11: cDNA-Mastermix.....	45
Tabelle 12: Programm für die reverse Traskriptase Reaktion (cDNA-Synthese).....	45
Tabelle 13: 16S rDNA Primer.....	46
Tabelle 14: qRT-PCR Mastermix	46
Tabelle 15: qRT-PCR Programm.....	47
Tabelle 16: ELISA-Arbeitsprotokoll.....	49
Tabelle 17: ELISpot-Arbeitsprotokoll	50

11. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
APRIL	<i>A proliferation inducing ligand</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BCL	<i>B cell lymphoma</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CP	Ceacum-Plaques
CSR	Klassenwechsel-Rekombination (<i>class switch recombination</i>)
CT	<i>Circle transcript</i>
DAPI	4'6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>Eosinophil-derived neurotoxin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	<i>Eosinophil peroxidase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAE	Follikelassoziiertes Epithel
FCS	Fortwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
g	Erdbeschleunigung 9,8 m/s ²
GALT	Darm-assoziiertes lymphoides Gewebe (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
GF	<i>Germ free</i>
Ggbf.	gegebenenfalls
GI	gastrointestinal
HEV	Hochendotheliale Venole
IC	intrazellulär

11. Abkürzungsverzeichnis

IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunoglobulin
IgA	Immunoglobulin A
IL	Interleukin
ILC	Lymphozyten der angeborenen Immunität (<i>innate lymphoid cells</i>)
ILF	Isoliertes lymphatisches Follikel
LAP	<i>Lateny associated peptide</i>
Lat.	lateinisch
LLC	<i>Large latent complex</i>
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LTBP	Latentes TGF- β Bindungsprotein
LTi	<i>Lymphoid tissue inducer</i>
LTin	<i>Lymphoid tissue initiator</i>
LTo	<i>Lymphoid tissue organizer</i>
MALT	Schleimhaut-assoziiertes lymphoides Gewebe (<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>)
MBP	<i>Major basic protein</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Mililiter
mLN	Mesenteriallymphknoten
MMP	Matrixmetalloprotease
M-Zelle	Mikrofaltenzelle
M Φ	Makrophage
nm	Nanometer
p. c.	<i>Post coitus</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	Plasmozytoide DC
PNAd	<i>Peripheral lymph node addressin</i>
PP	Peyer Plaque
RA	Retinsäure (<i>retinoic acid</i>)
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
s.g	sogenannter
SAA	<i>Serum amyloid A</i>
SC	Stromazelle

11. Abkürzungsverzeichnis

SCFA	<i>Short chain fatty acid</i>
SED	Subepithelialer Raum (<i>subepithelial dome region</i>)
SFB	<i>Segmented filamentous bacteria</i>
SHM	Somatische Hypermutation
SLC	<i>Small latent complex</i>
TACI	<i>Transmembrane activator and CAML interactor</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	<i>T cell dependent</i>
TFH	Follikuläre T-Helferzelle
TI	<i>T cell independent</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
u. a.	Unter anderem

12. Literaturverzeichnis

1. Davies, A. AN INVESTIGATION INTO THE SEROLOGICAL PROPERTIES OF DYSENTERY STOOLS. *The Lancet* **200**, 1009-1012 (1922).
2. Crabbe, P.A., Carbonara, A.O. & Heremans, J.F. The Normal Human Intestinal Mucosa as a Major Source of Plasma Cells Containing Gamma-a-Immunoglobulin. *Lab Invest* **14**, 235-48 (1965).
3. Bienenstock, J. & Tomasi, T.B., Jr. Secretory gamma-A in normal urine. *J Clin Invest* **47**, 1162-71 (1968).
4. Pollard, M. & Sharon, N. Responses of the Peyer's Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation. *Infect Immun* **2**, 96-100 (1970).
5. Craig, S.W. & Cebra, J.J. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med* **134**, 188-200 (1971).
6. Cebra, J.J., Gearhart, P.J., Kamat, R., Robertson, S.M. & Tseng, J. Origin and differentiation of lymphocytes involved in the secretory IgA responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **41 Pt 1**, 201-15 (1977).
7. McDole, J.R. et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**, 345-9 (2012).
8. Ferguson, A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* **18**, 921-37 (1977).
9. Cheroutre, H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol* **22**, 217-46 (2004).
10. Cepek, K.L. et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* **372**, 190-3 (1994).
11. Wang, R., Wang-Zhu, Y. & Grey, H. Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2181-6 (2002).
12. Pobezinsky, L.A. et al. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol* **13**, 569-78 (2012).
13. Staton, T.L. et al. CD8+ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium. *Nat Immunol* **7**, 482-8 (2006).
14. Campbell, D.J. & Butcher, E.C. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med* **195**, 135-41 (2002).
15. Agace, W.W. T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol* **29**, 514-22 (2008).

12. Literaturverzeichnis

16. El-Asady, R. et al. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med* **201**, 1647-57 (2005).
17. Ericsson, A., Svensson, M., Arya, A. & Agace, W.W. CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* **34**, 2720-9 (2004).
18. Cheroutre, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **11**, 445-56 (2011).
19. Komano, H. et al. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6147-51 (1995).
20. Fujihashi, K., McGhee, J.R., Yamamoto, M., Hiroi, T. & Kiyono, H. Role of gamma delta T cells in the regulation of mucosal IgA response and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* **778**, 55-63 (1996).
21. Shires, J., Theodoridis, E. & Hayday, A.C. Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalpha+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity* **15**, 419-34 (2001).
22. Lepage, A.C., Buzoni-Gatel, D., Bout, D.T. & Kasper, L.H. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **161**, 4902-8 (1998).
23. Kanwar, S.S., Ganguly, N.K., Walia, B.N. & Mahajan, R.C. Direct and antibody dependent cell mediated cytotoxicity against *Giardia lamblia* by splenic and intestinal lymphoid cells in mice. *Gut* **27**, 73-7 (1986).
24. Dharakul, T. et al. Immunization with baculovirus-expressed recombinant rotavirus proteins VP1, VP4, VP6, and VP7 induces CD8+ T lymphocytes that mediate clearance of chronic rotavirus infection in SCID mice. *J Virol* **65**, 5928-32 (1991).
25. Owen, R.L., Cray, W.C., Jr., Ermak, T.H. & Pierce, N.F. Bacterial characteristics and follicle surface structure: their roles in Peyer's patch uptake and transport of *Vibrio cholerae*. *Adv Exp Med Biol* **237**, 705-15 (1988).
26. Diehl, G.E. et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* **494**, 116-20 (2013).
27. Huang, F.P. et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* **191**, 435-44 (2000).
28. Carter, P.B. & Collins, F.M. The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* **139**, 1189-203 (1974).
29. Wigle, J.T. & Oliver, G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* **98**, 769-78 (1999).
30. Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H. & Nishikawa, S. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. *Int Immunol* **9**, 507-14 (1997).

12. Literaturverzeichnis

31. Yoshida, H. et al. IL-7 receptor alpha+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int Immunol* **11**, 643-55 (1999).
32. Mebius, R.E., Streeter, P.R., Michie, S., Butcher, E.C. & Weissman, I.L. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3- cells to colonize lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11019-24 (1996).
33. Mebius, R.E., Rennert, P. & Weissman, I.L. Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* **7**, 493-504 (1997).
34. Spits, H. et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* **13**, 145-9 (2013).
35. Eberl, G. et al. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* **5**, 64-73 (2004).
36. Yoshida, H. et al. Expression of alpha(4)beta(7) integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T cells, fetal intestinal lymphotoxin producer, NK, and dendritic cells. *J Immunol* **167**, 2511-21 (2001).
37. Honda, K. et al. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* **193**, 621-30 (2001).
38. Nishikawa, S., Honda, K., Vieira, P. & Yoshida, H. Organogenesis of peripheral lymphoid organs. *Immunol Rev* **195**, 72-80 (2003).
39. Dejardin, E. et al. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-35 (2002).
40. Yilmaz, Z.B., Weih, D.S., Sivakumar, V. & Weih, F. RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J* **22**, 121-30 (2003).
41. De Togni, P. et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* **264**, 703-7 (1994).
42. Ansel, K.M. et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* **406**, 309-14 (2000).
43. Koni, P.A. et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* **6**, 491-500 (1997).
44. Fütterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H. & Pfeffer, K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* **9**, 59-70 (1998).
45. Meier, D. et al. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* **26**, 643-54 (2007).

12. Literaturverzeichnis

46. Smith, M.W., James, P.S. & Tivey, D.R. M cell numbers increase after transfer of SPF mice to a normal animal house environment. *Am J Pathol* **128**, 385-9 (1987).
47. Miyasaka, M. & Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* **4**, 360-70 (2004).
48. Butcher, E.C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. & Briskin, M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* **72**, 209-53 (1999).
49. Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F. & Butcher, E.C. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* **366**, 695-8 (1993).
50. Bargatze, R.F., Jutila, M.A. & Butcher, E.C. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* **3**, 99-108 (1995).
51. Hadley, G.A., Bartlett, S.T., Via, C.S., Rostapshova, E.A. & Moainie, S. The epithelial cell-specific integrin, CD103 (alpha E integrin), defines a novel subset of alloreactive CD8+ CTL. *J Immunol* **159**, 3748-56 (1997).
52. Ericsson, A., Arya, A. & Agace, W. CCL25 enhances CD103-mediated lymphocyte adhesion to E-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* **1029**, 334-6 (2004).
53. Wurbel, M.A. et al. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* **98**, 2626-32 (2001).
54. Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J.M. & Love, P.E. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* **168**, 2811-9 (2002).
55. Pabst, O. et al. Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J Exp Med* **199**, 411-6 (2004).
56. Kunkel, E.J. & Butcher, E.C. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* **3**, 822-9 (2003).
57. Warnock, R.A. et al. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* **191**, 77-88 (2000).
58. Gunn, M.D. et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* **189**, 451-60 (1999).
59. Okada, T. et al. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* **196**, 65-75 (2002).
60. Allen, C.D. et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* **5**, 943-52 (2004).
61. Pabst, O. et al. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* **35**, 98-107 (2005).

12. Literaturverzeichnis

62. Herbrand, H., Bernhardt, G., Forster, R. & Pabst, O. Dynamics and function of solitary intestinal lymphoid tissue. *Crit Rev Immunol* **28**, 1-13 (2008).
63. Tsuji, M. et al. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **29**, 261-71 (2008).
64. Brandtzaeg, P. et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today* **20**, 141-51 (1999).
65. van Egmond, M. et al. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* **22**, 205-11 (2001).
66. Mestecky, J., Zikan, J. & Butler, W.T. Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chains. *Science* **171**, 1163-5 (1971).
67. Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* **1**, 11-22 (2008).
68. Cravioto, A. et al. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* **163**, 1247-55 (1991).
69. Carbonare, S.B., Silva, M.L., Trabulsi, L.R. & Carneiro-Sampaio, M.M. Inhibition of HEp-2 cell invasion by enteroinvasive Escherichia coli by human colostrum IgA. *Int Arch Allergy Immunol* **108**, 113-8 (1995).
70. Magnusson, K.E. & Stjernstrom, I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. *Immunology* **45**, 239-48 (1982).
71. Edebo, L., Richardson, N. & Feinstein, A. The effects of binding mouse IgA to dinitrophenylated Salmonella typhimurium on physicochemical properties and interaction with phagocytic cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **78**, 353-7 (1985).
72. Abu-Ghazaleh, R.I., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R.A. & Gleich, G.J. IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* **142**, 2393-400 (1989).
73. Wolf, H.M. et al. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes. *Blood* **83**, 1278-88 (1994).
74. Lecocq, M., Detry, B., Guisset, A. & Pilette, C. Fc α RI-mediated inhibition of IL-12 production and priming by IFN-gamma of human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **190**, 2362-71 (2013).
75. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F.W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* **24**, 541-70 (2006).
76. Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* **20**, 165-96 (2002).

12. Literaturverzeichnis

77. Honjo, T. & Kataoka, T. Organization of immunoglobulin heavy chain genes and allelic deletion model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2140-4 (1978).
78. Fagarasan, S. & Honjo, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* **3**, 63-72 (2003).
79. Leung, H. & Maizels, N. Transcriptional regulatory elements stimulate recombination in extrachromosomal substrates carrying immunoglobulin switch-region sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4154-8 (1992).
80. Stavnezer-Nordgren, J. & Sirlin, S. Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO J* **5**, 95-102 (1986).
81. Gaff, C. & Gerondakis, S. RNA splicing generates alternate forms of germline immunoglobulin alpha heavy chain transcripts. *Int Immunol* **2**, 1143-8 (1990).
82. Lebman, D.A., Lee, F.D. & Coffman, R.L. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol* **144**, 952-9 (1990).
83. Lebman, D.A., Nomura, D.Y., Coffman, R.L. & Lee, F.D. Molecular characterization of germline immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type beta-induced isotype switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3962-6 (1990).
84. Matsuoka, M., Yoshida, K., Maeda, T., Usuda, S. & Sakano, H. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* **62**, 135-42 (1990).
85. Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M. & Honjo, T. A hallmark of active class switch recombination: transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12620-3 (2001).
86. Stavnezer, J. Antibody class switching. *Adv Immunol* **61**, 79-146 (1996).
87. Islam, K.B., Nilsson, L., Sideras, P., Hammarstrom, L. & Smith, C.I. TGF-beta 1 induces germline transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* **3**, 1099-106 (1991).
88. Zelazowski, P., Collins, J.T., Dunnick, W. & Snapper, C.M. Antigen receptor cross-linking differentially regulates germ-line CH ribonucleic acid expression in murine B cells. *J Immunol* **154**, 1223-31 (1995).
89. Litinskiy, M.B. et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* **3**, 822-9 (2002).
90. Muramatsu, M. et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**, 18470-6 (1999).
91. Macpherson, A.J. et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* **288**, 2222-6 (2000).

12. Literaturverzeichnis

92. Macpherson, A.J. et al. IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. *Nat Immunol* **2**, 625-31 (2001).
93. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O. & Suzuki, K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol* **28**, 243-73 (2010).
94. Kruglov, A.A. et al. Nonredundant function of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* **342**, 1243-6 (2013).
95. Niess, J.H. et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**, 254-8 (2005).
96. Uematsu, S. et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* **9**, 769-76 (2008).
97. Tokuyama, H. & Tokuyama, Y. The regulatory effects of all-trans-retinoic acid on isotype switching: retinoic acid induces IgA switch rearrangement in cooperation with IL-5 and inhibits IgG1 switching. *Cell Immunol* **192**, 41-7 (1999).
98. Seo, G.Y. et al. Retinoic acid, acting as a highly specific IgA isotype switch factor, cooperates with TGF-beta1 to enhance the overall IgA response. *J Leukoc Biol* **94**, 325-35 (2013).
99. Tezuka, H. et al. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929-33 (2007).
100. He, B. et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* **26**, 812-26 (2007).
101. Tezuka, H. et al. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* **34**, 247-57 (2011).
102. Suzuki, K. et al. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **33**, 71-83 (2010).
103. Bergqvist, P., Gardby, E., Stenstrom, A., Bemark, M. & Lycke, N.Y. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J Immunol* **177**, 7772-83 (2006).
104. Lindner, C. et al. Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. *J Exp Med* **209**, 365-77 (2012).
105. Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Meresse, S. & Gorvel, J.P. Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology* **142**, 592-601 e3 (2012).
106. Coombes, J.L. & Powrie, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* **8**, 435-46 (2008).

12. Literaturverzeichnis

107. Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G. & Rescigno, M. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. *Immunity* **40**, 248-61 (2014).
108. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* **29**, 621-63 (2011).
109. Vinuesa, C.G. & Cyster, J.G. How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity* **35**, 671-80 (2011).
110. Tsuji, M. et al. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* **323**, 1488-92 (2009).
111. Dullaers, M. et al. A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity* **30**, 120-9 (2009).
112. Hirota, K. et al. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat Immunol* **14**, 372-9 (2013).
113. van de Pavert, S.A. & Mebius, R.E. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* **10**, 664-74 (2010).
114. Batista, F.D. & Harwood, N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **9**, 15-27 (2009).
115. Bowman, E.P. et al. The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *J Exp Med* **195**, 269-75 (2002).
116. Kunkel, E.J. et al. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* **111**, 1001-10 (2003).
117. Lazarus, N.H. et al. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol* **170**, 3799-805 (2003).
118. Kunkel, E.J. et al. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* **192**, 761-8 (2000).
119. Papadakis, K.A. et al. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol* **165**, 5069-76 (2000).
120. Zabel, B.A. et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* **190**, 1241-56 (1999).
121. Pan, J. et al. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol* **165**, 2943-9 (2000).
122. Masahata, K. et al. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. *Nat Commun* **5**, 3704 (2014).

12. Literaturverzeichnis

123. Hooper, L.V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol* **12**, 129-34 (2004).
124. Bandeira, A. et al. Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* **172**, 239-44 (1990).
125. Crabbe, P.A., Bazin, H., Eyssen, H. & Heremans, J.F. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **34**, 362-75 (1968).
126. Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S. & Okada, Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* **79**, 32-7 (1993).
127. Ivanov, II et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4**, 337-49 (2008).
128. Ivanov, II et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-98 (2009).
129. Talham, G.L., Jiang, H.Q., Bos, N.A. & Cebra, J.J. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun* **67**, 1992-2000 (1999).
130. Suzuki, K. et al. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1981-6 (2004).
131. Atarashi, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337-41 (2011).
132. Atarashi, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**, 232-6 (2013).
133. Louis, P. et al. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* **186**, 2099-106 (2004).
134. Geuking, M.B. et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* **34**, 794-806 (2011).
135. Round, J.L. & Mazmanian, S.K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12204-9 (2010).
136. Watson, C.J. Immune cell regulators in mouse mammary development and involution. *J Anim Sci* **87**, 35-42 (2009).
137. Reed, J.R. & Schwertfeger, K.L. Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 329-39 (2010).
138. Matthews, A.N. et al. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6273-8 (1998).

12. Literaturverzeichnis

139. Mishra, A., Hogan, S.P., Lee, J.J., Foster, P.S. & Rothenberg, M.E. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest* **103**, 1719-27 (1999).
140. Chu, V.T. et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* (2011).
141. Chu, V.T. et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* **40**, 582-93 (2014).
142. Jung, Y. et al. IL-1beta in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunol* (2015).
143. Yu, C. et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* **195**, 1387-95 (2002).
144. Lee, J.J. et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* **305**, 1773-6 (2004).
145. Collier, R.J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **39**, 1793-803 (2001).
146. Salzman, N.H. et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* **11**, 76-83 (2010).
147. Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K. & Lamarre, A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* **3**, 1021-35 (2001).
148. Macpherson, A.J., Martinic, M.M. & Harris, N. The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine. *Cell Mol Life Sci* **59**, 2088-96 (2002).
149. Macpherson, A.J., Koller, Y. & McCoy, K.D. The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends Immunol* **36**, 460-70 (2015).
150. Duan, J., Chung, H., Troy, E. & Kasper, D.L. Microbial colonization drives expansion of IL-1 receptor 1-expressing and IL-17-producing gamma/delta T cells. *Cell Host Microbe* **7**, 140-50 (2010).
151. Kawamoto, S. et al. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* **336**, 485-9 (2012).
152. Fagarasan, S. et al. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* **298**, 1424-7 (2002).
153. Ramanan, D., Tang, M.S., Bowcutt, R., Loke, P. & Cadwell, K. Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity* **41**, 311-24 (2014).
154. Furusawa, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446-50 (2013).

12. Literaturverzeichnis

155. Arpaia, N. et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* **504**, 451-5 (2013).
156. Kawamoto, S. et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* **41**, 152-65 (2014).
157. Jiang, W. et al. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med* **210**, 2465-76 (2013).
158. Umesaki, Y., Okada, Y., Matsumoto, S., Imaoka, A. & Setoyama, H. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol Immunol* **39**, 555-62 (1995).
159. O'Connor, B.P., Cascalho, M. & Noelle, R.J. Short-lived and long-lived bone marrow plasma cells are derived from a novel precursor population. *J Exp Med* **195**, 737-45 (2002).
160. Odendahl, M. et al. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* **105**, 1614-21 (2005).
161. Bando, J.K., Liang, H.-E. & Locksley, R.M. Identification and distribution of developing innate lymphoid cells in the fetal mouse intestine. *Nat Immunol* **16**, 153-160 (2015).
162. Schaedler, R.W., Dubos, R. & Costello, R. The Development of the Bacterial Flora in the Gastrointestinal Tract of Mice. *J Exp Med* **122**, 59-66 (1965).
163. Jiang, H.Q., Bos, N.A. & Cebra, J.J. Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. *Infect Immun* **69**, 3611-7 (2001).
164. Hapfelmeier, S. et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* **328**, 1705-9 (2010).
165. Zimmermann, N. et al. Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils. *Allergy* **63**, 1156-63 (2008).
166. Cravedi, P., Lessman, D.A. & Heeger, P.S. Eosinophils are not required for the induction and maintenance of an alloantibody response. *Am J Transplant* **13**, 2696-702 (2013).
167. Hartnell, A., Moqbel, R., Walsh, G.M., Bradley, B. & Kay, A.B. Fc gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* **69**, 264-70 (1990).
168. Nagase, H. et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* **171**, 3977-82 (2003).
169. Wong, C.K., Cheung, P.F., Ip, W.K. & Lam, C.W. Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**, 85-96 (2007).

12. Literaturverzeichnis

170. Bartemes, K.R., Cooper, K.M., Drain, K.L. & Kita, H. Secretory IgA induces antigen-independent eosinophil survival and cytokine production without inducing effector functions. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 827-35 (2005).
171. Shibuya, A. et al. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* **1**, 441-6 (2000).