

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Wirkung von  
9-cis Retinsäure in der Allergietherapie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Tim Hollstein  
aus Brandenburg, Deutschland

Datum der Promotion: 27.02.2015

Meinen Eltern und Großeltern

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
1.1. Immunmodulation durch Retinsäure .....	6
1.1.1. Vitamin A Stoffwechsel .....	6
1.1.2. Wirkung auf Immunzellen .....	8
1.1.3. Einsatz als Therapeutikum .....	9
1.2. Typ-I-Allergien .....	10
1.2.1. Sensibilisierungs- und Effektorphase.....	10
1.2.2. Klinische Manifestation .....	12
1.2.3. Immuntherapeutische Konzepte.....	13
1.2.3.1 Spezifische Immuntherapie .....	13
1.2.3.2 Mechanismen.....	13
1.2.3.3 Mögliche adjuvante Wirkung von 9-cis Retinsäure .....	15
<b>2. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>17</b>
3.1. Materialien (Anhang 6.3) .....	17
3.2. Murines Typ-I-Allergie-Modell .....	17
3.2.1. Sensibilisierung und spezifische Immuntherapie in der Maus.....	17
3.2.2. Quantifizierung der humoralen antigenspezifischen Immunantwort .....	18
3.2.2.1 Messung der Serum-Antikörper .....	18
3.2.2.2 Bestimmung von antikörperproduzierenden Zellen .....	20
3.2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse antikörperproduzierender B-Zellen .....	22
3.3. Humanes <i>in vitro</i> Zellkulturmodell .....	28
3.3.1. Isolierung und Stimulation von humanen B-Lymphozyten .....	28
3.3.2. Proliferation, Aktivierungs- und Differenzierungsmarker, Immunglobulin- Profil, Toxizität .....	30
3.4. Statistische Analyse.....	33
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
4.1. Einfluss von 9-cis Retinsäure auf die SIT im murinen Allergie-Modell .....	34
4.1.1. Humorale Immunantwort .....	34

## Inhaltsverzeichnis

4.1.2.	Differenzierung von B-Lymphozyten .....	37
4.1.3.	Migration von Plasma- und Gedächtniszellen .....	40
4.1.4.	Verträglichkeit.....	45
4.2.	Einfluss von 9-cis Retinsäure auf humane B-Zellen <i>in vitro</i> .....	46
4.2.1.	Zellviabilität unter 9-cis Retinsäure .....	46
4.2.2.	Aktivierung und Differenzierung von humanen B-Lymphozyten .....	47
4.2.3.	B-Zell-Proliferation.....	49
4.2.4.	Zytokin- und Immunglobulin-Profil.....	50
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
5.1.	Toleranzinduktion durch IgA-sezernierende Plasmazellen und B-Gedächtniszellen .....	55
5.2.	Veränderte Gedächtniszell-Migration in die Überlebensnischen des adaptiven Immunsystems.....	56
5.3.	Tolerogene Wirkung der modulierten IgE- und IgG1-Sekretion .....	58
5.4.	Die Wirkung von Retinsäure auf humane B-Zellen ist abhängig von kostimulatorischen Faktoren .....	59
5.5.	Zusammenfassendes Modell der Toleranzinduktion durch 9-cis Retinsäure.....	62
5.6.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	63
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>65</b>
6.1.	Abkürzungen .....	65
6.2.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	67
6.3.	Materialien.....	68
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>82</b>
	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>83</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>84</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>85</b>

## Zusammenfassung

Vitamin A und seine Metaboliten sind essentiell für verschiedene Körperfunktionen wie Sehvorgang, Hautdifferenzierung, Hämatopoese und embryonale Entwicklung. Neu ist das zunehmende Verständnis zur regulatorischen Wirkung von Vitamin A auf das Immunsystem. Das Vitamin-A-Derivat Retinsäure (RS) ist ein wichtiger Faktor zum Aufbau von oraler Toleranz im Gastrointestinaltrakt und scheint für das Immunsystem ein generell tolerogenes Milieu zu induzieren, indem es die Bildung regulatorischer T-Zellen und eine IgA-dominante Immunantwort fördert. Die Wirkungen von RS werden über nukleäre Hormonrezeptoren vermittelt, die von B- und T-Lymphozyten exprimiert werden. In diesem Zusammenhang könnte sich RS auch in der Therapie allergischer Erkrankungen wie der Typ-I-Allergie als nützlich erweisen, indem sie das hyperreaktive Immunsystem tolerogen moduliert.

Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Untersuchung des Vitamin-A-Derivats 9-cis RS bei der Spezifischen Immuntherapie (SIT) der Typ-I-Allergie. Dazu wurde *in vivo* in einem murinen Typ-I-Allergie-Modell die Wirkung von 9-cis RS in Kombination mit der SIT auf B-Lymphozyten untersucht. Hier wurden vor allem die antigenspezifische Antikörperproduktion und die Migration in immunkompetente Organe wie Milz, Knochenmark und periphere Lymphknoten untersucht. Weiterhin wurde der Effekt von 9-cis RS auf humane B-Zellen *in vitro* in einem T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Kontext untersucht. Dabei wurden sowohl Parameter wie Toxizität, Regulation von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern und Proliferation, als auch Zytokin- und Immunglobulinsynthese unter dem Einfluss von 9-cis RS erfasst.

Die Daten zeigen, dass 9-cis RS *in vivo* die Immunantwort im Rahmen der SIT moduliert. So fanden sich erhöhte IgA-Konzentrationen sowie eine erhöhte Anzahl IgA-sezernierender B-Zellen in der Milz und im Knochenmark, während die Zahl IgE-produzierender Zellen und damit auch die IgE-Werte im Serum durch 9-cis RS gehemmt wurden. Ferner kam es zu einer verstärkten Migration der B-Zellen unter dem Einfluss von 9-cis RS von Milz, Knochenmark und peripheren Lymphknoten in die mesenterialen Lymphknoten. *In vitro* kam es durch 9-cis RS zu einer verminderten B-Zellproliferation und IgE-Produktion in der T-Zell-abhängigen Stimulation. Konträr dazu induzierte 9-cis RS in der T-Zell-unabhängigen Stimulation eine stark erhöhte B-Zellproliferation mit nachfolgend vermehrter Immunglobulinsynthese.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass 9-cis RS die Immunantwort moduliert. Sie fördert nachhaltig die Differenzierung von B-Zellen zu IgA-sezernierenden B-Plasmazellen und

langlebigen Gedächtniszellen zulasten der Generierung anderer Immunglobuline wie IgE. Interessanterweise scheint die spezifische Wirkweise von 9-cis RS dabei von stimulatorischen Kofaktoren abzuhängen. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die besonderen Wirkungen von 9-cis RS auf das Immunsystem *in vivo* besser zu verstehen und bilden eine Grundlage für weitere Forschungsarbeiten.

Schlüsselwörter:

Vitamin A, Retinsäure, B-Zellen, IgA

## Abstract

Vitamin A and its metabolites are involved in a variety of functions throughout the body, such as vision, skin differentiation, hematopoiesis and embryonic development. But the understanding of the regulatory effects of Vitamin A on the immune system is fairly new. The Vitamin A derivative retinoic acid is an important parameter in the generation of oral tolerance in the gastrointestinal system and seems to induce a tolerogenic milieu by promoting regulatory T cell development and an IgA-dominated immune response. The effects of retinoic acid are realized by binding to nuclear hormone receptors, which are expressed in B cells and T cells. In this context, retinoic acid could contribute to the treatment of allergic diseases like type I hypersensitivity by inducing tolerance in the hyperactive immune system.

To achieve this objective, the impact of the vitamin A derivative 9-cis retinoic acid (9cRA) on Specific Immunotherapy (SIT) in cases of type I hypersensitivity was examined. For this purpose, the effects on B cells of 9cRA in combination with SIT were investigated *in vivo* in a murine type I hypersensitivity model. Notably, the experiments focused on antigen-specific antibody production and B cell migration into spleen, bone marrow and peripheral lymph nodes. In addition, the action of 9cRA on human B cells was studied by performing *in vitro* experiments in a T-cell dependent and independent context. The analyzed parameters were cell toxicity, expression of activation and differentiation markers, proliferation as well as cytokine and immunoglobulin secretion.

The data shows a modulating effect of 9cRA on the immune system during SIT *in vivo*. An increased concentration of IgA and an augmented number of IgA-secreting B cells in spleen and bone marrow was observed while the number of IgE-producing B cells and IgE serum concentration diminished. Besides, B cell migration from spleen, bone marrow and peripheral lymph nodes to mesenteric lymph nodes was enhanced in the presence of 9cRA. *In vitro* B cell proliferation and IgE-secretion in T cell dependent stimulation were reduced in the presence of 9cRA. By contrast, 9cRA induced a strong B cell proliferation with subsequent increased immunoglobulin production in T cell independent stimulation.

A consolidated view of all these factors suggests that 9cRA influences immune response. It promotes B cell differentiation into IgA-producing plasma cells and long-lived B memory cells at the expense of IgE production. Remarkably, the specific functions fulfilled by 9cRA depend on the instructing stimulation signals. The results of this study contribute to a better

understanding of the effects of 9cRA on the immune system and form the basis of new research projects.

Keywords:

Vitamin A, retinoic acid, B cells, IgA

## 1. Einleitung

Vitamine sind lebensnotwendige Stoffe für den menschlichen Körper, die nicht selbst hergestellt werden können und in wichtige Körperprozesse eingreifen. Das lipophile Vitamin A ist essentiell für den Sehvorgang und besitzt darüber hinaus entscheidende Effekte auf zelluläres Wachstum und Differenzierung. Es regelt den Aufbau der Haut, die Hämatopoese, die embryonale Entwicklung und wurde auch im Zusammenhang mit Immuntoleranz beschrieben. Die Wirkung auf das Immunsystem erzielt Vitamin A dabei in erster Linie durch sein Derivat Retinsäure (RS), das in immunkompetenten Zellen durch Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren die Transkription von zahlreichen Genen steuert. Dabei fördert es unter anderem die Differenzierung von naiven zu regulatorischen T-Zellen (Treg) und den IgA-Isotypenklassenwechsel von B-Zellen im Darm, was eine immunologische Toleranz induziert [1]. Daher könnte Vitamin A hypothetisch in der spezifischen Behandlung hyperreaktiver Immunantworten eingesetzt werden, wie es bei Typ-I-Allergien der Fall ist.

Die Typ-I-Allergie, meistens in Form einer allergischen Rhinokonjunktivitis oder als allergisches Asthma auftretend, zählt neben der atopischen Dermatitis zu den Krankheiten des atopischen Formenkreises, die weltweit vorkommen [2]. Aktuell leiden in Europa ca. 20 % der Erwachsenen und bis zu 30 % der Kinder an allergischer Rhinokonjunktivitis. Die Prävalenz allergischer Erkrankungen hat in den entwickelten Ländern in den letzten 30 Jahren kontinuierlich zugenommen [3, 4]. Ursächlich für allergische Erkrankungen dieses Typs (nach Coombs und Gell) ist die Sensibilisierung des Immunsystems auf ein ansonsten ungefährliches Allergen. Dies führt bei erneutem Allergenkontakt zu einer ausgeprägten IgE-vermittelten Immunreaktion, die sich klinisch durch Rhinokonjunktivitis, Juckreiz der Augen und Bronchokonstriktion manifestiert.

Gegenwärtig erfolgt die Therapie von Typ-I-Allergien je nach Schweregrad und Leidensdruck symptomatisch oder kausal. Letzteres gelingt mit einer spezifischen Immuntherapie (SIT) mit dem Ziel einer Langzeit-Immuntoleranz. Dazu wird gemäß der aktuellen AWMF-Leitlinie repetitiv hochdosiertes Allergen über 3-5 Jahre appliziert [5]. Bereits im ersten Therapiejahr werden nach SIT, verglichen mit symptomatischer Therapie mit Antihistaminika oder topischen Glukokortikoiden, deutliche Therapieeffekte erzielt [6]. Durch die SIT reduzieren sich die Beschwerden und der durchschnittliche Medikamentenverbrauch bei saisonalen Pollenallergien um bis zu 45 - 60 % [7]. Jedoch sprechen nicht alle Patienten auf die mehrjährige Behandlung an, je nach Allergen liegen die Ansprechraten zwischen 20 und 80 % [8, 9]. Die Remissionszeit

ist abhängig von der Behandlungsdauer und beträgt bei 3-jähriger Therapie mindestens 3 Jahre [10].

Um den Therapieerfolg der SIT hinsichtlich Wirkungseintritt, Ansprechrate und Remissionsdauer zu verstärken, bieten sich immunmodulatorische Substanzen als Adjuvantien an, die Toleranz induzieren oder fördern. Vitamin A und sein Derivat RS könnten solche Substanzen darstellen. Im folgenden Kapitel wird zunächst genauer auf Vitamin A eingegangen, um daraufhin die Pathophysiologie der Soforttyp-Allergien sowie die aktuellen therapeutischen Optionen zu erläutern.

## **1.1. Immunmodulation durch Retinsäure**

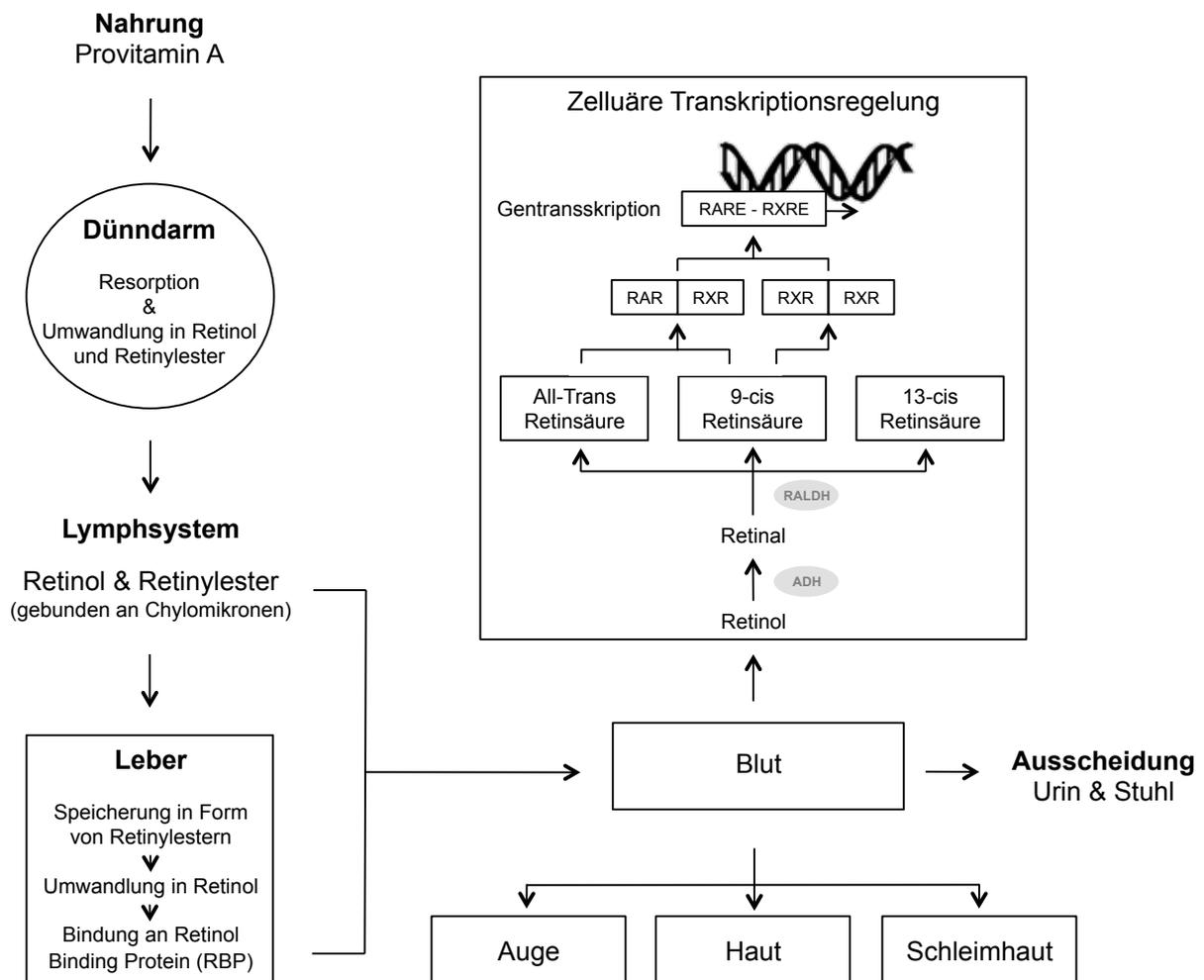
### **1.1.1. Vitamin A Stoffwechsel**

Der Begriff »Vitamin A« beschreibt eine Gruppe von Substanzen, die eine gleichwertige biologische Aktivität wie Retinol, dem Vitamin A-Alkohol mit der Summenformel  $C^{20}H^{30}O$ , aufweisen. Dazu gehören neben Retinol noch Retinylester, Retinal und vier als Provitamin A bezeichnete Carotinoide ( $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin,  $\gamma$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin). Der Vitamin-A-Bedarf des Menschen deckt sich zum größten Teil aus tierischen Quellen. Weniger bedeutsam sind die in Pflanzen vorkommenden Carotinoide. Der Tagesbedarf beträgt bei Kindern zwischen 0,5 und 1,0 mg und bei Erwachsenen zwischen 0,8 und 1,1 mg [11]. Ein Mangel von Vitamin A kann durch eine Fettresorptionsstörung oder chronische Darmkrankheiten ausgelöst werden und zu Nachblindheit, Verhornungsstörungen der Haut und Keratokonjunktivitis sicca führen [12]. Eine Hypervitaminose geht dagegen mit Beschwerden wie Xerosis cutis, Pruritus, Haarausfall und gelblicher Verfärbung sowie diffuser Schuppung der Haut einher [12].

Vitamin A wird direkt oder als Vorstufe über die Nahrung im Dünndarm resorbiert, in den Zellen des Dünndarmepithels in Retinol und Retinylester umgewandelt und an Chylomikronen gebunden in das Lymphsystem sezerniert, wo es hauptsächlich von der Leber resorbiert und in Form von Retinylestern in den Sternzellen gespeichert wird. Ein Teil erreicht jedoch auch den Blutkreislauf und versorgt das Gewebe direkt. Die Freisetzung aus der Leber erfolgt durch erneute Umwandlung der Retinylester in Retinol durch Hydrolyse und nachfolgende Bindung an das Retinol-bindende Protein (*Retinol-Binding-Protein*, RBP). So erreicht Retinol über den Blutkreislauf die Zielgewebe, wie z.B. Augen, Haut und Schleimhäute.

In den Zielzellen wird Retinol zunächst durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Retinal und dann irreversibel durch eine Retinal-Dehydrogenase (RALDH) zu RS oxidiert. RS kommt in den

Isomeren all-Trans (ATRA), 9-cis, 11-cis und 13-cis RS vor. Sie entstehen aus den entsprechenden Retinolisomeren oder aufgrund spontaner Isomerisierung von ATRA [1]. Jede RS bindet an spezifische nukleäre Hormonrezeptoren und kann somit die Gentranskription bestimmter Gene spezifisch beeinflussen. Bisher sind zwei Rezeptorklassen der Retinoidrezeptoren bekannt, die *Retinoic X Receptors* (RXR) und die *Retinoic Acid Receptors* (RAR) mit den Subtypen RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$  [13] und RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  [14]. Während die RAR-Rezeptorgruppe als Ligand für ATRA und 9-cis RS gilt, können RXR-Rezeptoren nur von 9-cis RS gebunden werden. 13-cis RS scheint weder an RXR- noch an RAR-Rezeptoren zu binden [15]. Nach Aktivierung bilden RAR-Rezeptoren Heterodimere mit RXR-Rezeptoren. Weiterhin sind RXR-Rezeptoren in der Lage Homodimere zu bilden, sowie an PPAR $\gamma$ , Liver-X Rezeptoren (LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  und LXR $\gamma$ ) und Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) zu binden [16]. Damit



**Abb. 1 – Stoffwechsel von Vitamin A.**

Vitamin A wird enteral resorbiert. Die Speicherung erfolgt in der Leber. Über das Blut erreicht es, umgewandelt in Retinol, die relevanten Gewebe wie Auge, Haut und Schleimhäute. In vielen Zellen kann Retinol zu RS umgewandelt werden, das die Gentranskription reguliert.

scheint das Wirkspektrum der RXR-Rezeptoren und somit von 9-cis RS größer zu sein als das anderer Retinsäureisomere. Die aktivierten nukleären Rezeptoren binden an *Retinoic Acid Response Elemente* (RARE) oder *Retinoic X Response Elemente* (RXRE), die in bestimmten Promotorsequenzen des Genoms vorhanden sind und regulieren dadurch die Gentranskription [17] (Abb. 1). Ein klassisches RXR-Zielgen stellt CYP26A1 dar, das für die Monooxygenase Zytochrom P450 26A1 kodiert [18].

Der zelluläre Katabolismus der Retinsäuren erfolgt einerseits durch Oxidierung mittels Enzymen der CYP26-Familie oder durch Glucuronidierung und nachfolgende Ausscheidung über Leber und Niere [17].

### 1.1.2. Wirkung auf Immunzellen

Vitamin A wirkt spezifisch auf das angeborene (*innate*) und das adaptive (humorale) Immunsystem. Beim angeborenen Immunsystem führt eine Vitamin-A-Defizienz zu einer Erhöhung neutrophiler Granulozyten in Milz, Knochenmark und im peripheren Blut [19] und senkt die Anzahl von Monozyten in Milz und Knochenmark [20, 21]. Weiterhin schränkt eine Vitamin-A-Defizienz grundlegende Eigenschaften des angeborenen Immunsystems ein, wie die Möglichkeit der Phagozytose und Eliminierung von Bakterien sowie der Migration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zu Entzündungsherden [20, 22]. Auch die Zahl natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) korreliert proportional zum Vitamin-A-Spiegel [23].

Beim adaptiven Immunsystem werden alle an der humoralen Immunantwort beteiligten Zellen durch Vitamin A beeinflusst. Im T-Zell-Kompartiment induziert RS die vermehrte Bildung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen [24] und verstärkt die Proliferation von T-Zellen, u.a. durch vermehrte Bildung von Interleukin-2 (IL-2) [25]. Eine Vitamin-A-Defizienz führt dagegen zu einer reduzierten Aktivität von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen [26]. Genauer betrachtet, beeinflusst RS sehr spezifisch die verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen (Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen). Sie sorgt u.a. durch Induktion von IL-4, GATA3 (*trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*), MAF (*macrophage-activation factor*) und STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*) für eine verstärkte Entwicklung von Th2-Zellen und bewirkt gegensätzlich durch Inhibition des Transkriptionsfaktors T-bet einen Rückgang von Th1-Zellen [27-29]. Ferner bilden sich durch eine synergistische Wirkung von RS und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) verstärkt FOXP3<sup>+</sup> (*forkhead box P3*) regulatorische T-Zellen (Treg) mit vermehrter Oberflächenexpression von Darm-Migrationsmarkern wie CCR9 (*C-C chemokine receptor type 9*) und Integrin  $\alpha 4\beta 7$ , während die Bildung von entzündungsfördernden

Th17-Zellen reduziert wird [30-35]. Dieser inhibierende Effekt auf Th17-Zellen, der auch durch Zugabe von Th17-induzierendem IL-6 erhalten bleibt [31], ist jedoch nur bei hohen RS-Konzentrationen zu beobachten; niedrigere Konzentrationen scheinen sich eher positiv auf die Differenzierung von Th17-Zellen auszuwirken [36]. Interessanterweise scheint RS über die Wirkung an RAR $\alpha$  sogar essentiell für Th1- und Th17-Immunantworten zu sein [37].

Neben den Wirkungen auf T-Zellen zeigt RS auch pleiotrope Effekte auf antigenpräsentierende Zellen sowie B-Zellen. Bei dendritischen Zellen reguliert RS die Differenzierung, die Reifung (im Zusammenspiel mit inflammatorischen Signalen) sowie die Antigenpräsentation [38-40]. Weiterhin beeinflusst RS die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Zellen (ASZ) [41]. So ist die Generierung von IgA<sup>+</sup> ASZ im darmassoziierten Immunsystem (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) durch lokale dendritische Zellen zu einem großen Teil abhängig von IL-6 und RS [42, 43]. Auch die Darm-Migration der im GALT generierten ASZ wird von RS durch Hochregulation von CCR9 und Integrin  $\alpha 4\beta 7$  beeinflusst [43]. Folglich führt eine Vitamin-A-Defizienz zu verminderten IgA<sup>+</sup> ASZ im Darm [44]. Zusätzlich verstärkt RS die Differenzierung und Proliferation und reduziert die Sekretion von Immunglobulin E (IgE) in stimulierten B-Zellen, indem sie direkt das essentielle IgE-Switch-Transkript hemmt [41, 45-47]. Vitamin A ist weiterhin notwendig für die Ausbildung einer adäquaten humoralen IgG-Antwort, z.B. in Folge einer Infektion oder Impfung [48].

Zusammenfassend sind Vitamin A und die immunmodulatorisch wirksame Form RS wichtige Faktoren der Immunabwehr und Immuntoleranz.

### **1.1.3. Einsatz als Therapeutikum**

Aufgrund der vielfältigen immunmodulatorischen Wirkungen werden Retinsäuren schon heute therapeutisch angewendet. Tretinoin (ATRA) wird zur äußerlichen Behandlung von Acne vulgaris aufgrund seiner keratolytischen und antiproliferativen Wirkung eingesetzt. Darüberhinaus wird es auch zur Therapie der akuten Promyelozytenleukämie (APL), einem Subtyp der akuten myeloischen Leukämie (AML), eingesetzt [49, 50]. Isotretinoin (13-cis RS) ist ebenfalls zur Behandlung von Acne vulgaris zugelassen und wird bei weiteren dermatologischen Erkrankungen wie therapieresistenter Rosazea und gramnegativer Follikulitis extern und intern eingesetzt [51]. Weitere synthetische Retinoide wie Acitretin (aromatisches Derivat von ATRA) oder Tazaroten (nur in den USA zugelassen) werden zur Behandlung der Psoriasis bzw. Akne eingesetzt [52, 53]. Alitretinoin (9-cis RS) ist seit kurzem in Europa zur

Behandlung des therapieresistenten chronischen Handekzems zugelassen [54]. Die Zulassung in Deutschland erfolgte im November 2008.

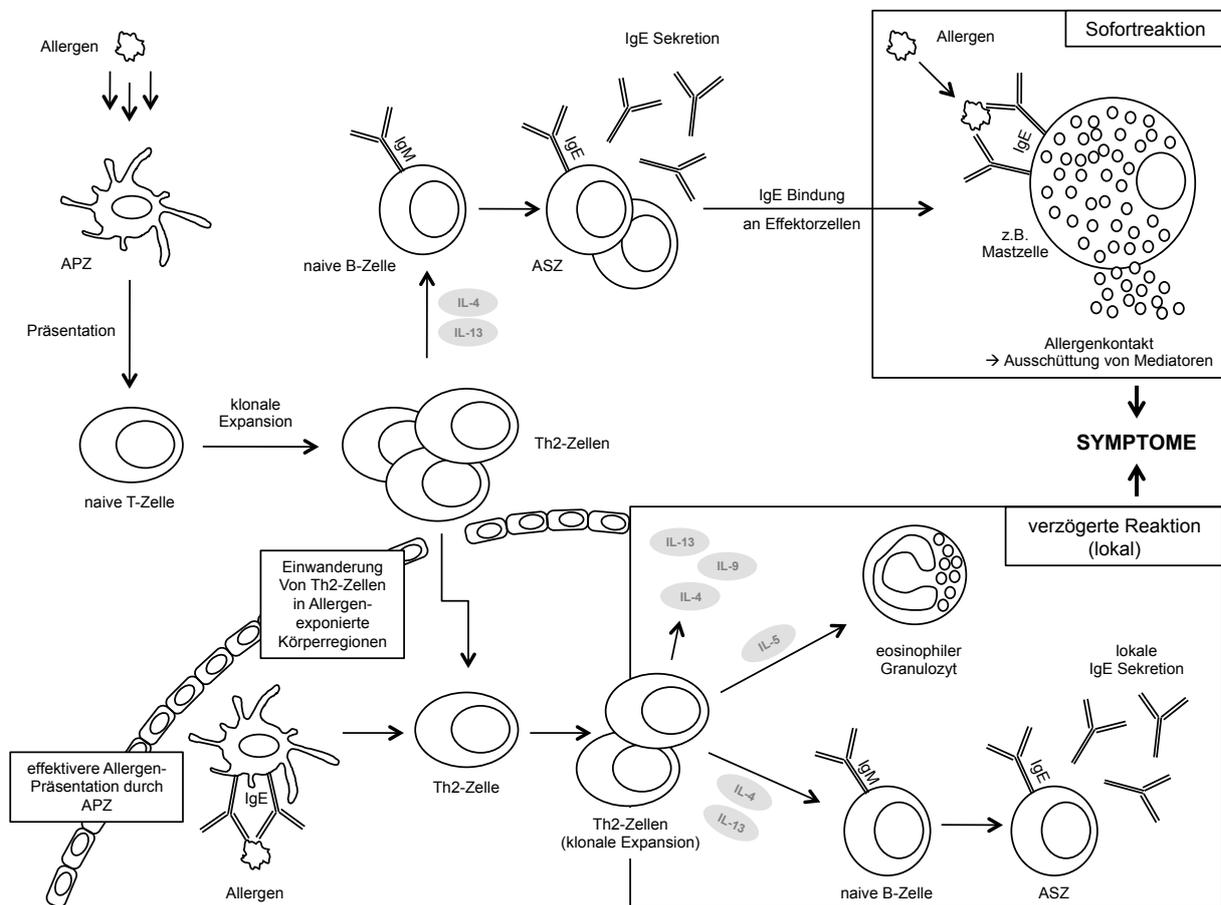
## **1.2. Typ-I-Allergien**

Als Allergie wird eine Erkrankung des adaptiven Immunsystems bezeichnet, die sich durch eine Hypersensitivität auf normalerweise harmlose Umweltsubstanzen (sog. Allergene), wie z.B. Pollen, Nahrungsmittel und Medikamente auszeichnet. Dabei wird das Immunsystem im Gegensatz zu anderen Hypersensitivitätsreaktionen schon bei minimalen Allergendosen maximal aktiviert. Nach Coombs und Gell werden IgE-vermittelte Allergien als Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I eingeteilt [55]. Daneben existieren weitere Hypersensitivitätsreaktionen wie der Antikörper-vermittelte zytotoxische Typ II, der Immunkomplex-Typ III und der verzögerte T-Zell-vermittelte Typ IV [55].

### **1.2.1. Sensibilisierungs- und Effektorphase**

Im Folgenden wird im Detail auf die molekularen Mechanismen von Typ-I-Allergien eingegangen. Am Anfang steht die Sensibilisierung des Immunsystems auf ein sonst ungefährliches Antigen, das bei erstmaligem Eintritt in den Körper von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, in Peptidstücke prozessiert und nach Wanderung in die lokalen Lymphknoten auf der Zelloberfläche über MHC-II-Rezeptoren (*major histocompatibility complex*) dem T-Zell-Rezeptor (TZR) auf T-Zellen präsentiert wird. Die folgende Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen bestimmt den weiteren Verlauf der Immunreaktion. Im Falle einer allergischen Sensibilisierung bilden sich vor allem Th2-Zellen, die die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produzieren [56]. Diese aktivieren wiederum durch Bindung von CD40 an CD40-Ligand und durch Ausschüttung von IL-4 und IL-13 naive B-Zellen, die dort den Isotypenklassenwechsel zu IgE induzieren, proliferieren und zu spezifischen ASZ differenzieren [57]. Die von den ASZ sezernierten antigenspezifischen IgE-Antikörper gelangen in den Blutkreislauf und binden über den hochaffinen Rezeptor Fcε-RI an Effektorzellen, wie z.B. Mastzellen, die sich u.a. perivaskulär in den Schleimhäuten und in der Haut befinden, sowie an im Blutstrom zirkulierende eosinophile und basophile Granulozyten [58]. Somit finden sich nach einer Allergen-Sensibilisierung im gesamten Körper mit spezifischem IgE beladene Effektorzellen. Interessanterweise wird die grundlegende Ätiologie der Th2-Immunantwort bei der Abwehr von Parasiten vermutet [59]. Durch sie ist der Körper in der Lage, Parasiten ohne Ausbildung einer Th1-dominierten Entzündungsreaktion abzuwehren [59].

Die Effektorphase beginnt nach erneuter Allergenexposition, z.B. durch Einatmen, Nahrungsaufnahme oder über die Haut. Nach Bindung an mastzellgebundene, antigenspezifische IgE-Antikörper führt dies zu einer Quervernetzung von zwei IgE-Antikörpern und im nächsten Schritt zur sofortigen Aktivierung und Freisetzung von biologisch aktiven Mediatoren (z.B. Histamin, Zytokine, Leukotriene, Prostaglandine und Chemokine) aus den Effektorzellen, die unmittelbare allergische Symptome wie Juckreiz, Rötung, Schwellung, Rhinokonjunktivitis und Bronchokonstriktion induzieren. Auf diese sofortige Reaktion kann eine verzögerte Reaktion folgen. Diese ist immunologisch durch die Einwanderung von Entzündungszellen und antigenspezifischen Th2-Zellen in die von der Allergenexposition betroffenen Körperregionen gekennzeichnet. Die dort residenten APZ prozessieren das Allergen durch Bindung von antigenspezifischen IgE-Antikörpern auf ihrer Oberfläche effektiv und reaktivieren die



**Abb. 2 – Sensibilisierungs- und Effektorphase der Typ-I-Allergie.**

Das Allergen induziert eine Th2-gerichtete Immunreaktion mit Bildung von IgE-Antikörpern, die an Mastzellen binden. Eine erneute Allergenexposition führt zu einer unmittelbaren IgE-vermittelten Freisetzung von Entzündungsmitteln (Sofortreaktion). Die verzögerte Reaktion resultiert aus der Einwanderung von Th2-Zellen in Allergen-exponierte Körperregionen mit nachfolgender Aktivierung von weiteren Immunzellen, was eine weitere lokale allergische Reaktion zur Folge hat (Bild abgeleitet von [58]).

einwandernden Th2-Zellen [60]. Diese unterlaufen erneut eine klonale Vermehrung und induzieren über IL-5 die Einwanderung und Aktivierung eosinophiler und basophiler Granulozyten, welche weitere Entzündungsmediatoren freisetzen. Weiterhin verstärken die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 lokal die Mukusproduktion als auch die Atemwegshyperreaktivität und stimulieren B-Zellen zur Differenzierung und Sekretion lokaler IgE-Antikörper. Diese Immunreaktion führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die zur typischen Symptomatik der allergischen Rhinokonjunktivitis beiträgt [61] (Abb. 2). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine übermäßige Differenzierung von Th2-Zellen und die Bildung antigenspezifischer IgE-Antikörper die Hauptrolle in der allergischen Hypersensitivitätsreaktion des Immunsystems spielen.

### **1.2.2. Klinische Manifestation**

Die Symptome einer allergischen Soforttypreaktion stellen sich unmittelbar nach Aufnahme des Allergens über die Haut, die Schleimhäute, den Respiration- oder den Gastrointestinaltrakt ein. Nach Allergenaufnahme über den Respirationstrakt tritt eine allergische Rhinokonjunktivitis auf, die an der Nase zu Pruritus, anfallsartigen Niesattacken, klarer Rhinorrhoe, Hyposmie und zu trockener, geschwollener und empfindlicher Nasenschleimhaut führt [62]. Die Augen sind durch Juckreiz, Schwellung und vermehrten Tränenfluss betroffen. Gelegentlich besteht auch Pruritus der Mundschleimhaut, des Pharynx, der äußeren Gehörgänge oder eine generelle urtikarielle Reaktion. Die Reaktion der Bronchien manifestiert sich als allergisches Asthma bronchiale. Anzeichen dafür sind trockener Reizhusten nach Allergenexposition und physischer Anstrengung sowie rezidivierende Bronchitiden [62]. Es kann sich ein lebensbedrohlicher Status asthmaticus entwickeln. Klinisch zeigen die Patienten Dyspnoe sowie ein auskultatorisches Giemen und Brummen.

Eine lebensbedrohliche Form der Soforttypreaktion ist die Anaphylaxie, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach Allergenexposition je nach Schweregrad zu gastrointestinalen Symptomen, Bronchokonstriktion, Kreislaufkollaps und generalisierter Urtikaria führt. Eine Anaphylaxie kann zum Tode führen (anaphylaktischer Schock). Anaphylaktische Reaktionen werden meist durch Insektengifte, Nahrungsmittel und Medikamente ausgelöst. Zur Verbesserung der Versorgung der Betroffenen sammelt seit 2006 das Anaphylaxie-Register im deutschsprachigen Raum Daten über Auslöser, Kofaktoren und Begleiterkrankungen von Anaphylaxiepatienten [63].

### **1.2.3. Immuntherapeutische Konzepte**

#### **1.2.3.1 Spezifische Immuntherapie**

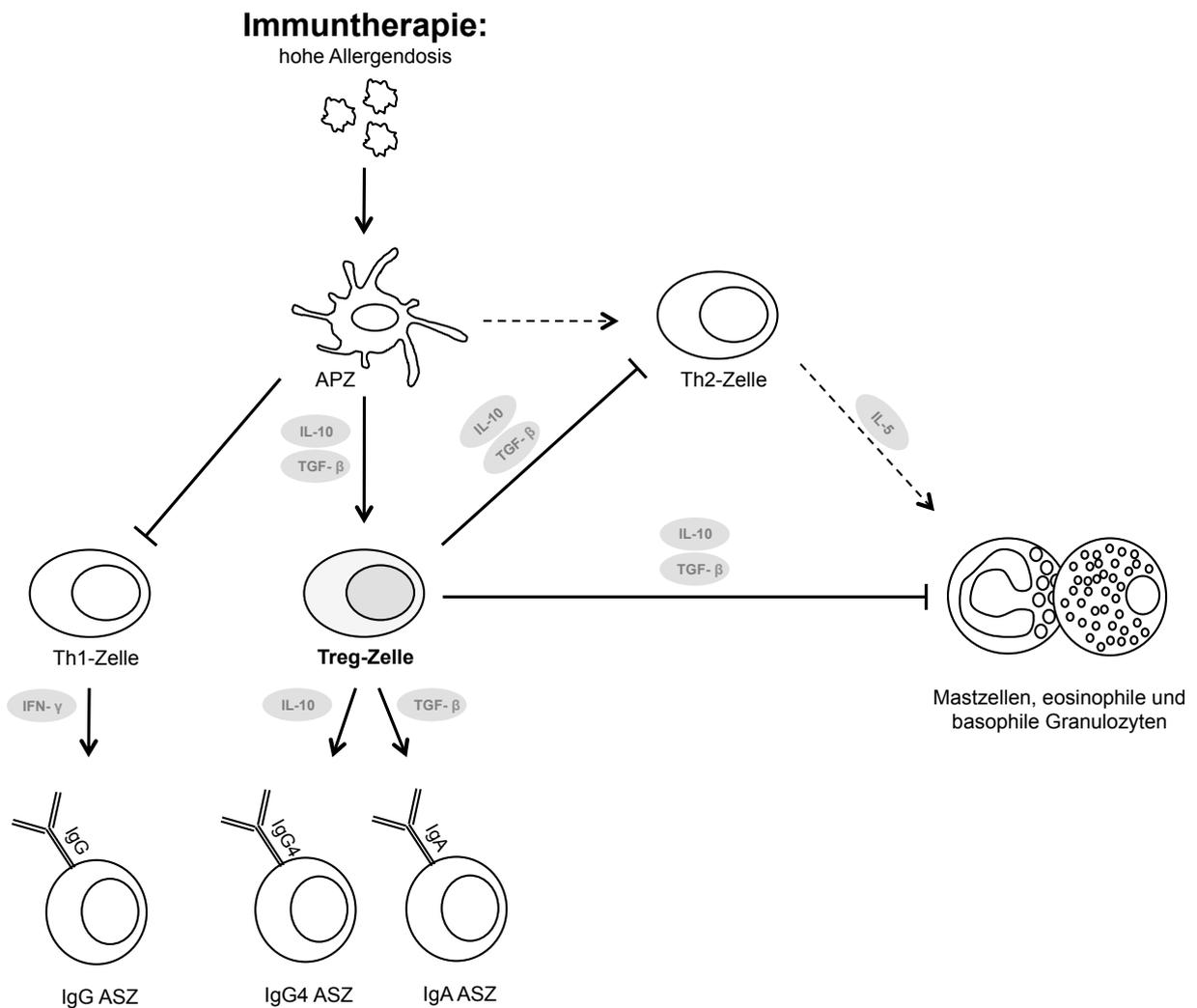
Die SIT ist der momentan einzige kausale Therapieansatz IgE-vermittelter Allergien. Dazu werden in der Regel über 3 bis 5 Jahre hochdosiert Allergene verabreicht, auf die das Immunsystem des Patienten sensibilisiert ist. Die Therapie wurde erstmalig von Noon et al. im Jahre 1911 beschrieben [64]. Die Wirksamkeit der SIT wurde in zahlreichen Studien für verschiedene Allergene belegt, dazu zählen vor allem Wespen- und Bienengift- sowie Pollen- und Hausstaubmilbenallergien, weniger Schimmelpilz- und Tierhaarallergien [9]. Die Indikation zur SIT ist durch den Nachweis einer IgE-vermittelten Sensibilisierung mit korrelierender klinischer Symptomatik gegeben, wenn eine Allergenkarrenz nicht möglich ist [9].

Aktuell gibt es zwei Möglichkeiten der Therapiedurchführung, einerseits die konventionelle Methode mittels subkutaner Injektion (SCIT) und andererseits die sublinguale Immuntherapie, bei der das Allergen in Form von Tabletten oder Tropfen über die Mundschleimhaut appliziert wird [65]. Weiterhin existieren verschiedene Behandlungsschemata, darunter die klassische Applikation, bei der das Allergen prä- oder postsaisonal in wöchentlich steigender Dosis bis zum Erreichen einer Erhaltungsdosis appliziert und daraufhin eine Erhaltungstherapie mit fortlaufenden Injektionen im Abstand von 4-6 Wochen (im Regelfall über 3 Jahre) durchgeführt wird. Bei der Rush-SIT wird das Allergen in wenigen Tagen mit mehreren Applikationen auf die Erhaltungsdosis gebracht. Sie bietet durch schnelles Erreichen der Erhaltungsdosis Vorteile bei Insektengiftallergikern, die oft schwere anaphylaktischen Reaktionen erlitten haben [65]. Bei der Cluster-SIT wird das Allergen mehrfach täglich an einem Tag in der Woche über mehrere Wochen bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis appliziert [65]. In neueren Forschungsarbeiten wurde auch die Möglichkeit einer epikutanen (ELIT) oder intralymphatischen Immuntherapie (ILIT) überprüft, beide zeigen bei ausgezeichneter Sicherheit vielversprechende Ergebnisse [66, 67]. Die Wirksamkeit der ILIT wurde kürzlich in einer doppel-blinden randomisierten Studie erneut demonstriert [68]. Eine Multicenterstudie zur Bestätigung der bisher publizierten Daten steht jedoch noch aus.

#### **1.2.3.2 Mechanismen**

Die SIT führt zu einer nachhaltigen antigenspezifischen Immuntoleranz, da sie aktiv in die antigenspezifische Immunantwort eingreift und im Speziellen die vermehrte Induktion von Th2-Zellen beeinflusst. Jedoch ist die exakte Wirkungsweise der SIT noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die SIT die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-, Th2- und Th17-

Zellen hemmt und die Bildung regulatorischer Treg-Zellen fördert. Dabei spielt die Förderung der Produktion tolerogener Faktoren wie TGF- $\beta$  und IL-10 durch APZ und auch durch Treg-Zellen eine Rolle [69, 70]. Jedoch zeigen andere Studien, dass IL-10 allein nicht zur Induktion von regulatorischen T-Zellen fähig ist [71]. Weiterhin ist bekannt, dass Treg-Zellen eine vermehrte Induktion von IgG4 und IgA in B-Zellen bewirken, die Bildung von inflammatorischen dendritischen Zellen und die Migration von Th2-Zellen in inflammatorisches



**Abb. 3 – Immunologische Wirkungsweise der spezifischen Immuntherapie.**

Die mehrfache Applikation von hochdosiertem Allergen infolge einer SIT induziert eine spezifische Allergentoleranz im Immunsystem, deren Ursachen nicht vollständig geklärt sind. Bekannt ist, dass die sich Ratio von Th1/Th2/Th17 und Treg-Zellen zugunsten der regulatorischen T-Zellen verschiebt, wahrscheinlich beeinflusst von durch die SIT modulierten APZ. Die Treg-Zellen inhibieren Th2-Immunantworten, induzieren einen Isotypenklassenwechsel in B-Zellen zu IgG4 und IgA und hemmen direkt allergische Effektorzellen wie Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten. IL-10 und TGF- $\beta$  werden dabei als entscheidende regulatorische Zytokine diskutiert. Gestrichelte Pfeile: allergische Immunreaktion. Schwarze Pfeile: Einfluss der SIT auf die Immunreaktion.

Gewebe hemmen sowie suppressive Effekte auf Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten haben [72, 73]. Dagegen reduzieren sich die spezifischen IgE-Werte im Verlauf einer langjährigen Therapie nur zögerlich und korrelieren nicht mit der verminderten Symptomatik [74]. Derzeit wird die Induktion von anti-inflammatorischen IgG4-Antikörpern, die Antigene neutralisieren können und die kein Komplement-System aktivieren, als möglicher Grund für den Therapieerfolg diskutiert [70]. Schließlich vermindern die nachhaltigen Effekte der SIT nicht nur Allergen-getriggerte, sondern auch hyperreaktive Immunreaktionen auf unspezifische Reize [75] (Abb. 3).

### **1.2.3.3 Mögliche adjuvante Wirkung von 9-cis Retinsäure**

Epidemiologische Studien weisen auf eine mögliche Beziehung zwischen niedrigen Vitamin-A-Spiegeln im Serum und der bei allergischen Erkrankungen zugrunde liegenden Hyperreaktivität des Immunsystems hin [76, 77]. Weiterhin wurde bei Patienten mit einer atopischen Dermatitis über eine verminderte Retinol-Konzentration in der Haut berichtet [18]. Zudem spielt RS die entscheidende Rolle bei der Ausbildung oraler Toleranz, u.a. vermittelt durch Treg-Zellen und IgA-Antikörper [35, 43], und kann den IgE-Isotypenklassenwechsel von B-Lymphozyten direkt inhibieren [45]. Diese Eigenschaften qualifizieren RS als mögliches Adjuvans für die SIT. 9-cis RS stellt dabei das vielversprechendste Isomer dar, da sie an RXR Rezeptoren bindet, die u.a. mit den nukleären Hormonrezeptoren RAR, VDR, PPAR $\gamma$  und LXR heterodimerisieren, und somit auf verschiedensten Wegen transkriptionell aktiv oder repressiv wirken kann [16]. Analog dazu konnte bereits eine potentiell adjuvante Funktion von aktivierten RXR-Heterodimeren in einem Typ-I-Allergiemodell der Maus gezeigt werden. Hier wurden die Wirkungen über eine Aktivierung und Heterodimerisierung von VDR mit RXR durch 1,25-Dihydroxyvitamin D (physiologisch aktives Vitamin D) vermittelt [78].

## **2. Zielsetzung dieser Arbeit**

In der folgenden Arbeit wurde in einem Typ-I-Allergie Mausmodell sowie mittels Experimenten bei *in vitro* stimulierten humanen B-Zellen in einem T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen Kontext untersucht, ob Immuntoleranz infolge der spezifischen Immuntherapie (SIT) durch den kombinierten Einsatz mit 9-cis Retinsäure optimiert werden kann und welche Immunzellen an diesem Prozess beteiligt sein könnten.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Materialien (Anhang 6.3)**

#### **3.2. Murines Typ-I-Allergie-Modell**

##### **3.2.1. Sensibilisierung und spezifische Immuntherapie in der Maus**

6-8 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse (Janiver, Le Genest Saint Isle, Frankreich) wurden im Tierstall der Charité (Hessische Str. 3-4) in einem spezifischen pathogenfreien Umfeld (SPF) nach Genehmigung vom Landesamt für Gesundheit und Soziales gehalten (Antragsnummer G0012/09, genehmigt am 14.04.2009). Es wurde eine Ovalbumin-spezifische Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin (OVA; Grade V, Sigma-Aldrich), in dem Adjuvans Aluminium-Magnesium-Hydroxid (Alum Imject; Cat.: 77161, Thermo Scientific) gelöst, an Tag 0, 14 und 21 per intraperitonealer Injektion durchgeführt. An Tag 56, 63 und 70 wurde die OVA-Immuntherapie mit einer subkutanen Injektion von 100 µg OVA in Alum durchgeführt (nach Dosisfindung; s. Allergie-Centrum-Charité, AG Prof. Worm, Dr. Björn Hartmann, unpublizierte Daten). 9-cis RS wurde jeweils 3 Tage vor, am Tag der Immuntherapie und 3 Tage danach in der Konzentration von 3 bzw. 30 mg/kg (gelöst in 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Cat.: D8418, Sigma) und 20 % Tween 80 (P8074, Sigma-Aldrich) in isotoner Natriumchloridlösung (NaCl; Braun)) subkutan (s.c.) verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt zum selben Zeitpunkt 10 % DMSO und 20 % Tween 80 in NaCl. Die Dosis von 3 mg/kg entspricht der normalen Anwendungsdosis beim Menschen von 0,43 mg/kg, umgerechnet auf die Körperoberfläche der Maus [79]. Die Dosis von 30 mg/kg entspricht der humanen Dosis von 2,43 mg/kg. An Tag 109 erhielten die Mäuse 10 µg OVA in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) per intraperitonealer Injektion (OVA-Exposition), um eine allergische Reaktion auszulösen. 6 Tage später wurden die Mäuse analysiert (Abb. 4).

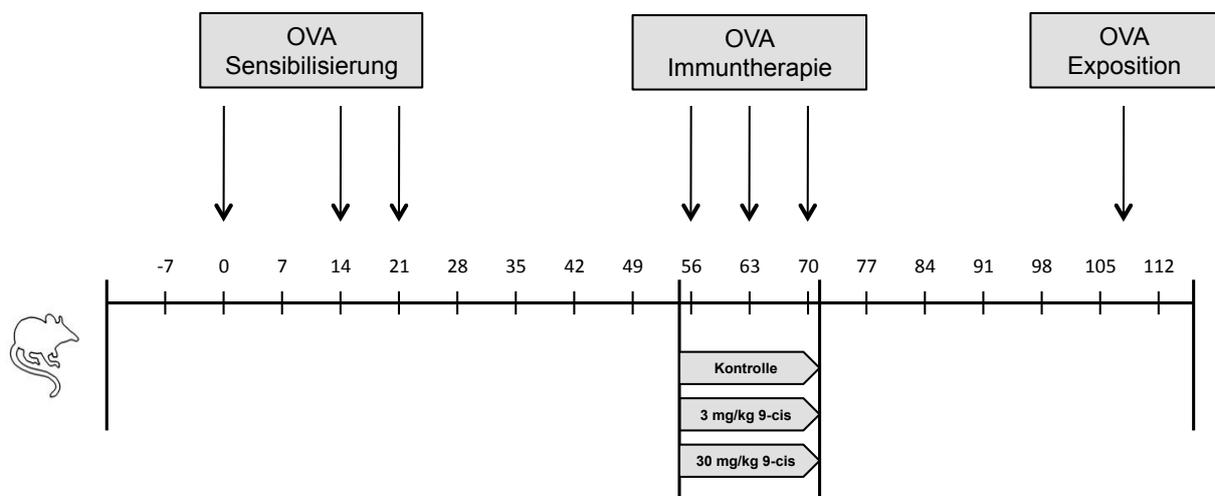
##### **Blutentnahmen**

An den Tagen 0, 51, 77, 109 und 115 wurde den Mäusen Blut entnommen. An den ersten 4 Tagen erfolgte die Blutentnahme via Punktion der Vena facialis und anschließender Gewinnung von ca. 100 - 200 µl Blut. An Tag 115 erfolgte eine finale Blutentnahme aus der V. ophtalmica.

##### **Präparation der Organe**

Den Mäusen wurden Milz, Oberschenkelknochen sowie axiale, mesenteriale und inguinale Lymphknoten entnommen. Milz und Lymphknoten wurden mithilfe von feinmaschigen

Nylonnetzen (100 µm und 40 µm, Cat.: 352360 und 352340, BD Falcon) zerkleinert und in eine Einzelzellsuspension in PBS überführt. Das Knochenmark wurde mit einer Spritze mit PBS aus dem Oberschenkelknochen gespült und ebenfalls in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin mit 340 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, in 2,5 ml Erythrozyten-Lysepuffer (*RBC-Lysisbuffer*, Cat.: 420301, BioLegend) für 5 min inkubiert und anschließend erneut mit 340 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 20 ml PBS aufgenommen und in einem automatischen Zellzähler (*CASY Cell Counter + Analyser Model TTC*, Innovatis AG) gezählt.



**Abb. 4 – Therapieschema des Tiermodells.**

6-8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden an Tag 0, 14 und 21 mit Ovalbumin (OVA) und dem Adjuvans Aluminium-Magnesium-Hydroxid (Alum) sensibilisiert. An Tag 56, 63 und 70 erfolgte die OVA-Immuntherapie (SIT) ± 9-cis RS in den Konzentrationen 3 mg/kg und 30 mg/kg. An Tag 109 erfolgte eine erneute Injektion von OVA (OVA-Exposition) zur Induktion einer allergischen Reaktion mit nachfolgender Analyse der Mäuse an Tag 115.

### 3.2.2. Quantifizierung der humoralen antigenspezifischen Immunantwort

Die humorale Immunreaktion im Rahmen der spezifischen Immuntherapie wurde durch Messung des antigenspezifischen Immunglobulinprofils bestimmt. Als Messgrößen dienten die Serumkonzentrationen sezernierter Antikörper unterschiedlicher Isotypen sowie die Anzahl antikörpersezernierender Zellen in verschiedenen Geweben.

#### 3.2.2.1 Messung der Serum-Antikörper

Es wurde die Konzentration von OVA-spezifischem IgE, IgA, IgG1 und Gesamt-IgE per ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) aus den gewonnenen Seren gemessen. Die 96-well

Microtiter-Platten (Nunc, Dänemark) wurden zwischen jedem Experimentschritt 3x mit PBS-Tween20 0,05 % gewaschen und die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders genannt, bei 20°C Raumtemperatur. Die Analyse der Platten erfolgte an einem ELISA-Lesegerät (*MRX - Elisareader*, Dynex Technologies).

### **OVA-IgE ELISA**

Die 96-well ELISA-Microtiter-Platten wurden über Nacht bei 4°C mit einem anti-Maus IgE Antikörper (aufgereinigter Ratten-anti-Maus-IgE, R35-72, 553413, BD Pharmingen) beschichtet und im darauffolgenden Schritt für 1 Stunde mit 3 % Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS geblockt. Danach wurde ein Serum-Standard in einer initialen Verdünnung von 1:2 und das zu untersuchende Serum in einer initialen Verdünnung von 1:80 auf die Platte aufgetragen, seriell 1:2 verdünnt und für 2 Stunden in 1 % BSA in PBS inkubiert. Es folgte eine Beschichtung mit biotinyliertem OVA (0,625 µg/ml, Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ)) in 1 % BSA in PBS für 2 Stunden und anschließend die Detektion durch 60-minütige Beschichtung mit Streptavidin-gebundener Meerrettich-Peroxidase (1:1000, AEM 6208122, R&D) und Substratinkubation mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB; 1 mg, T3405-100TAB, Sigma Aldrich) in TMB-Puffer. Die Serumwerte wurden als relative Labor-Einheiten (LU) der Serumverdünnung bestimmt.

### **OVA-IgA und -IgG1 ELISA**

Die 96-well ELISA-Microtiter-Platten wurden über Nacht bei 4°C mit 5 µg/ml Ovalbumin beschichtet und im darauffolgenden Schritt für 1 Stunde mit 3 % Milchpulver in PBS geblockt. Danach wurde für OVA-IgA ein Serum-Standard in einer initialen Verdünnung von 1:10 und das zu untersuchende Serum in einer initialen Verdünnung von 1:10<sup>4</sup> auf die Platte aufgetragen, seriell 1:2 verdünnt und für 2 Stunden in 1 % Milchpulver in PBS inkubiert. Für OVA-IgG1 wurde ein Antikörper-Standard (1 µg/ml, OVA-14, IgG1, A6075, Sigma) in einer initialen Verdünnung von 1:10<sup>4</sup> und das zu untersuchende Serum in einer initialen Verdünnung von 1:10<sup>6</sup> auf die Platte aufgetragen, seriell 1:2 verdünnt und für 2 Stunden in 1 % Milchpulver in PBS inkubiert. Es folgte eine Beschichtung mit biotinyliertem anti-IgA (10 ng/ml, 1040-08, Southern Biotech) bzw. anti-IgG1 (500 ng/ml, A 85-1, BD Pharmingen) in 1 % Milchpulver in PBS für 2 Stunden und anschließend die Detektion durch 60-minütige Beschichtung mit Streptavidin-gebundener Meerrettich-Peroxidase (1:1000, AEM 6208122, R&D) und Substratinkubation mit TMB (1 mg, T3405-100TAB, Sigma Aldrich) in TMB-Puffer. Die Serumkonzentration für OVA-IgA wurde als relative Labor-Einheiten (LU) der Serumverdünnung bestimmt. Die

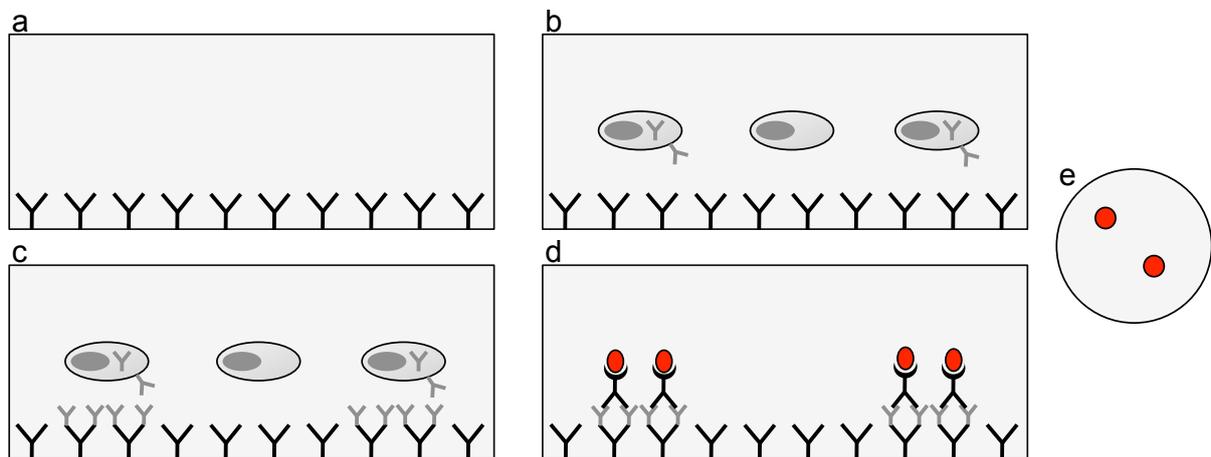
Serumkonzentration für OVA-IgG1 wurde als absolute Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$  vom angewendeten IgG1-Standard-Antikörper bestimmt.

### Gesamt-IgE ELISA

Die 96-well ELISA-Microtiter-Platten wurden über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit einem anti-Maus IgE Antikörper (aufgereinigter Ratten-anti-Maus-IgE, R35-72, 553413, BD Pharmingen) beschichtet und im darauffolgenden Schritt für 1 Stunde mit 3 % Milchpulver in PBS geblockt. Danach wurden ein Antikörper-Standard (500 ng/ml, Maus IgE, 557079, BD Pharmingen) und das zu untersuchende Serum in einer initialen Verdünnung von 1:1000 auf die Platte aufgetragen, seriell 1:2 verdünnt und für 2 Stunden in 1 % Milchpulver in PBS inkubiert. Es folgte eine Beschichtung mit biotinyliertem anti-IgE (248 ng/ml, Klon EM 95.3, Metschnikoff Laboratory, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) in 1 % Milchpulver in PBS für 2 Stunden und anschließend die Detektion durch 60-minütige Beschichtung mit Streptavidin-gebundener Meerrettich-Peroxidase (1:1000, AEM 6208122, R&D) und Substratinkubation mit TMB (1 mg, T3405-100TAB, Sigma Aldrich) in TMB-Puffer. Die Serumwerte wurden als absolute Konzentrationen in ng/ml vom angewendeten IgE-Standard-Antikörper bestimmt.

#### 3.2.2.2 Bestimmung von antikörperproduzierenden Zellen

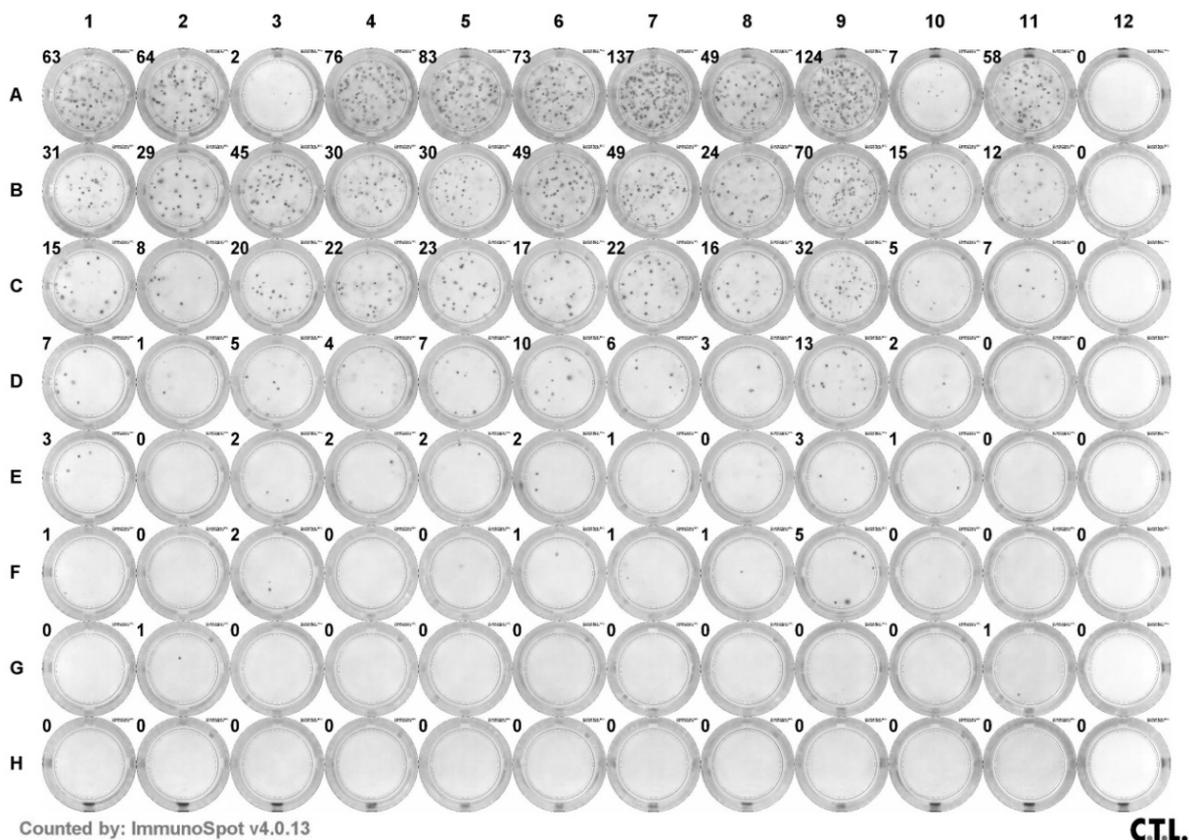
Es wurden OVA-spezifische IgG1, -IgA und -IgE sezernierende Zellen mittels ELISPOT (*Enzyme Linked Immuno Spot Technique*) gemessen, dessen Prinzip in Abb. 5 dargestellt ist.



**Abb. 5 – Schematische Darstellung des ELISPOT-Prinzips.**

Im ersten Schritt wird eine ELISPOT-Microtiterplatte mit Antikörpern beschichtet, die gegen ein Zielprotein gerichtet sind (a). Dann wird die Platte mit den zu analysierenden Zellen beschichtet (b). Einige Zellen sezernieren die Zielproteine, die von den Antikörpern gebunden werden (c). Nach Entfernung der Zellen wird die Platte mit Enzym-gekoppelten Detektionsantikörpern beschichtet, die nach Zugabe eines Substrates einen punktuellen Farbumschlag bewirken (d). Im Mikroskop lassen sich daraufhin Rückschlüsse auf die Anzahl der Zellen ziehen (e).

Alle Arbeitsschritte fanden, sofern nicht anders angegeben, bei 20°C Raumtemperatur statt, und es wurde jeweils abschließend 3x mit 300 µl entsprechender Waschlösung gewaschen. Zu Beginn wurden 96-well-Microtiterplatten (Multiscreen HTS Cat. MSIPN4550, Millipore) mit 100 µl einer 100 µg/ml OVA/PBS-Lösung über Nacht bei 4° beschichtet. Am nächsten Tag wurden unspezifische Bindungen mit 1:1 verdünntem 10 % fetalem Kälberserum (FCS) in RPMI-1640 Zellkulturmedium und 3 % BSA in PBS für 1 Stunde bei 37°C geblockt. Darauf wurden  $2 \times 10^7$  Zellen / 300 µl aus den entsprechenden Organen (Milz und Knochenmark) aufgetragen, seriell 1:2 verdünnt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach entsprechendem Waschschritt mit 0,5 % BSA/PBS wurden die sezernierten Antikörper mit einem biotinylierten anti-IgG1 (0,5 µg/ml Klon A85-1, BD Pharmingen), anti-IgA (1 µg/ml Klon 1040-08, Southern Biotech) oder anti-IgE (1 µg/ml Klon EM 95.3, DRFZ) Antikörper für 4 Stunden detektiert. Die kolorimetrische Reaktion erfolgte nach Inkubation mit 0,33 µg/ml Streptavidin-gebundener



**Abb. 6 – Repräsentative 96-well-ELISPOT-Microtiterplatte.**

Diese Darstellung zeigt die Detektion von OVA-IgA sezernierenden Milzzellen. Jeder Punkt entspricht einer OVA-IgA sezernierenden Zelle (die Gesamtzahl wurde von der Software ImmunoSpot bestimmt und ist neben jedem Well angegeben). Jede Säule entspricht einer Probe. Die serielle 1:2 Verdünnung jeder Probe wurde von Reihe A bis H durchgeführt.

Meerrettich-Peroxidase (HRP) für 60 Minuten und dem Substrat 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) in N-N-Dimethylformamid (DMF) in ELISPOT-Substratlösung. Die Zählung der OVA-spezifischen antikörpersezernierenden Zellen erfolgte mittels automatischer Messung der ELISPOT-Platten innerhalb von 1 Woche unter Verwendung eines ELISPOT-Readers (CTL-ImmunoSpot S5 Core Analyzer). Zur Auswertung wurde die Software CTL ImmunoSpot Professional Software Version 4.0 benutzt. Die Definition zur automatischen Erkennung der antikörpersezernierenden Zellen auf den gewonnenen Fotografien erfolgte initial manuell und wurde im Verlauf regelmäßig validiert (Abb. 6).

### **3.2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse antikörperproduzierender B-Zellen**

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen auf bestimmte Eigenschaften untersuchen, wie z.B. Größe und Granularität sowie die Expression von bestimmten Antigenen oder Zytokinen auf der Zelloberfläche bzw. intrazellulär. In dieser Arbeit wurden OVA-spezifische IgG1-Plasma- und Gedächtniszellen durchflusszytometrisch gemessen. Für die Färbung wurden die in Tab. 1 aufgeführten murinen Antigene mit den entsprechenden konjugierten Fluorochromen verwendet.

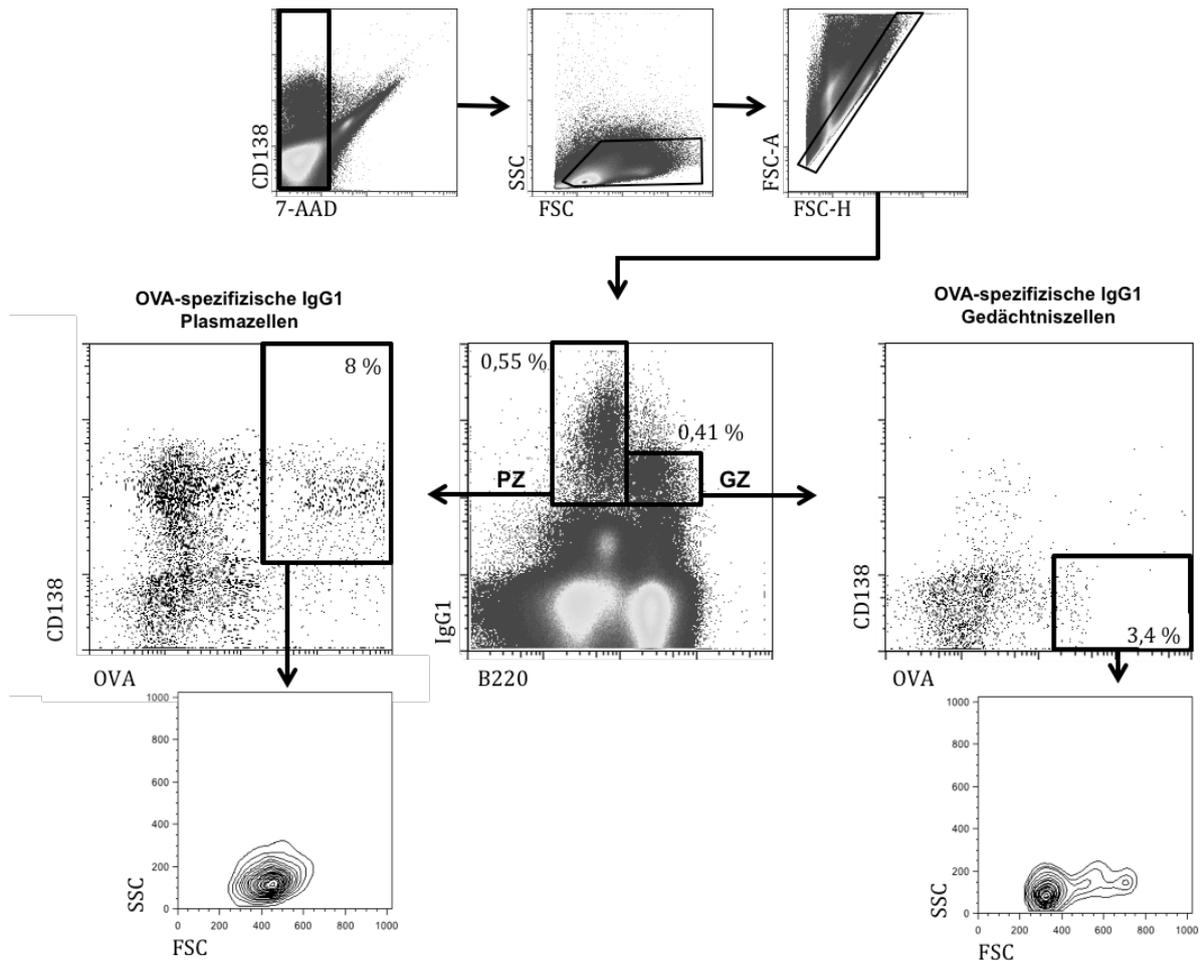
$2 \times 10^7$  Zellen wurden der Zellsuspension der zu analysierenden Organe entnommen und mit 660 g für 5 Minuten zentrifugiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einem anti-FC- $\gamma$ -Rezeptor-Antikörper (10,2  $\mu\text{g/ml}$ , 2.4G2, DRFZ), verdünnt in 1 % BSA/PBS, für 15 Minuten geblockt. Nachfolgend wurden die Proben mit 660 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zelloberfläche mit B220-Pacific Blue (1,83  $\mu\text{g/ml}$ , RA3.6B2, DRFZ), CD138-PE (400 ng/ml, 281-2, BD Pharmingen), 7-Aminoactinomycin (7-AAD) (1:150, Kategorie 00-6993-50, eBioscience) und CD38-PE-Cy7 (333 ng/ml, Klon 90, BioLegend) in 1 % BSA/PBS für 15 Minuten bei 4°C und eine abschließende Zentrifugation mit 660 g für 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1 % Paraformaldehyd in PBS für 30 Minuten bei 4°C fixiert, mit 1300 g für 8 Minuten zentrifugiert, mit 0,5 % Saponin in PBS permeabilisiert und erneut mit 1300 g für 8 Minuten zentrifugiert. Die Intrazellulärfärbung erfolgte mit OVA-FITC (848 ng/ml, DRFZ) und IgG1-APC (2  $\mu\text{g/ml}$ , X56, BD Pharmingen) in 1 % Saponin in PBS für 30 Minuten bei 4°C. Nach erneuter Zentrifugation mit 1300 g für 8 Minuten und Resuspension in 250  $\mu\text{l}$  1 % BSA/PBS wurden die Proben im Durchflusszytometer (MACS Quant Reader, Miltenyi Biotec) analysiert. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo (Tree Star, Inc.).

**Tab. 1 – Fluorochrom-gekoppelte Antigene der OVA-IgG1 Plasma- und Gedächtniszellfärbung.**

Antigen	Fluorochrom	Emissionsmaximum
B220	Pacific Blue	455 nm
OVA	FITC	518 nm
CD138	PE	575 nm
7-AAD	PerCP	647 nm
IgG1	APC	660 nm
CD38	PE-Cy7	760 nm

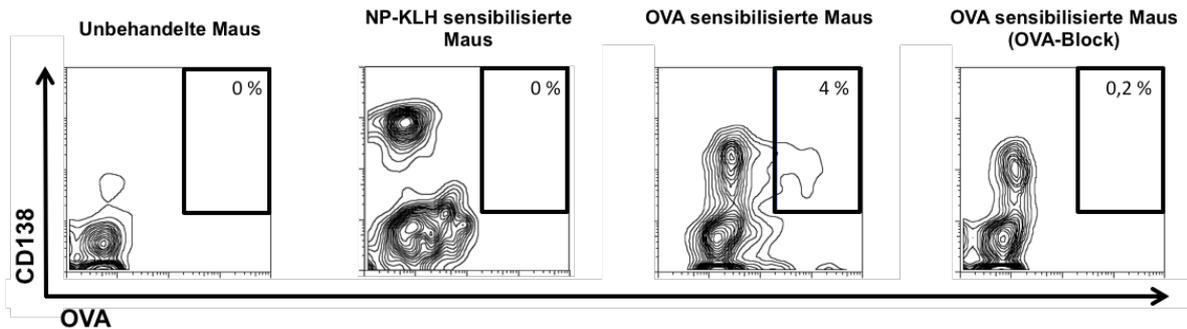
OVA-spezifische IgG1-Plasmazellen sind als B220-IgG1+CD138+OVA+ definiert, und OVA-spezifische IgG1 Gedächtniszellen sind als B220+IgG1+CD138-OVA+ definiert. 7-AAD interkaliert mit DNS und markiert tote Zellen.

Zur Bestimmung der OVA-IgG1-Plasmazellpopulation wurden im ersten Schritt 7-AAD-negative Zellen verwendet, da 7-AAD mit freier Desoxyribonukleinsäure (DNS) interkaliert und somit wie Propidiumiodid tote Zellen im PerCP-Kanal des Durchflusszytometers markiert. Zunächst wurden Lymphozyten mithilfe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts selektiert, nachfolgend wurden Zelldoubletten ausgeschlossen. Im nächsten Gate wurde die B220-IgG1+ Zellpopulation markiert und die CD138+OVA+ Plasmazellen untersucht [80]. Zur Erfassung der OVA-IgG1-Gedächtniszellen wurden B220+IgG1+ Zellen eingegrenzt und dann die CD138-OVA+ Zellpopulation untersucht (Abb. 7) [80]. Die Färbung wurde vor der Anwendung an OVA-sensibilisierten Mäusen etabliert. Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, wurde die Färbung an naiven und Nitrophosphat (NP-KLH) sensibilisierten Mäusen getestet. Die Sensitivität der Färbung wurde durch kompetitive Applikation von ungefärbtem OVA mit OVA-FITC an einer OVA-sensibilisierten Maus nachgewiesen, wo sich im Vergleich zur rein OVA-FITC gefärbten Kontrolle 20-mal weniger OVA-spezifische IgG1-Plasmazellen färben ließen (Abb. 8).



**Abb. 7 – Repräsentative Darstellung der Gate-Strategie einer OVA-IgG1-Plasmazellfärbung in der Milz einer OVA-sensibilisierten Maus.**

Einzelne lebende Lymphozyten wurden durch fehlende Färbung mit dem DNS-Interkalator 7-AAD dargestellt und nach Identifikation als Lymphoblasten im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) charakterisiert (obere Reihe). Fluoreszenz-markierte Färbungen von IgG1 wurden als B220+ und B220- B-Zellen definiert (mittleres Bild). Zur Erfassung der OVA-spezifischen IgG1-Plasmazellen wurde die IgG1+B220- Population auf CD138- und OVA-Positivität untersucht (linkes Bild in mittlerer Reihe). Die Erfassung der OVA-spezifischen IgG1-Gedächtniszellen gelang durch Untersuchung der IgG1+B220+ Population auf CD138-Negativität und OVA-Positivität (rechtes Bild in mittlerer Reihe). Die Definition der beiden Zellpopulationen wird durch die Betrachtung im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gestützt, die zeigt, dass die Plasmazellen (linkes Bild in unterer Reihe) einen größeren Durchmesser (FSC) und Granularität (SSC) als die Gedächtniszellen (rechtes Bild in unterer Reihe) besitzen.



**Abb. 8 – Spezifität und Sensitivität der OVA-IgG1-Plasmazellfärbung.**

Die Spezifität der OVA-IgG1 Plasmazellfärbung wurde an Milzen einer unbehandelten (naiven) und einer NP-KHL sensibilisierten Maus getestet (1. und 2. Bild links). Das 3. Bild von links zeigt die Färbung der Milz einer OVA-sensibilisierten Maus. Die Sensitivität wurde nach zusätzlicher Blockierung mit unmarkiertem OVA bestimmt (rechtes Bild - In Zusammenarbeit mit René Riedel, AG Radbruch, DRFZ Berlin).

### Bestimmung von Migrationsmarkern auf B-Zellen

Zur Erfassung des migratorischen Potentials von Lymphozyten wurden die Oberflächenmarker CCR9 und Integrin  $\alpha 4\beta 7$  mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Sie stehen im Zusammenhang mit der Zellwanderung von Lymphozyten in den Darm und werden durch Retinoide induziert [43]. Für die Färbung der Zellen wurden die in Tab. 2 aufgeführten murinen Antigene mit den entsprechenden konjugierten Fluorochromen verwendet.

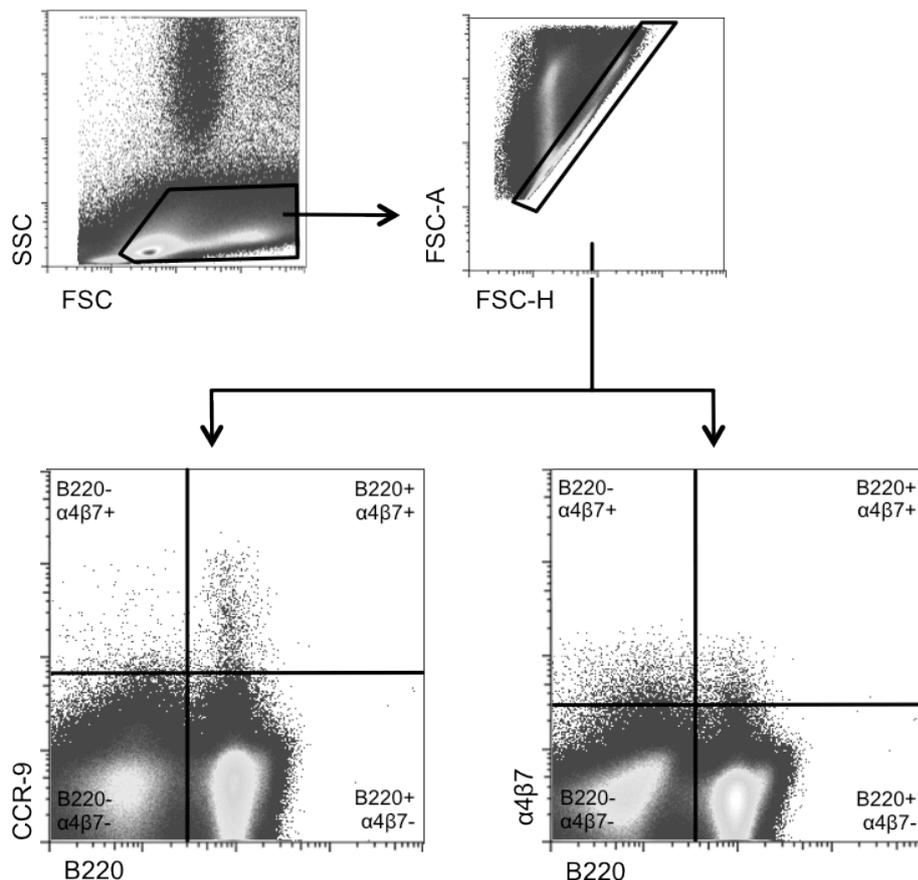
**Tab. 2 – Fluorochrom-gekoppelte Antigene der Migrationsmarker-Färbung.**

Antigen	Fluorochrom	Emissionsmaximum
B220	Pacific Blue	455 nm
OVA	FITC	518 nm
CCR9	PE	575 nm
Integrin $\alpha 4\beta 7$	PerCP	647 nm
IgG1	APC	660 nm
CD38	PE-Cy7	760 nm

Die Identifikation von migrierenden Zellen erfolgt mittels der Migrationsmarker CCR9 und Integrin  $\alpha 4\beta 7$ .

$2 \times 10^7$  Zellen wurden der Zellsuspension der zu analysierenden Organe entnommen und mit 660 g für 5 Minuten zentrifugiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einem anti-FC-

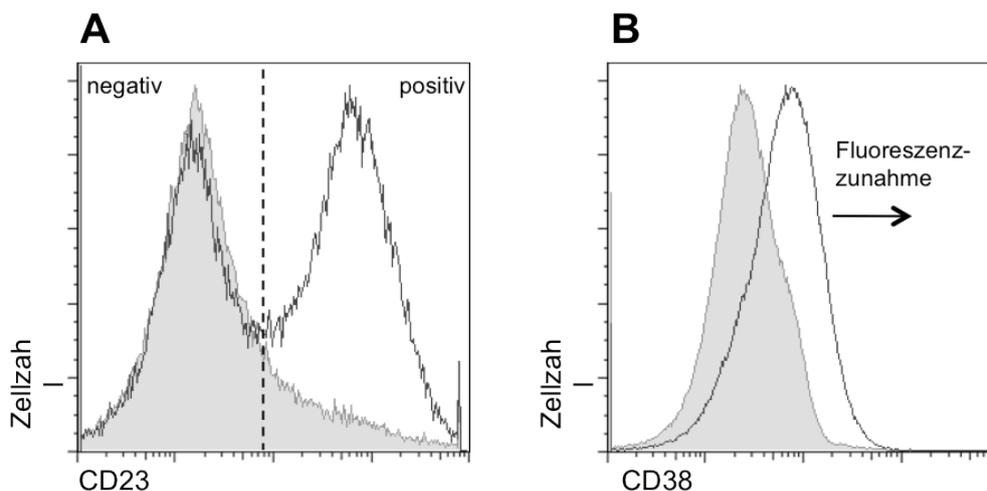
Rezeptor Antikörper (10,2 µg/ml, 2.4G2, DRFZ) verdünnt in 1 % BSA/PBS für 15 Minuten geblockt. Nachfolgend wurden die Proben mit 660 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zelloberfläche mit B220-Pacific Blue (1,83 µg/ml, RA3.6B2, DRFZ), CCR9-PE (0,312 µg/ml, Cat. FAB2160P, R&D Systems), biotinyliertem  $\alpha 4\beta 7$  (1:200, Klon DATK32, DRFZ) und CD38-PE-Cy7 (333 ng/ml, Klon 90, BioLegend) in 1 % BSA/PBS für 15 Minuten bei 4°C und eine abschließende Zentrifugation mit 660 g für 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1 % Paraformaldehyd in PBS für 30 Minuten bei 4°C fixiert, mit 1300 g für 8 Minuten zentrifugiert, mit 0,5 % Saponin in PBS permeabilisiert und erneut mit 1300 g für 8 Minuten zentrifugiert. Die Intrazellulärfärbung erfolgte mit OVA-FITC (848 ng/ml, DRFZ), IgG1-APC (2 µg/ml, X56, BD Pharmingen) und Streptavidin-PerCP (0.2 µg/ml, Cat. 554064, BD Pharmingen) in 1 % Saponin in PBS für 30 Minuten bei 4°C. Nach erneuter Zentrifugation mit 1300 g für 8 Minuten und Resuspension in 250 µl 1 % BSA/PBS wurden die



**Abb. 9 – Repräsentative Darstellung der Gate-Strategie einer Darm-Homing-Färbung von Milzzellen einer OVA-sensibilisierten Maus.**

Nach Aussortierung einzelner lebender Lymphozyten (oben) wurden diese in B220-CCR9-, B220+CCR9-, B220-CCR9+, B220+CCR9+ und B220- $\alpha 4\beta 7$ -, B220+ $\alpha 4\beta 7$ -, B220- $\alpha 4\beta 7+$ , B220+ $\alpha 4\beta 7+$  Populationen eingegrenzt und die Zellfrequenzen sowie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  analysiert.

Proben im Durchflusszytometer (*MACS Quant Reader*, Miltenyi Biotech.) analysiert. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Zur Bestimmung der Zellpopulation mit Darm-Homing-Rezeptorexpression wurden mithilfe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht Lymphozyten eingegrenzt und nachfolgend Zelldoubletten ausgeschlossen. Im nächsten Gate wurden die Lymphozyten auf die Migrationsmarker CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  untersucht, indem die Zellfrequenzen der Populationen B220-CCR9<sup>-</sup>, B220+CCR9<sup>-</sup>, B220-CCR9<sup>+</sup>, B220+CCR9<sup>+</sup> und B220- $\alpha 4\beta 7$ <sup>-</sup>, B220+ $\alpha 4\beta 7$ <sup>-</sup>, B220- $\alpha 4\beta 7$ <sup>+</sup>, B220+ $\alpha 4\beta 7$ <sup>+</sup> isoliert betrachtet wurden. Weiterhin wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  gemessen, um eine erhöhte Expression der Migrationsmarker innerhalb einer Population darzustellen (Abb. 9).



**Abb. 10 – Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.**

(A) Antigene mit einem binären zellulären Expressionsmuster wurden in eine dem Antigen entsprechende negative und positive Zellpopulation eingeteilt und die Antigenexpression mithilfe der relativen Zellfrequenzanalyse gemessen, wie im Beispiel der CD23 Expression auf B-Lymphozyten. (B) Die Antigenexpression von Zellen mit einem homogenen Expressionsmuster wurde mittels Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*; MFI) gemessen, wie im Beispiel der CD38 Expression auf B-Lymphozyten.

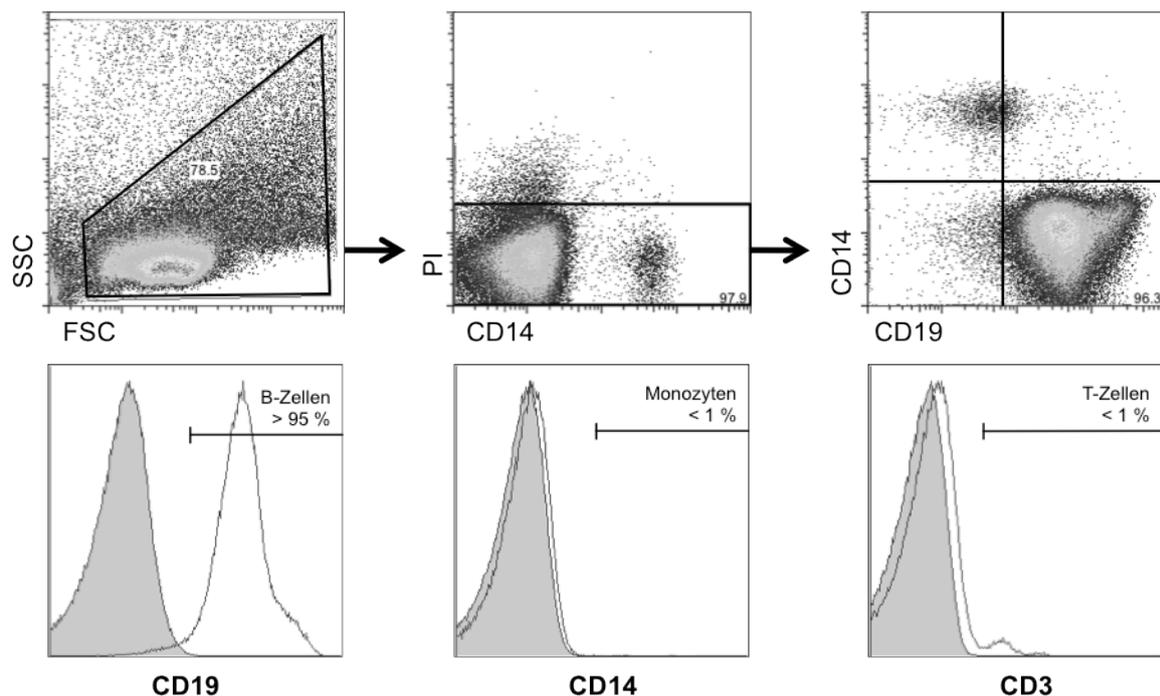
Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte prinzipiell durch Festlegung von Fluorochrom-negativen und -positiven Bereichen und eine anschließende Messung der relativen Zellfrequenzen in diesen Bereichen. Diese Methode ist besonders für Antigene geeignet, die eine Darstellung nach dem Binärprinzip (ein / aus) ergeben. Für den Fall einer Änderung der Antigenkonzentration einer Population ohne Ausbildung einer zusätzlichen positiven bzw. negativen Population wurde die Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI)

durchgeführt. Damit ließen sich die Konzentration eines Antigens pro Zelle und somit kleine Unterschiede in der Antigenexpression innerhalb einer Zelle bestimmen (Abb. 10).

### 3.3. Humanes *in vitro* Zellkulturmodell

#### 3.3.1. Isolierung und Stimulation von humanen B-Lymphozyten

Zur Gewinnung von humanen Lymphozyten wurden Blutfilter der Blutbank Charité-Campus Mitte verwendet. Die Blutfilter entstehen durch die Vorreinigung von Blutkonserven, bei der alle im Blut befindlichen Zellen außer Erythrozyten entfernt werden und im Filter verbleiben. In einem ersten Schritt wurden die Filter jeweils abwechselnd mit PBS-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entgegen der Blutflussrichtung gespült, um die Zellen im Filter zu lösen und eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Um die Lymphozyten zu isolieren, wurde die Zellsuspension vorsichtig auf eine Lösung mit dem Polysaccharid Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll) gegeben, das aufgrund seiner Dichte die mononukleären Zellen von den Restbestandteilen des Blutes trennt. Dieser Prozess wurde durch Zentrifugation (330 g für 30 Minuten bei 20°C) beschleunigt. Daraufhin wurden die peripheren mononukleären



**Abb. 11 – Reinheitsbestimmung der B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie.**

Die Zellen wurden mit dem Monozytenmarker CD14, dem T-Zell-Marker CD3 und dem B-Zell-Marker CD19 gefärbt. Eine ausreichende Reinheit war ab ca. 95 % B-Lymphozyten erreicht. Die Bilder unten zeigen die isolierten B-Lymphozyten (weiß) im Vergleich zu einer ungefärbten Kontrolle (grau).

Blutzellen (PBMCs) abpipettiert, in PBS resuspendiert und in 2 Schritten gewaschen (mit 440 g für 15 Minuten und mit 240 g für 10 Minuten bei jeweils 4°C). Um die B-Lymphozyten von den restlichen Zellen zu trennen, wurden die PBMCs für 15 Minuten bei 4°C mit magnetischen CD19-spezifischen Antikörpern (10 µl / 10<sup>7</sup> Zellen, Cat.: 130-052-201, Miltenyi Biotec) inkubiert, die ausschließlich an B-Lymphozyten binden. Im darauffolgenden Schritt wurden die PBMCs mit 0,5 % BSA/PBS bei 240 g für 10 Minuten gereinigt und durch einen magnetischen Filter (LS Columns, Miltenyi Biotec) gegeben, der die magnetisch markierten B-Lymphozyten von den restlichen Zellen durch elektromagnetische Kraft separiert. Die isolierten B-Lymphozyten wurden in 0,5 % BSA / PBS resuspendiert.

### **Reinheit der isolierten B-Lymphozyten**

Die Reinheit der isolierten B-Zellen wurde mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse bestimmt. Dazu wurden 500 µl der B-Zellsuspension entnommen und mit 660 g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zelloberfläche mit CD14-FITC (3 µg/ml, DRFZ) zur Identifizierung von Monozyten, CD3-PE (1:400, Klon OKT3, DRFZ) zur Bestimmung von T-Lymphozyten und CD19-Cy5 (790 ng/ml, Klon BU12, DRFZ) zur Messung von B-Lymphozyten in 1 % BSA/PBS für 15 Minuten bei 4°C und eine abschließende Zentrifugation mit 660 g für 5 Minuten. Die Zellen wurden in 250 µl 1 % BSA/PBS aufgenommen, und zur Messung der Zellviabilität wurde 1 µl Propidiumiodid (PI) hinzugegeben, das ein Emissionsmaximum bei 590 nm hat, mit freier Desoxyribonukleinsäure (DNS) interkaliert und somit tote Zellen markiert. Die Färbung wird in Abb. 11 dargestellt.

### **Th2-abhängige und T-Zell-unabhängige Stimulation**

B-Lymphozyten bzw. PBMCs wurden auf 10<sup>6</sup> Zellen pro ml verdünnt und mit 2 Stimulationsansätzen behandelt. Die Th2-abhängige Stimulation umfasste die Stimulation mit 1 µg/ml anti-CD40 und 5 ng/ml IL-4. In der T-Zell-unabhängigen Stimulation wurden 2 µg/ml anti-IgM /-IgG Fab2 (anti-BCR), 3 µg/ml CpG und 10 ng/ml IL-10 verwendet (Tab. 3). Die Stimulationsansätze wurden mit entsprechenden 9-cis RS Konzentrationen von 10 pmol bis 1 µmol ergänzt. Jede Probenreihe umfasste ebenfalls eine unstimulierte Kontrolle. Jede Zellkultur wurde 1 bis maximal 10 Tage in einer 48-well-Zellkulturplatte mit 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde nach 3 Tagen gewechselt und die Zellen restimuliert.

**Tab. 3 – Behandlung der B-Lymphozyten mit 2 Stimulationsansätzen.**

T-Zell-abhängige Stimulation	T-Zell-unabhängige Stimulation
1 µg / ml anti-CD40	2 µg / ml anti-IgM /-IgG Fab2 (anti-BCR)
5 ng / ml IL-4	3 µg / ml CpG
	10 ng / ml IL-10
+/- 9-cis RS ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$ M)	

IL-4 = Interleukin 4, CpG = DNA-Oligonukleotid, IL-10 = Interleukin 10 (Herstellerangaben im Herstellerverzeichnis).

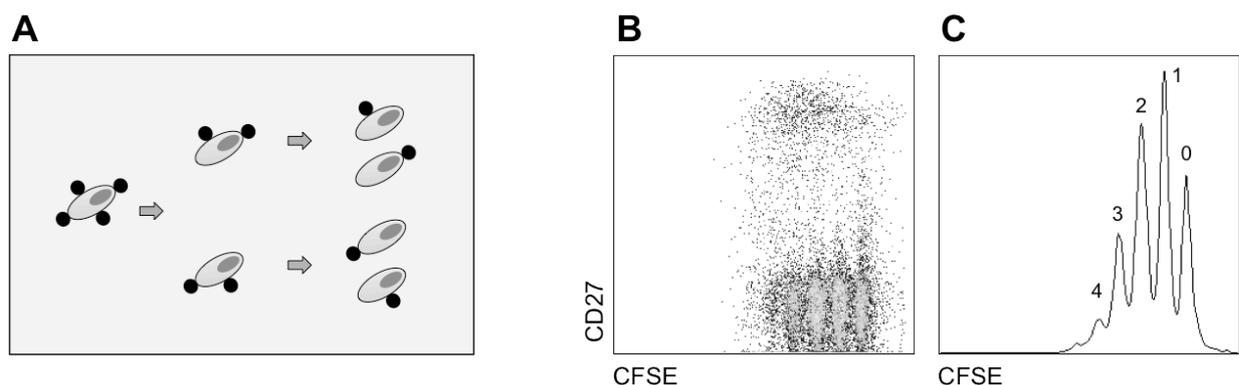
### 3.3.2. Proliferation, Aktivierungs- und Differenzierungsmarker, Immunglobulin-Profil, Toxizität

#### Toxizität

Die Bestimmung der Toxizität erfolgte mittels 7-AAD-Färbung stimulierter B-Lymphozyten im Durchflusszytometer. 7-AAD+ Zellen sind nicht lebendig und können daher von lebenden 7-AAD- Zellen unterschieden werden.

#### Messung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Teilungsrate wurden die isolierten B-Lymphozyten vor Versuchsbeginn mit dem farblosen Molekül Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE-DA) inkubiert, das die Zellmembran durchquert und sich an Zellproteine anlagert. Durch Abspaltung des

**Abb. 12 – Prinzip der Proliferationsmessung mithilfe von CFSE.**

CFSE bindet kovalent an die Zellproteine und wird bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, die durch Verwendung unmarkierter Proteine aus dem Zellkulturmedium insgesamt geringer fluoreszent markiert sind. (A) Die Menge an CFSE ist dabei proportional zur Zellgeneration. Im FITC Kanal eines Durchflusszytometers lassen sich daraufhin die Zellteilungen grafisch darstellen, (B) u.a. mit dem Differenzierungsmarker CD27 und (C) als Histogramm. Die Anzahl der Zelldivisionen ist beziffert.

Acetats durch zelleigene Enzyme entsteht das auf 515 nm fluoreszierende CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidylester) (Abb. 12). Pro  $10^6$  Zellen wurde  $0,5\mu\text{M}$  CFSE (Fluka, Cat.: 21888) benutzt, das nach Zugabe in die Zellsuspension mittels Durchmischung verteilt wurde und 90 Sekunden einwirkte. Dann wurde die Zellsuspension mit RPMI-1640 Zellkulturmedium 1:10 verdünnt und mit  $240\text{ g}$  für 10 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die CFSE-Markierung der Zellen konnte anschließend zu jedem Zeitpunkt im FITC-Kanal eines Durchflusszytometers gemessen werden.

### **Bestimmung der Aktivierungs- und Differenzierungsmarker**

Zur Untersuchung der Aktivierung und Differenzierung der B-Lymphozyten wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD23, CD54, CD86 und der Differenzierungsmarker CD27, CD38 und CCR9 in einem Durchflusszytometer gemessen (Tab. 4). Dazu wurden die Zellen aus der entsprechenden Zellkultur mit  $660\text{ g}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Für die Färbung der Aktivierungsmarker wurde die Zelloberfläche mit CD23-FITC (1:25, Klon 9P25, Ref.: IM0529, Beckman Coulter Immunotech), CD54-PE (1:25, Klon HA58, Cat.: 555511, BD Pharmingen) und CD86-APC (1:25, Klon 2331, Cat.: 555660, BD Pharmingen) in 1 % BSA/PBS für 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mit  $660\text{ g}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Für die Färbung der Differenzierungsmarker wurde die Zelloberfläche mit CD38-FITC (1:25, Klon HIT2, Cat.: 555459, BD Pharmingen), IgD-PE (1:50, Klon 112509, Cat.: 555779, BD Pharmingen) und CCR9-Alexa Fluor® 647 ( $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ , Klon 2331, Cat.: 557975, BD Pharmingen) in 1 % BSA/PBS für 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mit  $660\text{ g}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in  $250\text{ }\mu\text{l}$  1 % BSA/PBS aufgenommen, und zur Messung der Zellviabilität wurden  $1,5\text{ }\mu\text{l}$  7-AAD hinzugegeben. Die Färbung von CD27 erfolgte in Kombination mit CFSE und IgD. Die Färbeprozedur ist mit der Färbung der Differenzierungs-

Aktivierungsmarker-Färbung	Differenzierungs- und Migrationsmarker-Färbung
CD23 - FITC	CD38 - FITC
CD54 - PE	IgD - PE
CD86 - APC	CCR9 - Alexa Fluor® 647

**Tab. 4 – Fluorochrom-gekoppelte Antigene der Aktivierungs- sowie der Differenzierungs- und Migrationsmarker-Färbung.**

Das Fluorochrom Alexa Fluor® 647 ist vergleichbar mit APC. Für die Darstellung der Emissionsmaxima und FACS-Kanäle siehe Tab.1 und Tab.2.

marker bis auf die Messung von CFSE statt CD38 im FITC-Kanal und CD27 (1:25, Cat.: 130-093-18, Miltenyi Biotec) statt CCR9 im APC-Kanal identisch.

### **Quantifizierung des Zytokin- und Immunglobulin-Profiles**

Die Messung der Zytokine IL-6 und IL-10 erfolgte mittels ELISA. 96-well ELISA-Microtiter-Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit anti-IL-6 (2 µg/ml, Part 840113, IL-6 DuoSet, Cat.: DY206, R&D Systems) bzw. anti-IL-10 (2 µg/ml, Part 840113, IL-10 DuoSet, Cat.: DY217B, R&D Systems) in PBS inkubiert und anschließend für 1 Stunde mit 2 % BSA in PBS geblockt. Im nächsten Schritt wurde ein IL-6-Antikörper-Standard (600 pg/ml, Part 840115, IL-6 DuoSet, Cat.: DY206, R&D Systems) bzw. IL-10-Antikörper-Standard (2 ng/ml, Part 841532, IL-10 DuoSet, Cat.: DY217B, R&D Systems) aufgetragen und seriell 1:2 weiterverdünnt. Die Proben wurden für IL-6 1:5 und 1:25 in 0,2 % BSA in PBS verdünnt und für IL-10 unverdünnt für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein biotinylierter anti-IL-6- (200 ng/ml, Part 840114, IL-6 DuoSet, Cat.: DY206, R&D Systems) bzw. anti-IL-10-Detektions-Antikörper (150 ng/ml, Part 840196, IL-10 DuoSet, Cat.: DY217B, R&D Systems) aufgetragen und für 2 Stunden inkubiert. Danach folgte die Detektion durch 60-minütige Beschichtung mit Streptavidin-gebundener Meerrettich-Peroxidase (1:1000, AEM 6208122, R&D) und Substratinkubation mit TMB (1 mg, T3405-100TAB, Sigma Aldrich) in TMB-Puffer. Die Konzentrationen für IL-6 und IL-10 wurden in pg/ml bestimmt. Die Auswertung erfolgte an einem ELISA-Lesegerät (*MRX - Elisareader*, Dynex Technologies).

Die Bestimmung der Immunglobuline IgM, IgA, IgG und IgE erfolgte mittels ELISA. Die 96-well ELISA-Microtiter-Platten wurden über Nacht bei 4°C mit anti-IgM (360 ng/ml, Cat.: 109-005-129, Jackson ImmunoResearch), anti-IgA (480 ng/ml, Cat.: 109-005-011, Jackson ImmunoResearch), anti-IgG (360 ng/ml, Cat.: 109-005-088, Jackson ImmunoResearch) oder anti-IgE (2,5 µg/ml, Klon HP6061, Cat.: 9240-01, Southern Biotech) beschichtet und im darauffolgenden Schritt für 1 Stunde mit 2 % BSA in PBS geblockt. Danach wurde ein humaner Serum-Standard in der initialen Verdünnung von 120 µg/dl IgM, 60 µg/dl IgA, 30 µg/dl IgG und 48 ng/ml IgE in 0,2 % BSA in PBS auf die Platte aufgetragen und seriell 1:2 weiterverdünnt. Die Proben wurden für die Messung von IgM, IgA und IgG 1:100 in 0,2 % BSA in PBS verdünnt und für die Messung von IgE unverdünnt auf die Platte aufgetragen und für 2 Stunden inkubiert. Es folgte die Beschichtung mit Alkalische Phosphatase (AP) konjugiertem anti-IgM (1:5000, Cat.: 109-055-043, Jackson ImmunoResearch), anti-IgA (1:5000, Cat.: 109-055-011, Jackson ImmunoResearch), anti-IgG (1:5000, Cat.: 109-055-088, Jackson ImmunoResearch) oder biotinyliertem anti-IgE (500 ng/ml, Klon HP6029, Cat.: 9250-08, Southern Biotech) verdünnt in

0,2 % BSA in PBS für 2 Stunden. Anschließend wurde der IgE-ELISA mit Streptavidin-konjugierter AP (1:1000, AR001, R&D Systems) für 2 Stunden in PBS inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels des Substrates p-Nitrophenylphosphat (15 mg / 15 ml Substratpuffer, N2640-100TAB, Sigma Aldrich). Die Auswertung erfolgte an einem ELISA-Lesegerät (MRX - Elisareader, Dynex Technologies). Die Konzentrationen für IgM, IgA und IgG wurden in  $\mu\text{g}/\text{dl}$  und für IgE in  $\text{ng}/\text{ml}$  bestimmt.

#### **3.4. Statistische Analyse**

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Graphpad Prism (GraphPad Software) und Microsoft Excel (Microsoft). In der 30 mg/kg 9-cis RS Gruppe wurde ein Ausreißer detektiert, der außergewöhnlich hohe OVA-IgE Werte zum Zeitpunkt der OVA-Exposition an Tag 109 sowie am Ende des Experiments an Tag 115 aufwies (Ausreißertest nach Grubbs:  $p < 0,05$ ). Die Daten von dieser Maus wurden dementsprechend für die Berechnung aller Ergebnisse ausgeschlossen. Die Berechnung statistischer Signifikanzen erfolgte mit Graphpad Prism. Die Ergebnisse sind entweder als Einzelwerte mit arithmetischem Mittel oder als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Der nichtparametrische »Mann-Whitney-U-Test« wurde zum Gruppenvergleich bei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben und kleiner Gruppengröße benutzt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert  $* < 0,05$ ,  $** < 0,01$  und  $*** < 0,001$  definiert.

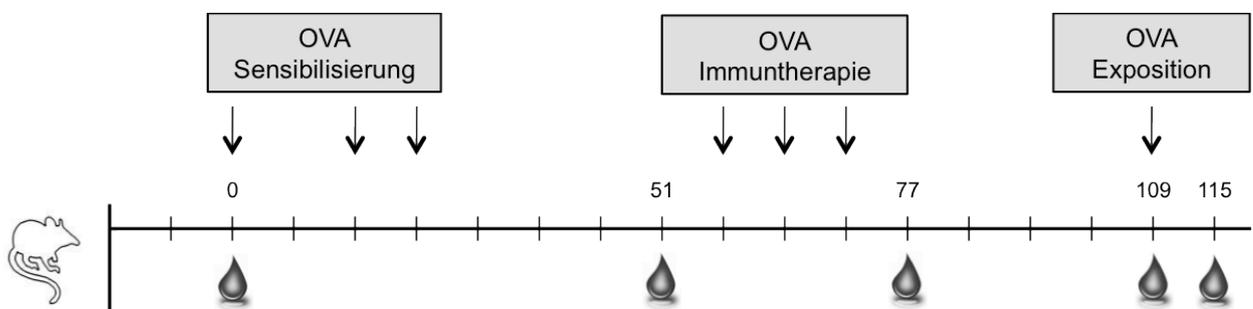
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluss von 9-cis Retinsäure auf die SIT im murinen Allergie-Modell

Retinoide modulieren die Aktivierung, Differenzierung, Migration und den Isotypenklassenwechsel von B-Lymphozyten [41, 43]. Jedoch ist der Einfluss auf die Typ-I-Allergie unklar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Wirkung von 9-cis RS auf die spezifische Immuntherapie einer etablierten Typ-I-Allergie bei Mäusen untersucht. Es wurden spezifische antikörperproduzierende Zellen in verschiedenen Kompartimenten des Immunsystems sowie die Serum-Antikörperkonzentration quantitativ und qualitativ mittels ELISA, ELISPOT und Durchflusszytometrie bestimmt.

#### 4.1.1. Humorale Immunantwort

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Immunglobulinprofils wurde den Mäusen zu Beginn des Versuchs (Tag 0), eine Woche vor der Immuntherapie (Tag 51), eine Woche danach (Tag 77), nach 5 weiteren Wochen (Tag 109) und abschließend 6 Tage nach erneuter Antigenexposition mit OVA (Tag 115) Blut entnommen (Abb. 13). Somit erhielt man eine zeitliche Darstellung der Immunglobulin-Konzentration im peripheren Blut. Es wurden die Konzentrationen für antigenspezifisches OVA-IgA, -IgE, -IgG1 und Gesamt-IgE bestimmt.

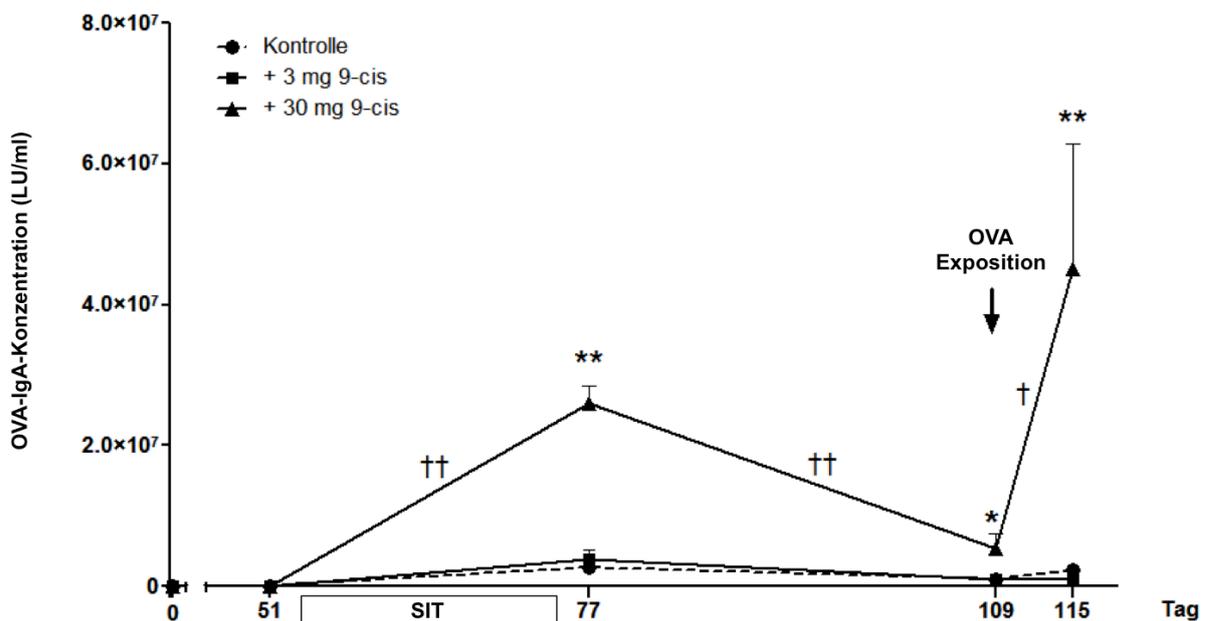


**Abb. 13 – Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Serum-Antikörperkonzentration durch Blutentnahmen.**

Die Werte für OVA-IgA, -IgE, -IgG1 und Gesamt-IgE wurden zu Versuchsbeginn (Tag 0), eine Woche vor der Immuntherapie (Tag 51), eine Woche danach (Tag 77), nach 5 weiteren Wochen (Tag 109) und abschließend 6 Tage nach erneuter Antigenexposition mit OVA (Tag 115) gemessen.

OVA-spezifische IgA-Antikörper waren zu Beginn des Versuchs und nach Sensibilisierung in keiner der Gruppen nachweisbar. Die Immuntherapie führte in der mit 30 mg/kg 9-cis RS behandelten Gruppe (30 mg Gruppe) zu einem signifikanten 1636-fachen Anstieg von OVA-IgA-Antikörpern infolge der spezifischen Immuntherapie ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Konzentration signifikant 9,6-fach höher ( $2,6 \times 10^7$  LU/ml  $\pm$   $2,6 \times 10^6$ ;  $p <$

0,01;  $n \geq 5$ ). Die mit 3 mg/kg 9-cis RS behandelte Gruppe (3 mg Gruppe) verhielt sich dagegen ähnlich wie die Kontrollgruppe und verzeichnete nur eine leichte Induktion von IgA-Antikörpern. Nach weiteren 5 Wochen fielen die spezifischen IgA Konzentrationen aller Gruppen wieder ab, wenngleich sie in der 30 mg Gruppe jedoch signifikant 5,5-fach höher erhalten blieb als in der Kontrollgruppe ( $5,5 \times 10^6$  LU/ml  $\pm 1,9 \times 10^6$ ;  $p < 0,05$ ;  $n \geq 5$ ). Interessanterweise induzierte die erneute Allergenprovokation nach weiteren 6 Tagen eine signifikante 8-fache Zunahme von spezifischen IgA-Antikörpern in der 30 mg Gruppe, die in einer deutlich höheren Konzentration als in der Kontrollgruppe resultierte (19,5-fach höher auf  $4,5 \times 10^7$  LU/ml  $\pm 1,8 \times 10^7$ ). Die 3 mg Gruppe zeigte hingegen keine relevanten Änderungen der OVA-spezifischen IgA-Konzentration im Blut (Abb. 14).

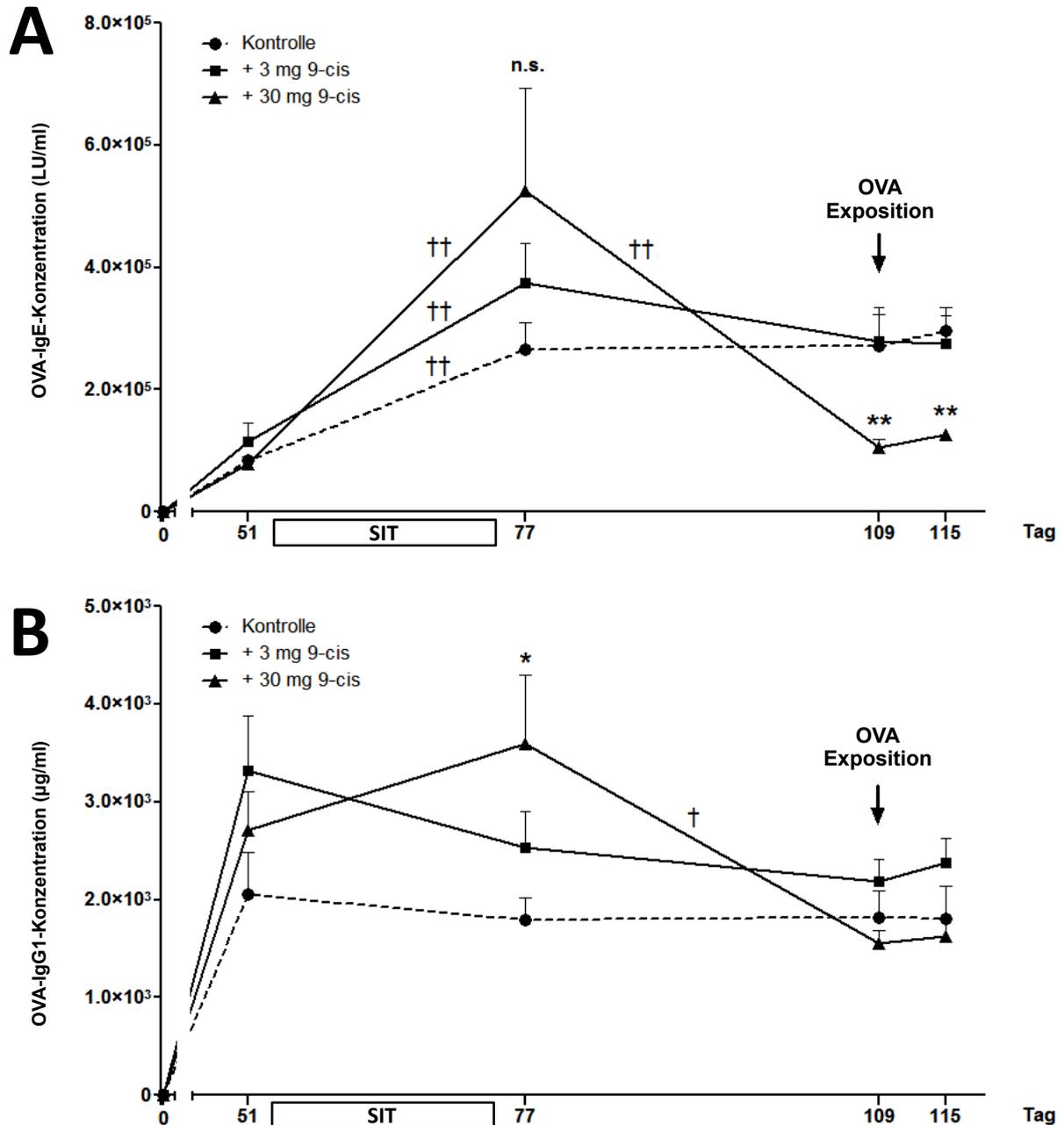


**Abb. 14 – 9-cis RS induzierte einen Anstieg der antigenspezifischen IgA-Serumwerte nach OVA-Exposition.**

OVA-IgA-ELISA von peripherem Serum OVA-sensibilisierter Mäuse  $\pm$  9-cis RS zu verschiedenen Zeitpunkten. Darstellung als arithmetische Mittelwerte + SEM. \* = Intergruppaler Vergleich zur Kontrollgruppe; † = Intragruppaler Vergleich zweier Zeitpunkte. P = Mann-Whitney U Test (\*, † =  $p < 0,05$ ; \*\*, †† =  $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ).

In Hinblick auf OVA-spezifische IgE-Antikörper zeigte sich in allen Gruppen eine Zunahme nach Antisensibilisierung. Die spezifische Immuntherapie induzierte einen weiteren 7-fachen Anstieg an OVA-IgE-Antikörpern ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ) in der 30 mg Gruppe und einen 3-fachen Anstieg in der 3 mg Gruppe sowie in der Kontrollgruppe (beide  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ). Die posttherapeutischen OVA-IgE-Werte an Tag 77 unterschieden sich jedoch trotz des Anstiegs nicht signifikant voneinander, was in der 30 mg Gruppe unter anderem auf die Heterogenität der

Messdaten zurückzuführen war. Im Verlauf zeigte die 30 mg Gruppe eine signifikante 5-fache Abnahme von OVA-IgE-Antikörpern ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ) 5 Wochen nach Immuntherapie, während in den anderen Gruppen keine messbare Reduktion festgestellt wurde.



**Abb. 15 – 9-cis RS reduzierte nachhaltig die antigenspezifischen IgE-Serumwerte und induzierte einen temporären Anstieg von OVA-IgG1-Antikörpern.**

(A) OVA-IgE-ELISA und (B) OVA-IgG1-ELISA von peripherem Serum OVA-sensibilisierter Mäuse ± 9-cis RS zu verschiedenen Zeitpunkten. Darstellung als arithmetische Mittelwerte + SEM. \* = Intergruppaler Vergleich zur Kontrollgruppe; † = Intragruppaler Vergleich zweier Zeitpunkte. P = Mann-Whitney U Test (\*, † =  $p < 0,05$ ; \*\*, †† =  $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ; n.s. = nicht signifikant).

Die Konzentration der 30 mg Gruppe war nach 5 Wochen 3-fach geringer ( $105140 \text{ LU/ml} \pm 13100$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ). Die erneute Antigenprovokation an Tag 109 des Versuchs hatte keinen Einfluss auf die OVA-IgE-Konzentration der Gruppen, sodass die OVA-IgE-Werte der 30 mg Gruppe weiterhin signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe blieben ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ) (Abb. 15A). Die Messung von OVA-spezifischen IgG1-Antikörpern zeigte einen Anstieg der Konzentration infolge der Sensibilisierung mit OVA in allen drei Gruppen. Die spezifische Immuntherapie bewirkte innerhalb der Gruppen keine signifikanten Änderungen im Verlauf, jedoch konnten in der 30 mg Gruppe post-therapeutisch an Tag 77 2-fach höhere OVA-IgG1-Werte ( $3596 \mu\text{g/ml} \pm 702$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1790 \mu\text{g/ml} \pm 228$ ) gemessen werden ( $p < 0,05$ ;  $n \geq 5$ ), die sich im Verlauf nach 5 Wochen wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe und der 30 mg Gruppe senkten ( $p < 0,05$ ;  $n \geq 5$ ). Eine erneute Antigenexposition an Tag 109 zeigte keine relevanten Änderungen der OVA-IgG1-Werte in allen Gruppen (Abb. 15B).

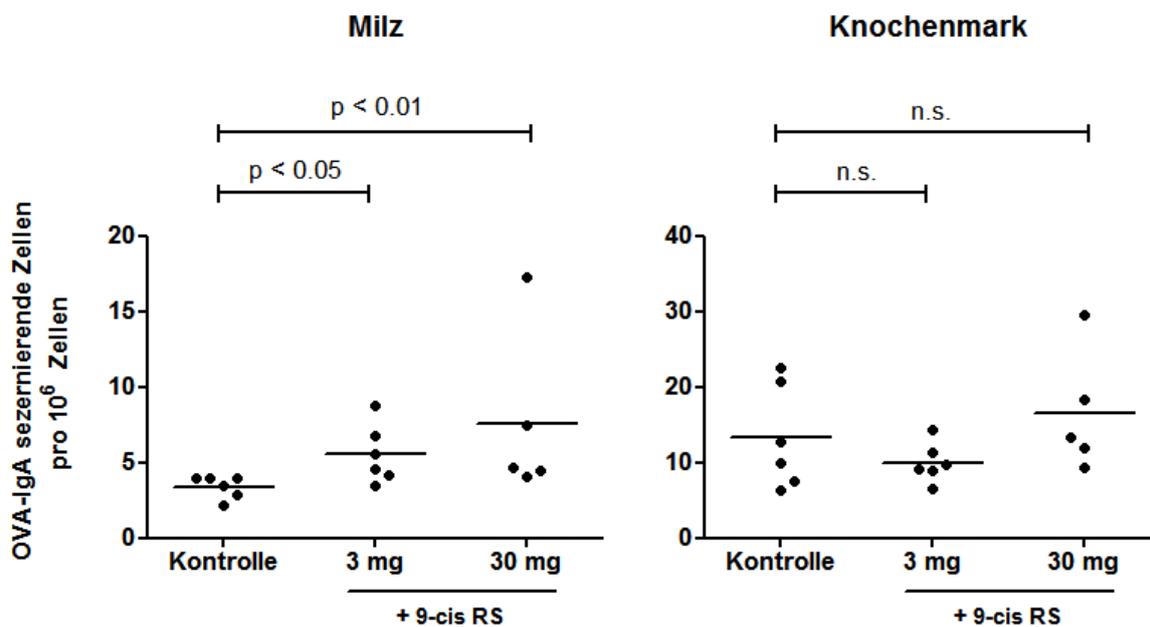
Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Immuntherapie in Verbindung mit 30 mg 9-cis RS präferenziell eine OVA-IgA Sekretion induzierte, die sich auch nachhaltig ohne erneute Applikation von 9-cis RS auslösen ließ (Abb. 14). Die nachhaltig erhöhte IgA-Konzentration gibt zudem einen Hinweis auf die Präsenz von spezifischen IgA-Gedächtniszellen. Weiterhin bewirkte die Immuntherapie eine nachhaltige Abnahme der OVA-IgE-Werte (Abb. 15A), sowie einen durch die SIT temporär induzierten Anstieg von OVA-IgG1-Antikörpern (Abb. 15B). In der 3 mg Gruppe fanden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf aller 4 untersuchten Immunglobulinkonzentrationen. In der Summe deuten die Daten an, dass durch 9-cis RS die humorale Immunantwort moduliert wird, wobei die Reaktivierung des immunologischen Gedächtnisses durch erneute Antigenexposition in ausschließlich spezifischer IgA-Antwort resultiert.

#### **4.1.2. Differenzierung von B-Lymphozyten**

Um den Einfluss von 9-cis RS auf den Isotypenklassenwechsel von B-Lymphozyten und die Anzahl von Plasmazellen zu untersuchen, die gegen OVA gerichtete Antikörper produzieren, wurden an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition und 39 Tage nach Immuntherapie) OVA-IgG1, -IgA und -IgE ELISPOTs der Milz und des Knochenmarks der Versuchstiere durchgeführt.

9-cis RS modulierte die Anzahl OVA-IgA sezernierender Plasmazellen. In der Milz waren in der 30 mg Gruppe 2,2-fach höhere ( $7,5 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^6$ ) und in der 3 mg Gruppe 1,6-fach höhere

Plasmazellzahlen ( $5,5 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $3,4 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ ) vorhanden. Im Knochenmark waren in der 30 mg Gruppe 1,25-fach höhere Zellzahlen ( $16,5 \times 10^6 \pm 3,6 \times 10^6$ ) und in der 3 mg Gruppe 1,3-fach geringere Zellzahlen ( $9,9 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $13,3 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^6$ ) feststellbar. Daraus ergab sich in der Milz eine signifikante Erhöhung von kurzlebigen OVA-IgA sezernierenden Plasmazellen in der 3 mg Gruppe ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ) und in der 30 mg RS Gruppe ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ). Im Knochenmark fanden sich in Bezug auf langlebige Plasmazellen keine signifikanten Unterschiede zu dem gemessenen Zeitpunkt (Abb. 16).



**Abb. 16 – 9-cis RS erhöhte die Anzahl OVA-IgA sezernierender Plasmazellen in der Milz.**

ELISPOT von Milz und Knochenmark an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition, 45 Tage nach SIT) von OVA-sensibilisierten Mäusen  $\pm$  9-cis RS. Darstellung als Einzelwerte. Linie = arithmetisches Mittel. P = Mann-Whitney U Test ( $n \geq 5$ ; n.s. = nicht signifikant).

9-cis RS hatte auch einen gewebespezifischen Einfluss auf OVA-IgE Plasmazellen. In der Milz waren in der 30 mg Gruppe 1,8-fach geringere Zellzahlen ( $1,6 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $3 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ ) signifikant nachzuweisen ( $p < 0,05$ ;  $n \geq 5$ ). In der 3 mg RS Gruppe zeigte sich keine Veränderung. Im Knochenmark waren in der 3 mg Gruppe 1,6-fach geringere Zellzahlen ( $1,6 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $2,6 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ ) messbar ( $p = 0,0649$ ;  $n = 6$ ), während die 30 mg Gruppe unbeeinflusst blieb (Abb. 17A).

Die Anzahl OVA-IgG1 sezernierender Plasmazellen wurde gewebespezifisch unterschiedlich durch 9-cis RS in Abhängigkeit von der Konzentration moduliert. In der Milz waren in der 30

mg Gruppe 1,6-fach geringere Zellzahlen ( $16,4 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ ) als in der Kontrollgruppe ( $26 \times 10^6 \pm 1,8 \times 10^6$ ) signifikant feststellbar ( $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ). Die 3 mg Gruppe zeigte hingegen keine Änderung. Im Knochenmark waren in der 30 mg Gruppe 1,6-fach geringere Zellzahlen ( $81,3 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^6$ ;  $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ) und in der 3 mg Gruppe 2,5-fach geringere Zellzahlen

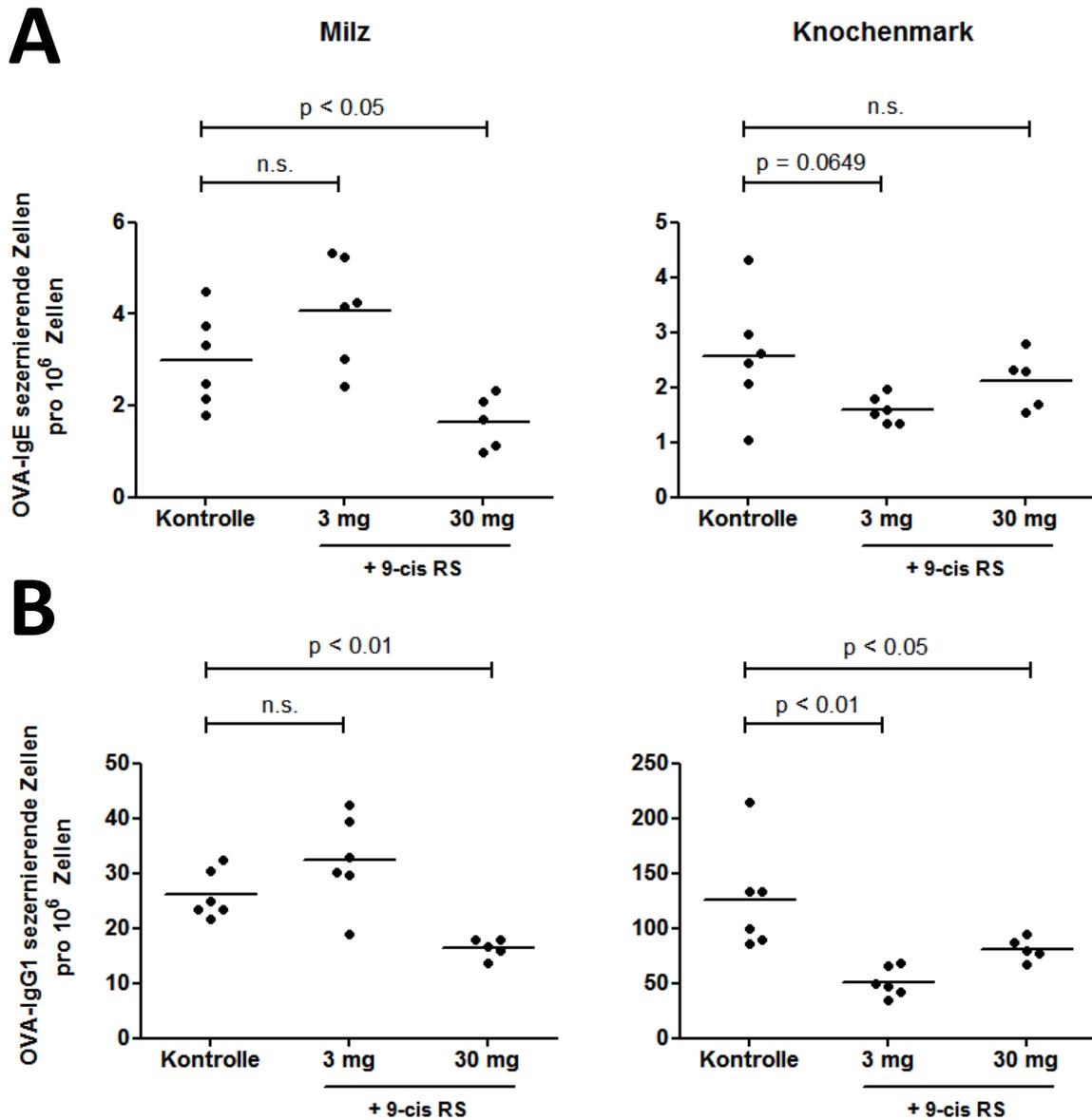


Abb. 17 – Durch die Behandlung mit 9-cis RS war die Frequenz OVA-IgE und OVA-IgG1 sezernierender Plasmazellen vermindert.

(A) OVA-IgE und (B) OVA-IgG1 ELISPOT von Milz und Knochenmark an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition, 45 Tage nach SIT) von OVA-sensibilisierten Mäusen  $\pm$  9-cis RS. Darstellung als Einzelwerte. Linie = arithmetisches Mittel. P = Mann-Whitney U Test ( $n \geq 5$ ; n.s. = nicht signifikant).

( $51,1 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^6$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $126,2 \times 10^6 \pm 19,7 \times 10^6$ ) messbar (Abb. 17B). Die generell höheren Plasmazellspiegel im Knochenmark sind auf die Nischenfunktion des Knochenmarks für Plasmazellen zurückzuführen [81].

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen der Plasmazellen an Tag 115 des Tierversuchs darauf hin, dass die Immuntherapie mit 30 mg 9-cis RS im Zeitraum von Tag 56 - 70 die Entstehung zu OVA-spezifischen kurzlebigen IgA-Plasmazellen induzierte und die Ausbildung von OVA-spezifischen langlebigen IgG1- und IgE-Plasmazellen verminderte. Doch es ließ sich keine lineare Dosis-Wirkung-Beziehung feststellen.

#### 4.1.3. Migration von Plasma- und Gedächtniszellen

Veränderte Migrationseigenschaften von B-Lymphozyten könnten eine Erklärung für die im ELISPOT gefundenen Veränderungen der Zahl an Plasmazellen in Milz und Knochenmark sein. Um die B-Zellen genauer zu charakterisieren und Rückschlüsse auf die Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten des Immunsystems zu ziehen, wurde die Präsenz OVA-spezifischer IgG1-Plasma- und Gedächtniszellen in der Milz sowie in den axillären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten mittels durchflusszytometrischer Analyse (FACS) gemessen (OVA-IgG1 Plasmazellen Färbung, siehe Material und Methoden). Aufgrund der geringen

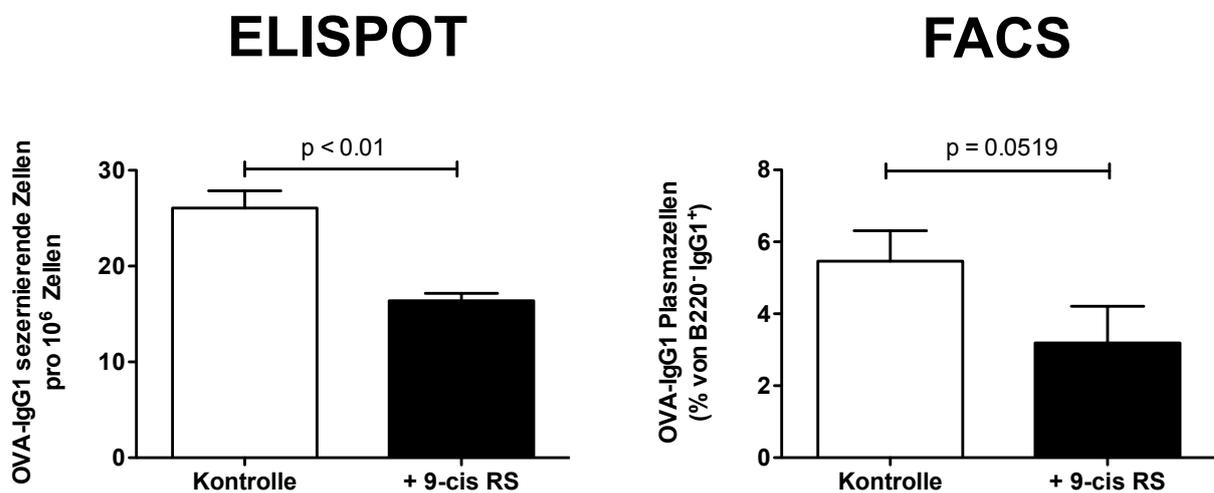


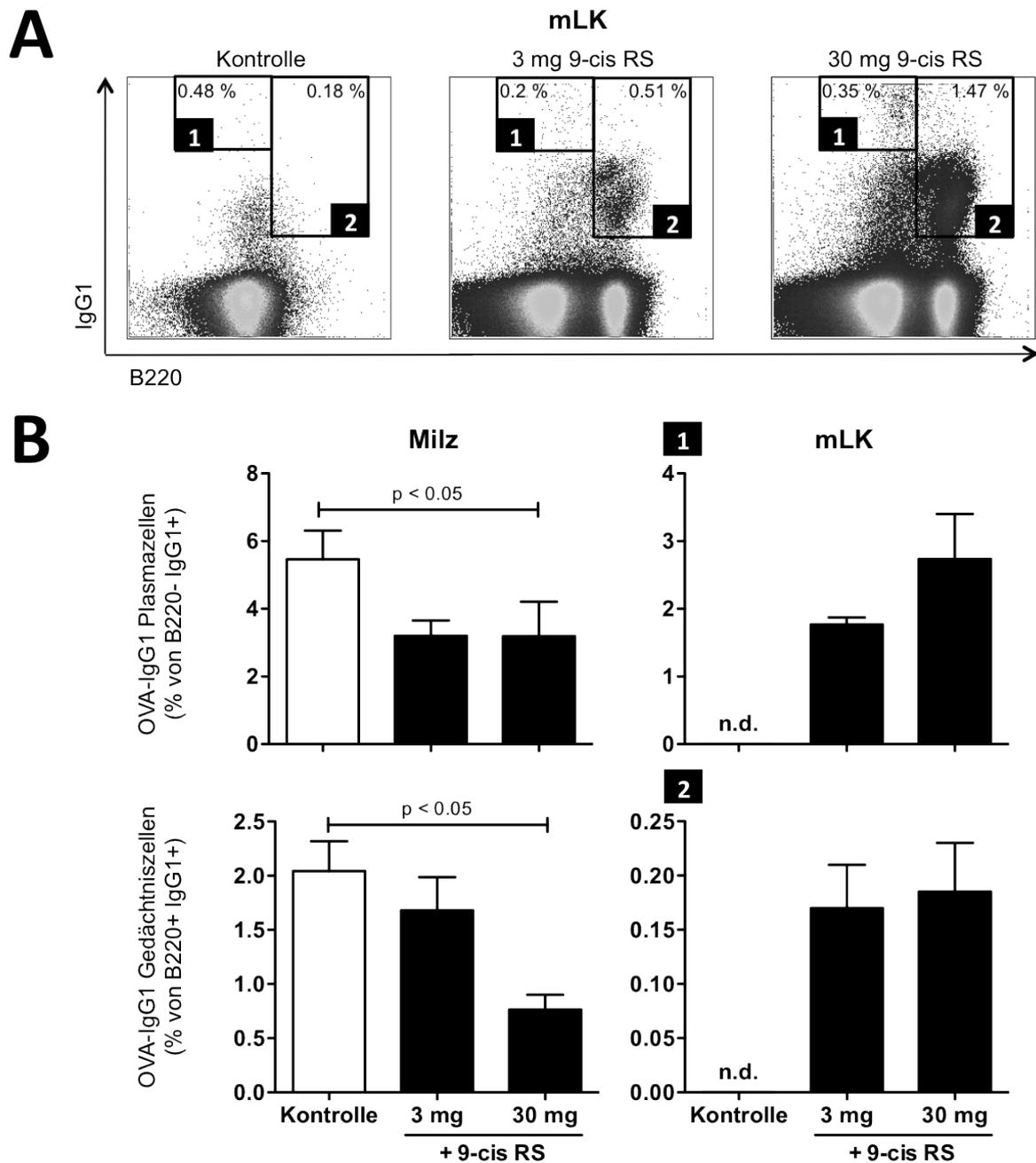
Abb. 18 – Vergleichbarer Zusammenhang von OVA-IgG1-Zellzahlen in ELISPOT und FACS-Analyse.

Durchflusszytometrische Analyse der Milz an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition, 45 Tage nach SIT) von OVA-sensibilisierten Mäusen  $\pm$  30 mg 9-cis RS. Links: Darstellung der ELISPOT-Analyse von OVA-IgG1 Plasmazellen als arithmetische Mittelwerte + SEM. Rechts: Darstellung von CD138+OVA+ Plasmazellen als relative Prozent von B220-IgG1+ Zellen als arithmetische Mittelwerte + SEM. P = Mann-Whitney U Test ( $n \geq 5$ ; n.s. = nicht signifikant).

Zellzahlen wurden die gleichen Lymphknoten von je 3 Mäusen einer Gruppe zusammengefasst, was die statistische Untersuchung limitiert. IgG1 steht repräsentativ für IgE und lässt sich aufgrund der höheren Zellzahlen besser erfassen als die direkte Messung von OVA-IgA oder OVA-IgE produzierenden Zellen (siehe absolute Zellzahlen in ELISPOT-Daten von Teil 4.1.2). Um die Auswertbarkeit der FACS-Daten zu verifizieren, wurden OVA-IgG1 Plasmazellen in der Milz, die mittels ELISPOT und FACS-Analyse gemessen wurden, miteinander verglichen (Abb. 18). Die Daten zeigen eine Vergleichbarkeit zwischen ELISPOT und FACS-Analyse. Weiterhin wurden Zellen aus der Milz und den mesenterialen Lymphknoten bezüglich der Expression von CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  untersucht.

Die Anzahl von B220-IgG1+CD138+OVA+ Plasmazellen (im Folgenden OVA-spezifische Plasmazellen) war gewebespezifisch unterschiedlich und zeigte durch die Behandlung mit 9-cis RS Veränderungen in Abhängigkeit von der Konzentration. In der Milz waren sowohl in der 30 mg als auch in der 3 mg Gruppe 1,7-fach geringere Frequenzen ( $3,2 \% \pm 1$  sowie  $3,2 \% \pm 0,5$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $5,5 \% \pm 0,8$ ) feststellbar. Somit ließ sich in beiden mit 9-cis RS behandelten Gruppen eine Abnahme von spezifischen Plasmazellen in der Milz feststellen, die jedoch nicht signifikant war (3 mg Gruppe:  $p = 0,0649$ , 30 mg Gruppe:  $p = 0,0519$ ;  $n \geq 5$ ). Auch die Frequenz der Population der B220+IgG1+CD138-OVA+ Gedächtniszellen (im Folgenden OVA-spezifische Gedächtniszellen) war in der 30 mg Gruppe 2,6-fach geringer ( $0,7 \% \pm 0,1$ ) und in der 3 mg Gruppe 1,2-fach geringer ( $1,7 \% \pm 0,3$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $2 \% \pm 0,3$ ) ausgeprägt. Die 30 mg Gruppe zeigte somit eine signifikante Abnahme von spezifischen Gedächtniszellen in der Milz (Abb. 19B).

In den mesenterialen Lymphknoten wurden in der 30 mg Gruppe  $2,7 \% \pm 0,7$  und in der 3 mg Gruppe  $1,8 \% \pm 0,1$  OVA-spezifische Plasmazellen gemessen, während in der Kontrollgruppe diese Zellen nicht nachweisbar waren. Die OVA-spezifischen Gedächtniszellen waren in der 30 mg Gruppe mit einer Frequenz von  $0,18 \% \pm 0,04$  und in der 3 mg Gruppe mit einer Frequenz von  $0,17 \% \pm 0,04$  nachweisbar, wobei in der Kontrollgruppe diese Zellpopulation nicht nachweisbar war (Abb. 19B). In den mesenterialen Lymphknoten war gegensätzlich zu den Befunden der Milz eine Zunahme der spezifischen Plasmazell-Population sowie der spezifischen Gedächtniszell-Population nachweisbar. Dementsprechend fand sich in den mesenterialen Lymphknoten eine dosisabhängige Zunahme von B220+IgG1+ und B220-IgG1+ Zellen sowie die deutliche Darstellung einer B220+IgG1- Zellpopulation (Abb. 19A).



**Abb. 19 – Erhöhte Frequenz OVA-spezifischer Plasma- und Gedächtniszellen in mesenterialen Lymphknoten bei gleichzeitiger Reduktion der Frequenz in Milz infolge der Therapie mit 9-cis RS.**

Durchflusszytometrische Analyse von Milz und mesenterialen Lymphknoten (mLK) an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition, 45 Tage nach SIT) von OVA-sensibilisierten Mäusen  $\pm$  9-cis RS. (A) Repräsentatives B220-IgG1 Diagramm eines mesenterialen Lymphknotens mit Gate 1 (entspricht B – mLK obere Reihe) und Gate 2 (entspricht B – mLK untere Reihe). (B) Obere Reihe: Darstellung von CD138+OVA+ Plasmazellen als relative Prozent von B220-IgG1+ Zellen. Untere Reihe: Darstellung von CD138-OVA+ Gedächtniszellen als relative Prozent von B220+IgG1+ Zellen. Beides als arithmetische Mittelwerte + SEM. Legende: n.d. = nicht detektierbar. P = Mann-Whitney U Test ( $n \geq 2$ ; n.s. = nicht signifikant).

Die OVA-spezifische Plasmazell-Population zeigte in den axillären Lymphknoten in der 30 mg Gruppe eine 30-fache Abnahme ( $0,86 \% \pm 0,86$ ) und in der 3 mg Gruppe ein vollständiges Verschwinden dieser Zellpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $26 \% \pm 0,15$ ). In den inguinalen Lymphknoten zeigte sich in der 30 mg Gruppe eine 4,9-fache Reduktion ( $0,72 \% \pm 0,72$ ) und in der 3 mg Gruppe eine 7-fache Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $3,6 \% \pm 3,6$ ) (Daten nicht gezeigt).

Die OVA-spezifische Gedächtniszell-Population zeigte in den axillären Lymphknoten in der 30 mg Gruppe eine 2,3-fache Abnahme ( $0,21 \% \pm 0,02$ ) und in der 3 mg Gruppe ein vollständiges Verschwinden im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,5 \% \pm 0,26$ ). In den inguinalen Lymphknoten zeigte sich in der 30 mg Gruppe eine 2,1-fache Reduktion ( $0,20 \% \pm 0,045$ ) und in der 3 mg Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vergleichbare Frequenzen ( $0,50 \% \pm 0,12$  und  $0,42 \% \pm 0,12$ ). Somit zeigen die Daten, dass durch die Behandlung mit 9-cis RS in den axillären Lymphknoten wenige OVA-spezifische Plasma- und Gedächtniszellen nachweisbar waren, während es in den inguinalen Lymphknoten keine eindeutigen Unterschiede gab (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 5 – 9-cis RS verringerte die Anzahl von CCR9+ und  $\alpha 4\beta 7$ + B-Zellen in der Milz in der 3 mg Gruppe.**

	Kontrolle	+ 3 mg 9-cis RS	+ 30 mg 9-cis RS
B220- CCR9-	53 ( $\pm 1$ ) % 0,33 ( $\pm 0,0067$ ) MFI	41 ( $\pm 1,2$ ) % ** 0,31 ( $\pm 0,0072$ ) MFI	47 ( $\pm 0,68$ ) % ** 0,32 ( $\pm 0,0084$ ) MFI
B220+ CCR9+	0,097 ( $\pm 0,0049$ ) % 22 ( $\pm 0,56$ ) MFI	0,048 ( $\pm 0,0018$ ) % ** 22 ( $\pm 0,52$ ) MFI	0,079 ( $\pm 0,0066$ ) % 24 ( $\pm 1,1$ ) MFI
B220+ $\alpha 4\beta 7$ -	52 ( $\pm 1$ ) % 0,26 ( $\pm 0,0034$ ) MFI	38 ( $\pm 1,1$ ) % ** 0,25 ( $\pm 0,004$ ) MFI	46 ( $\pm 0,73$ ) % ** 0,25 ( $\pm 0,0068$ ) MFI
B220+ $\alpha 4\beta 7$ +	0,12 ( $\pm 0,0021$ ) % 3,6 ( $\pm 0,043$ ) MFI	0,099 ( $\pm 0,0038$ ) % ** 3,3 ( $\pm 0,023$ ) MFI **	0,15 ( $\pm 0,019$ ) % 3,6 ( $\pm 0,068$ ) MFI

Durchflusszytometrische Analyse der Milz an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition, 45 Tage nach SIT) von OVA-sensibilisierten Mäusen  $\pm$  9-cis RS. Jedes Feld zeigt die entsprechenden Zellpopulationen als Mittelwert der relativen Frequenz  $\pm$  SEM mit dem Mittelwert der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) von CCR9 bzw.  $\alpha 4\beta 7$  dieser Population  $\pm$  SEM. . P = Mann-Whitney U Test im Vergleich zu Kontrollgruppe (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $n \geq 5$ ).

Zur weiteren Untersuchung der Zellwanderungseigenschaften wurden die Migrationsmarker CCR9 und Integrin  $\alpha 4\beta 7$  auf den B-Lymphozyten der Milz gemessen. Infolge der Therapie mit 9-cis RS konnte in der 3 mg Gruppe eine 2-fache Reduktion von CCR9+ B-Zellen in der Milz festgestellt werden (Tab. 5). Auch die Zahl von  $\alpha 4\beta 7$ + Zellen verringerte sich in dieser Gruppe, wenn auch nur leicht (1,2-fach). Die zelluläre Expression der Marker CCR9 und Integrin  $\alpha 4\beta 7$  (gemessen mittels MFI) verringerte sich dagegen nur bei  $\alpha 4\beta 7$ + B-Zellen in der 3 mg Gruppe.

Interessanterweise nehmen die B-Zellpopulationen ohne Migrationsmarker (B220+CCR9- und B220+ $\alpha$ 4 $\beta$ 7-) signifikant ab, bis zu 1,3-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Untersuchung von B220- Lymphozyten zeigte ähnliche Resultate. Auch hier konnte eine bis zu 2-fache Reduktion von CCR9+ B-Zellen festgestellt werden. Die Zahl an  $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ Zellen verringerte sich ebenfalls signifikant in der 3 mg Gruppe bis auf das 1,6-fache. Weiterhin ließ sich ein signifikanter Anstieg von Lymphozyten ohne Migrationsmarker (B220-CCR9- und B220- $\alpha$ 4 $\beta$ 7-) in der Milz beobachten, und zwar bis zum 1,3-fachen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 6 – 9-cis RS verringerte die Anzahl von CCR9+ und  $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ B-Zellen in mesenterialen Lymphknoten und erhöhte gleichzeitig die zelluläre Expression von CCR9 und  $\alpha$ 4 $\beta$ 7.**

	Kontrolle	+ 3 mg 9-cis RS	+ 30 mg 9-cis RS
B220+ CCR9-	9,6 ( $\pm$ 2,8) % 1,4 ( $\pm$ 0,19) MFI	25 ( $\pm$ 4) % 0,43 ( $\pm$ 0,055) MFI	27 ( $\pm$ 4) % 0,36 ( $\pm$ 0,06) MFI
B220+ CCR9+	3,8 ( $\pm$ 2) % 5,6 ( $\pm$ 0,23) MFI	0,12 ( $\pm$ 0,039) % 8,9 ( $\pm$ 2,2) MFI	0,084 ( $\pm$ 0,0035) % 11 ( $\pm$ 1,2) MFI
B220+ $\alpha$ 4 $\beta$ 7-	8,3 ( $\pm$ 3,2) % 0,99 ( $\pm$ 0,11) MFI	24 ( $\pm$ 4,3) % 0,38 ( $\pm$ 0,055) MFI	27 ( $\pm$ 3,9) % 0,33 ( $\pm$ 0,085) MFI
B220+ $\alpha$ 4 $\beta$ 7+	2 ( $\pm$ 0,7) % 3,5 ( $\pm$ 0,03) MFI	0,1 ( $\pm$ 0,076) % 3,7 ( $\pm$ 0,033) MFI	0,036 ( $\pm$ 0,007) % 3,9 ( $\pm$ 0,035) MFI

Durchflusszytometrische Analyse der mesenterialen Lymphknoten an Tag 115 (6 Tage nach OVA-Exposition, 45 Tage nach SIT) von OVA-sensibilisierten Mäusen  $\pm$  9-cis RS. Jedes Feld zeigt die entsprechenden Zellpopulationen als Mittelwert der relativen Frequenz  $\pm$  SEM mit dem Mittelwert der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) von CCR9 bzw.  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 dieser Population  $\pm$  SEM (n = 2).

Des Weiteren wurden die Migrationsmarker CCR9 und Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 bei B-Lymphozyten der mesenterialen Lymphknoten exemplarisch gemessen (n = 2) (Tab. 6). Es zeigte sich eine durch 9-cis RS induzierte, bis zu 45-fache Abnahme der CCR9+ Zellen und eine um bis zu 55-fache Reduktion der  $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ Zellpopulation. Interessanterweise fand sich jedoch eine verstärkte Oberflächenexpression beider Migrationsmarker. Zudem stiegen die B-Zellpopulationen ohne Migrationsmarker (B220+CCR9- und B220+ $\alpha$ 4 $\beta$ 7-) um das 3-fache an. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Messung von Lymphozyten ohne den B-Zellmarker B220 (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend bewirkte 9-cis RS eine Abnahme von OVA-spezifischen Plasma- und Gedächtniszellen in der Milz und in den axillären Lymphknoten. Dagegen war eine Zunahme von OVA-spezifischen Plasma- und Gedächtniszellen nur in den mesenterialen Lymphknoten zu verzeichnen. Die Analyse der Migrationsmarker zeigte paradoxerweise eine relative Frequenzminderung von CCR9+ und Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ Zellen in Milz und mesenterialen

Lymphknoten in Abhängigkeit von 9-cis RS, wobei die verbliebenen Populationen besonders in den mesenterialen Lymphknoten eine höhere CCR9- bzw.  $\alpha 4\beta 7$ -Expression aufwiesen.

#### **4.1.4. Verträglichkeit**

Die Mäuse haben die Applikation von 3 mg/kg bzw. 30 mg/kg RS zusätzlich zur SIT gut vertragen. Kein Tier ist an den Folgen der Therapie gestorben. Jedoch zeigten in der 30 mg Gruppe 5 von 6 Tieren an der Injektionsstelle trockene, schuppige und ekzematöse Hautveränderungen, die mit Fellverlust einhergingen.

## 4.2. Einfluss von 9-cis Retinsäure auf humane B-Zellen *in vitro*

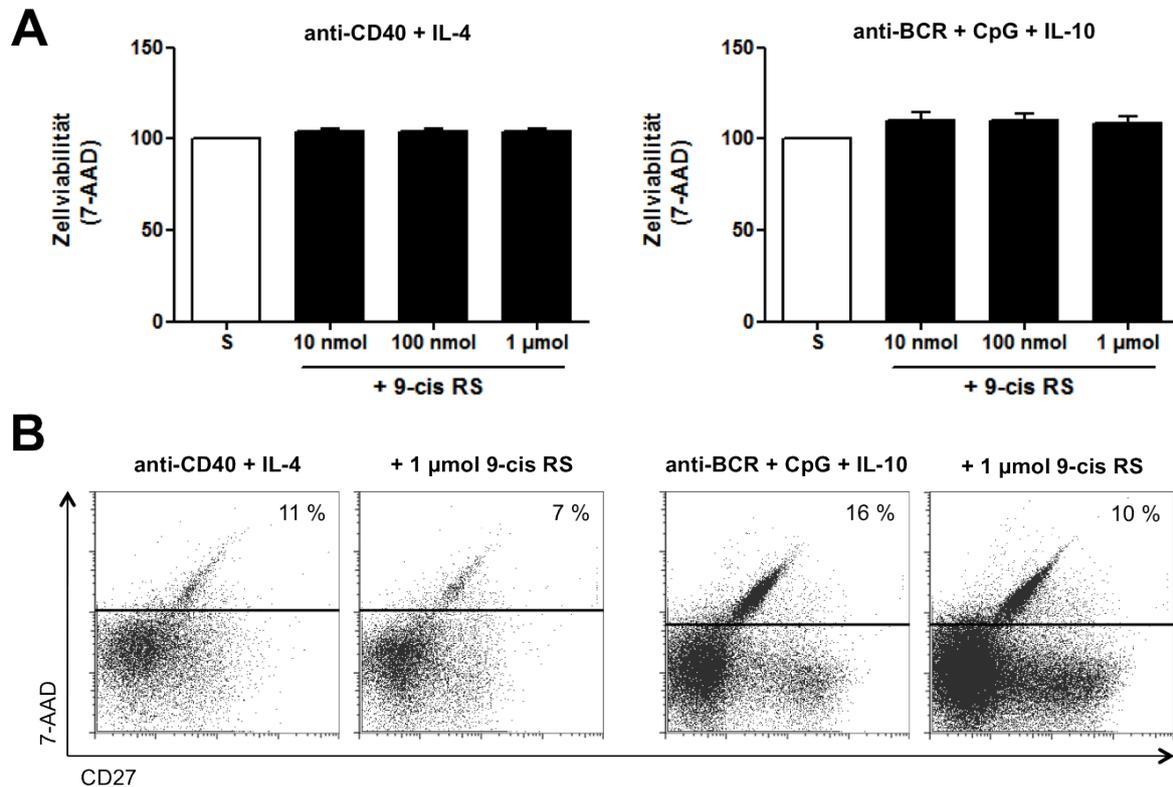
Die beobachteten Wirkungen einer 9-cis RS-Behandlung im Rahmen einer spezifischen Immuntherapie im Mausmodell legen nahe, dass B-Zellpopulationen die Immunantwort beeinflussen können. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Wirkung von 9-cis RS auf humane B-Zellen *in vitro* untersucht, um die Frage einer direkt vermittelten Wirkung auf B-Zellen sowie die potentielle Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu prüfen.

Zur Bestimmung der direkten immunmodulatorischen Wirkung von 9-cis RS auf humane B-Zellen *in vitro* wurden zwei Stimulationsansätze verwendet, da Antigenkontakte *in vivo* im Zusammenspiel mit T-Zellen (indirekte Aktivierung) oder T-Zell-unabhängig über TLR-Rezeptoren stattfinden können (direkte Aktivierung). Durch die Wahl von zwei grundlegend unterschiedlichen Stimulationsmodellen sollte untersucht werden, ob die Wirkungen von 9-cis RS genereller Natur oder abhängig von bestimmten Stimulationsbedingungen sind. Zur Simulation einer T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung wurde eine Th2-Stimulation mit anti-CD40 und Interleukin-4 (IL-4) eingesetzt. Sie führt zum IgE-Isotypenklassenwechsel [57]. Vitamin A und sein Derivat RS regulieren diesen Prozess *in vitro* über die Aktivierung von RAR-Rezeptoren [47]. Die T-Zell-unabhängige Stimulation der B-Zellen erfolgte mit anti-IgM/IgD (im Folgenden anti-BCR), dem Oligonukleotid CpG und Interleukin-10 (IL-10). Hintergrund für diese Stimulation ist die 3-Signal-Theorie, wonach eine B-Zelle durch die Kombination dieser 3 Faktoren aktiviert wird [82]. Durch anti-BCR werden B-Zellen spezifisch aktiviert. CpG fördert die Zellproliferation und Entwicklung zu Plasmablasten, während IL-10 als weiterer differenzierender Stimulus ebenfalls zur Entwicklung von Plasmablasten beiträgt [83, 84]. Der Einfluss des Pan-Retinsäure-Rezeptoragonisten 9-cis RS auf beide Stimulationen ist noch unbekannt und wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

### 4.2.1. Zellviabilität unter 9-cis Retinsäure

Die intrazelluläre Gentranskription wird durch 9-cis RS über die Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren wie RXR und RAR reguliert [17]. Die physiologische Konzentration von 9-cis RS liegt bei ungefähr 10 nmol/l [85]. Um den Einfluss von 9-cis RS auf die Überlebensrate von stimulierten B-Lymphozyten zu bestimmen, wurden lebende Zellen mit 7-AAD inkubiert. 7-AAD ist ein Fluorochrom (Emissionsmaximum 647 nm), das Zellmembran-impermeabel ist und mit freier DNS interkaliert, wenn Zellen absterben. Die Messung erfolgte 5 Tage nach Stimulation. Zur Quantifizierung wurde die stimulierte Kontrolle gleich 100 % gesetzt. In der Stimulation mit anti-CD40 und IL-4 (T-Zell-abhängige Stimulation) bewirkte die Zugabe von 10, 100 und 1000 nmol 9-cis RS eine geringe Zunahme der Zellviabilität um 4 % ± 1,8, die nicht

signifikant war. Nach Stimulation mit anti-BCR, CpG und IL-10 (T-Zell-unabhängige Stimulation) bewirkte die Zugabe von 10 nmol und 100 nmol 9-cis RS einen Anstieg lebender Zellen um  $10\% \pm 4,2$  und die Zugabe von  $1\ \mu\text{mol}$  9-cis RS einen Anstieg um  $8\% \pm 3,5$ , wobei keine Signifikanz festzustellen war (Abb. 20A). Die Gate-Strategie zum Ausschluss toter Zellen ist exemplarisch in Abb. 20B dargestellt.



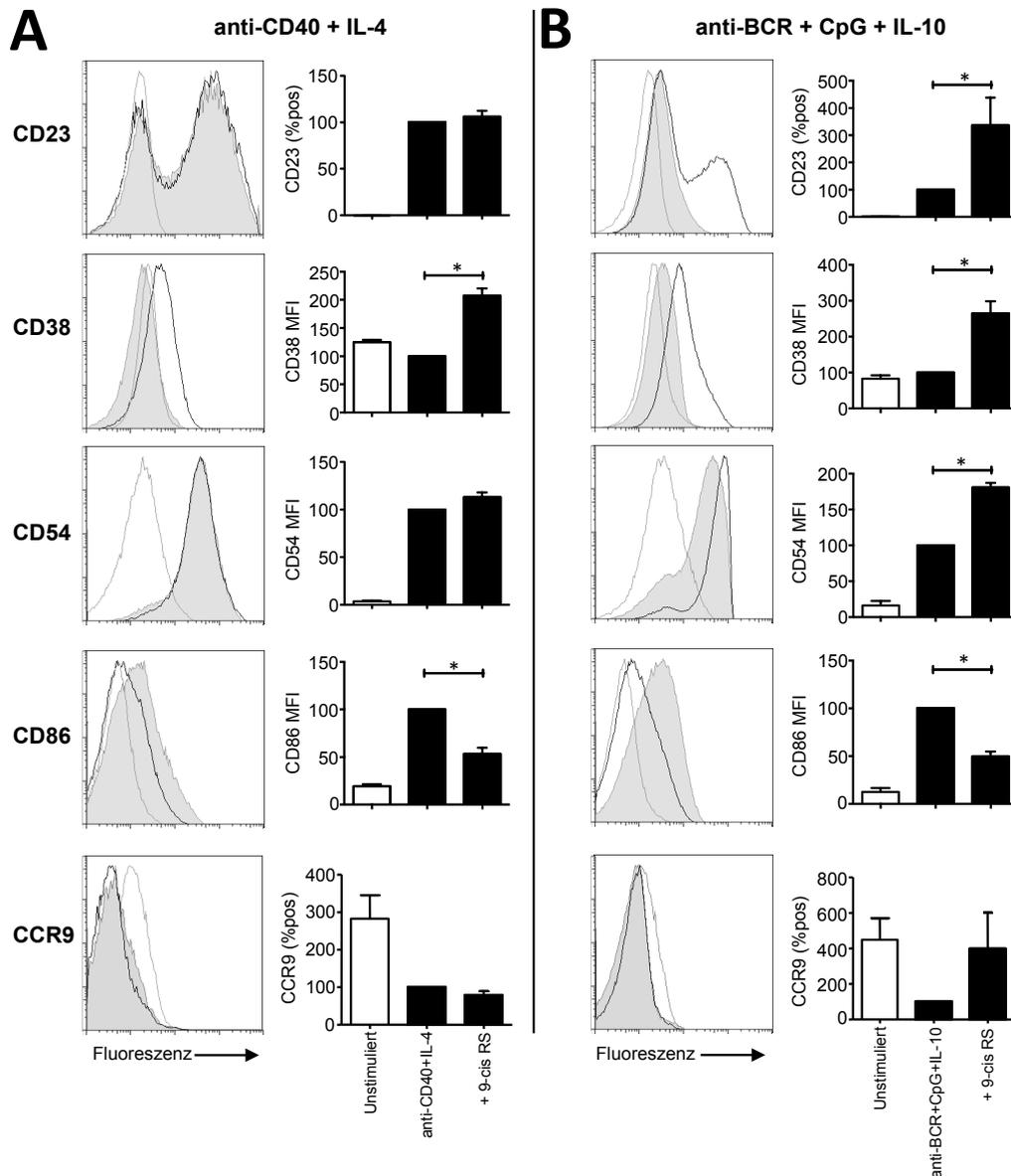
**Abb. 20 – Intakte Zellviabilität in Gegenwart von 9-cis RS.**

CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten 5 Tage nach Stimulation mit anti-CD40 + IL-4 oder anti-BCR + CpG + IL-10  $\pm$  10, 100 und 1000 nmol 9-cis RS. (A) Prozentuale Anzahl lebender Zellen 5 Tage nach Stimulation in Abhängigkeit von 9-cis RS relativ zur stimulierten Kontrolle als arithmetische Mittelwerte + SEM. P = Mann-Whitney U Test (n = 3). (B) Repräsentative Darstellung aktivierter CD19<sup>+</sup> Lymphozyten in einem 7-AAD - CD27 Diagramm  $\pm$  1  $\mu\text{mol}$  9-cis RS. Tote 7-AAD<sup>+</sup> Zellen sind prozentual angegeben.

#### 4.2.2. Aktivierung und Differenzierung von humanen B-Lymphozyten

B-Zellen exprimieren nach IL-4-Aktivierung verstärkt das Oberflächenprotein CD23 [45]. Dagegen führt die Aktivierung mit anti-CD40 und TLR-Liganden zu einer gesteigerten CD54 und CD86-Expression [84, 86]. Wenn B-Zellen das Differenzierungsstadium erreichen, werden die Aktivierungsmarker heruntergeregelt und membranständige Differenzierungsmarker wie CD38 exprimiert [87]. Unter dem Einfluss von 9-cis RS können B-Zellen zudem den Migrationsmarker CCR9 hochregulieren [43]. Um die Wirkung von 9-cis RS auf die Expression

dieser Marker zu untersuchen, wurden Th2-abhängig und T-Zell-unabhängig stimulierte B Lymphozyten bezüglich der Expression von CD23, CD38, CD54, CD86 und CCR9 an Tag 0, 2, 4, 6, 8 und 10 nach Stimulation mittels Durchflusszytometrie gemessen.



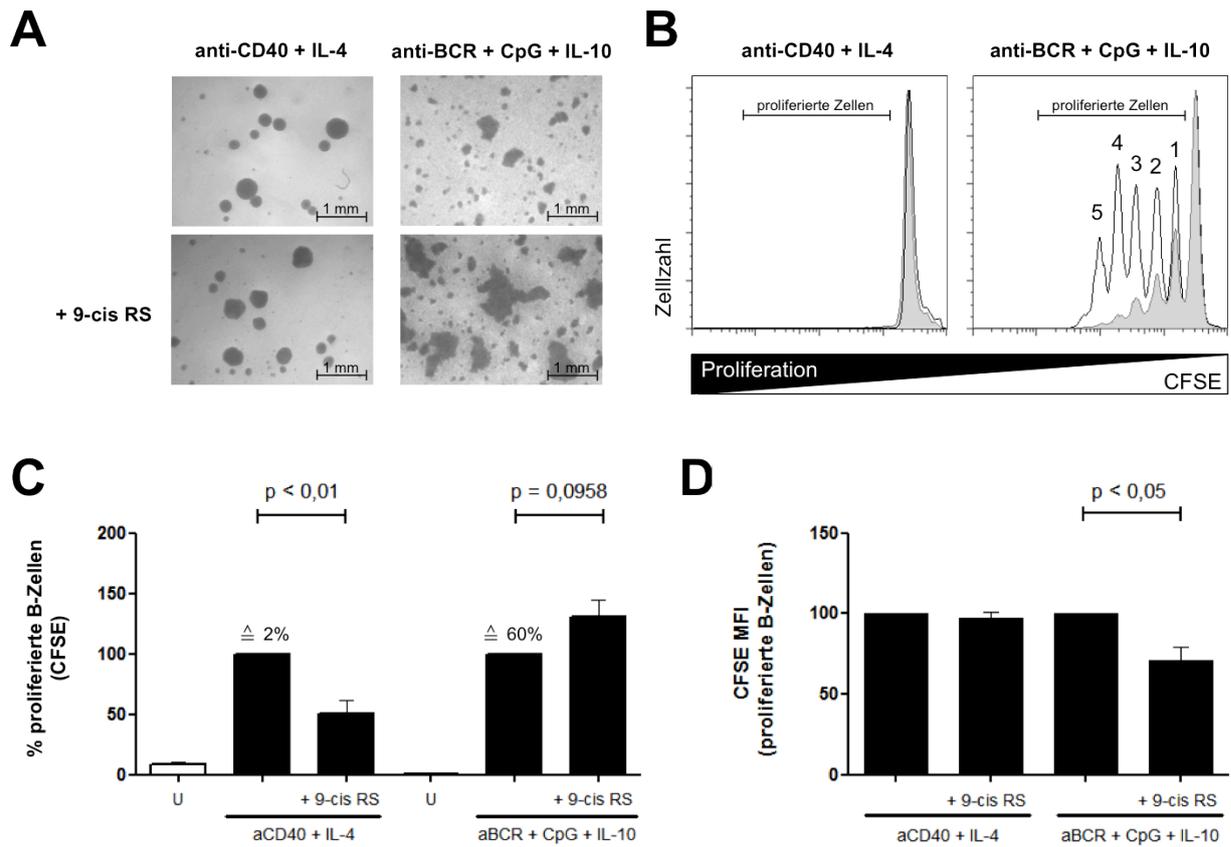
**Abb. 21 – 9-cis RS reguliert die Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern abhängig von der eingesetzten Stimulation.**

CD19+ B-Lymphozyten 4 Tage (CD23) bzw. 8 Tage (CD38, CD54, CD86, CCR9) nach Stimulation (A) anti-CD40 + IL-4 und (B) anti-BCR + CpG + IL-10 ± 100 nmol 9-cis RS. Analyse von CD23, CD54 und CCR9 durch Markierung von Marker-positiven bzw. -negativen Zellen. Analyse von CD38 und CD86 mittels Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI). Die Histogramme zeigen die durchflusszytometrische Analyse von B-Zellen, wobei die graue Linie unstimulierte B-Zellen, die grau gefüllte Linie stimulierte B-Zellen und die schwarze Linie mit 9-cis RS stimulierte B-Zellen repräsentiert. Die Darstellung der Diagramme erfolgt als arithmetische Mittelwerte + SEM. P = Mann-Whitney U Test (\* =  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ).

In der Th2-abhängigen Stimulation wurde durch die Gabe von 9-cis RS die Expression von CD86 signifikant ( $53 \% \pm 6,5$ ) im relativen Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) an Tag 8 des Versuches herunterreguliert. Dagegen kam es in Gegenwart von 9-cis RS zu einer Steigerung der CD38-Expression ( $207 \% \pm 13$ ) im relativen Vergleich zur stimulierten Kontrolle ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ , auch an Tag 8 des Versuches). Die Gegenwart von 9-cis RS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von CD23, CD54 und CCR9 (Abb. 21A). In der T-Zell-unabhängigen Stimulation bewirkte die Gegenwart von 9-cis RS eine Zunahme von CD23<sup>+</sup> B-Zellen auf  $336 \% \pm 102$ , eine Zunahme der CD38-Expression auf  $265 \% \pm 34$ , eine Erhöhung der CD54-Expression auf  $181 \% \pm 6,5$  und eine Halbierung der CD86-Expression ( $50 \% \pm 4,9$ ) im relativen Vergleich zur stimulierten Kontrolle (alle  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ). Dagegen fand sich in Gegenwart von 9-cis RS kein Einfluss auf die Expression von CCR9 (Abb. 21B).

#### 4.2.3. B-Zell-Proliferation

Nach Th2-abhängiger oder T-Zell-unabhängiger Aktivierung treten die B-Zellen in den Zellzyklus ein und proliferieren. Da bekannt ist, dass Retinoide die Zellteilung regulieren [88, 89], wurde die Teilungsrate der B-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse mit Carboxyfluorosuccimidylester (CFSE) 5 Tage nach Stimulation mit  $\pm 10$  nmol 9-cis RS bestimmt. CFSE ist ein fluoreszentes Molekül, das rasch kovalent an Zellproteine bindet. Nach Entfernen des ungebundenen Reagenz werden durch Zellteilung die CFSE-markierten Proteine an die Tochterzellen weitergegeben, die entsprechend geringer gefärbt sind. Es wurde die Anzahl und die CFSE-Fluoreszenz (MFI) der proliferierten Zellen untersucht. Je niedriger der MFI der proliferierten Zellen, desto höher war die Teilungsrate. Zur besseren Beurteilung der beobachteten Veränderungen wurde die stimulierte Kontrolle auf 100 % gesetzt. Die Th2-abhängige Stimulation induzierte eine starke Proliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (12-fach). Die Zugabe von 9-cis RS führte zu einer signifikanten Reduktion der proliferierten Zellen ( $49 \% \pm 10 \%$ ), verglichen mit der stimulierten Kontrolle ( $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ). Der MFI dieser Population reduzierte sich jedoch nur geringfügig ( $3 \% \pm 3,8 \%$ ), verglichen mit der stimulierten Kontrolle. Die T-Zell-unabhängig stimulierten B-Zellen zeigten eine sehr starke Proliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (435-fach). Im Vergleich zur Th2-abhängigen Stimulation fanden sich durch Zugabe von 9-cis RS durchschnittlich 31 % ( $\pm 14 \%$ ) mehr proliferierte B-Zellen in Bezug zur stimulierten Kontrolle ( $p = 0,0958$ ;  $n = 3$ ). Der MFI dieser Zellen verringerte sich signifikant ( $29 \% \pm 7,8 \%$ ) im Vergleich zur stimulierten Kontrolle ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ), was auf eine hohe Teilungsrate hinweist (Abb. 22C, D). Dieser durch 9-cis RS erzeugte Effekt war auch lichtmikroskopisch nachweisbar (Abb. 22A).



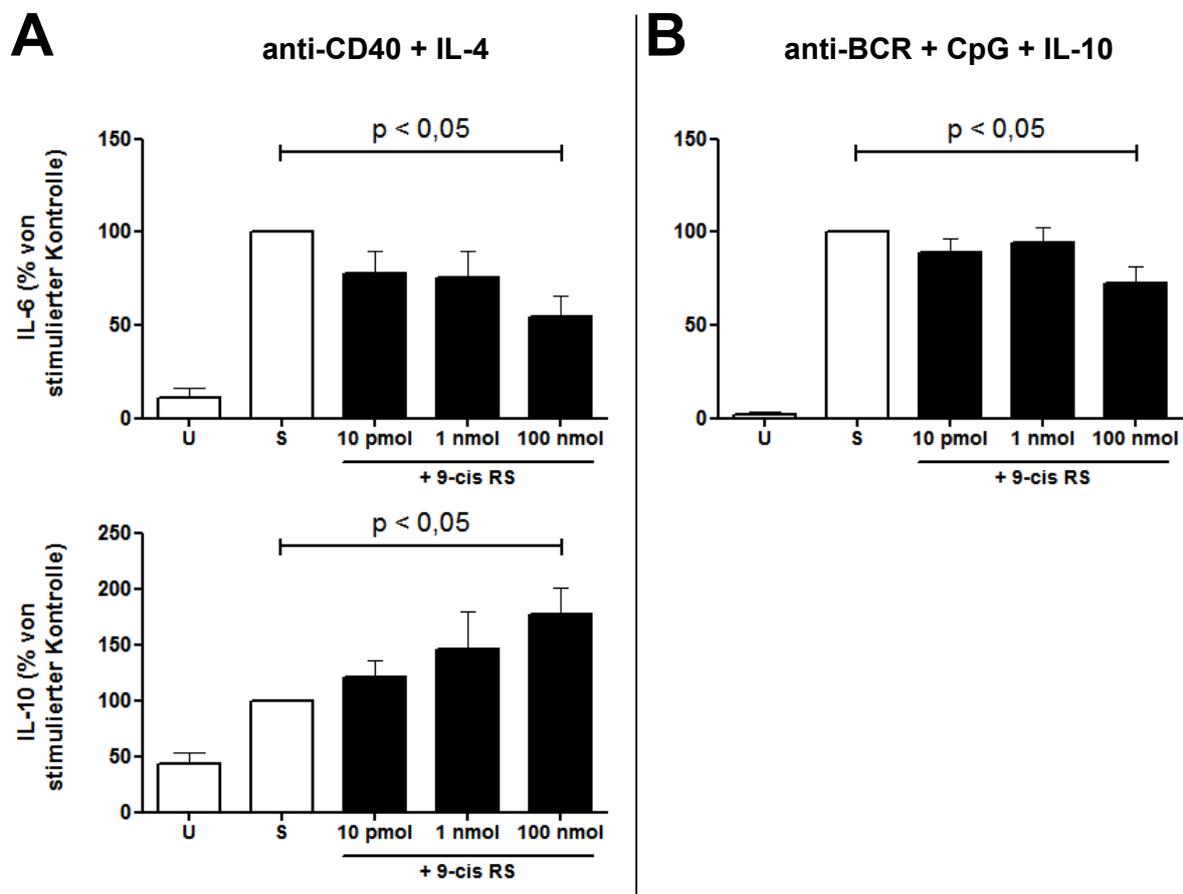
**Abb. 22 – 9-cis RS induzierte eine vermehrte B-Zell-Proliferation in der T-Zell-unabhängigen Stimulation und verringerte die Proliferation in der T-Zell-abhängigen Stimulation.**

CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten 5 Tage nach Stimulation mit anti-CD40 + IL-4 oder anti-BCR + CpG + IL-10  $\pm$  10 nmol 9-cis RS. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme der aktivierten B-Lymphozyten  $\pm$  9-cis RS. (B, C, D) Durchflusszytometrische Analyse mittels CFSE-Verdünnung: (B) Repräsentatives Overlay der Wirkung von 9-cis RS auf die B-Zellproliferation (stimulierte Kontrolle = grau; 9-cis RS = weiß); Anzahl der Teilungen beziffert. (C) Prozentualer Anteil der proliferierten Zellen relativ zur stimulierten Kontrolle als arithmetische Mittelwerte + SEM. (D) Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) von CFSE der proliferierten Zellen relativ zur stimulierten Kontrolle als arithmetische Mittelwerte + SEM. Der MFI korreliert dabei reziprok zur Teilungsrate der Zellen. P = Mann-Whitney U Test (n = 3).

#### 4.2.4. Zytokin- und Immunglobulin-Profil

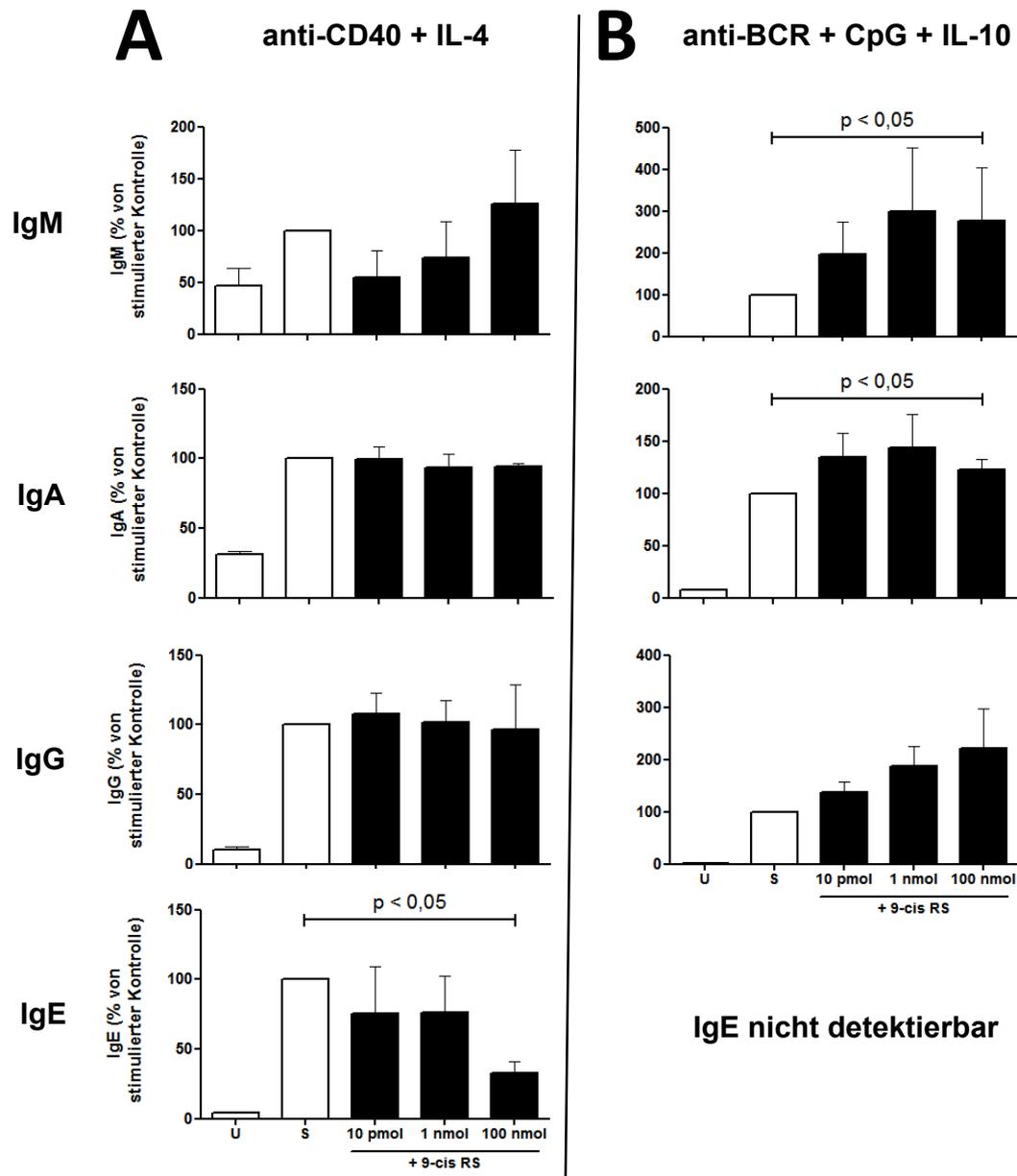
Nach Aktivierung über Th2-abhängige bzw. T-Zell-unabhängige Faktoren produzieren B-Zellen Zytokine, darunter vor allem IL-6 und IL-10. Eine im Vorversuch durchgeführte Kinetik zeigte nach 72 Stunden die höchste Zytokinproduktion (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Zytokine IL-6 und IL-10 72 Stunden nach Stimulation mittels ELISA aus den Zellkulturüberständen gemessen. Die T-Zell-abhängige Stimulation induzierte für IL-6 und IL-

10 eine 9-fache bzw. 2,3-fache Zunahme der Sekretion auf im Mittelwert 36 ng/ml bzw. 16 ng/ml. Nach Zugabe von 100 nmol 9-cis RS veränderte sich die IL-6 Konzentration signifikant ( $45 \% \pm 11$ ,  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ), während die IL-10 Konzentration anstieg ( $77 \% \pm 24$ ,  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ), jeweils im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (Abb. 23A). Die T-Zell-unabhängige Stimulation induzierte eine 52,6-fache Zunahme von IL-6 auf im Mittelwert 1,6 ng/ml. 9-cis RS bewirkte analog zur Th2-Stimulation eine signifikante Abnahme der IL-6 Konzentration um  $27 \% \pm 9,1$  im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Die IL-10 Konzentration im Überstand wurde aufgrund des Stimulationsansatzes, welcher bereits IL-10 enthält, nicht gemessen (Abb. 23B).



**Abb. 23 – 9-cis RS reduzierte die IL-6 Konzentration in beiden Stimuli und erhöhte die IL-10-Konzentration in der Th2-abhängigen Stimulation.**

IL-6 und IL-10 ELISA der Zellkulturüberstände von PBMCs 72 h nach Stimulation mit (A) anti-CD40 + IL-4 oder (B) anti-BCR + CpG + IL-10  $\pm$  10 pmol, 1 nmol oder 100 nmol 9-cis RS. Prozentuale Darstellung relativ zur stimulierten Kontrolle als arithmetische Mittelwerte + SEM. U = Unstimuliert; S = Stimuliert. P = Mann-Whitney U Test ( $n = 4$ ). Die IL-6-Konzentration der stimulierten Kontrolle entspricht durchschnittlich 36 pg/ml in Th2-Stimulation (A) und 1,6 ng/ml in T-Zell-unabhängiger Stimulation (B). Die IL-10-Konzentration der stimulierten Kontrolle entspricht durchschnittlich 16 pg/ml in Th2-Stimulation (A).



**Abb. 24 – 9-cis RS reduzierte die IgE-Konzentration in Th2-abhängiger Stimulation und induzierte eine Zunahme von IgM und IgA in T-Zell-unabhängiger Stimulation.**

ELISA der Zellkulturüberstände von PBMCs 10 Tage nach Stimulation mit (A) anti-CD40 + IL-4 und (B) anti-BCR + CpG + IL-10  $\pm$  10 pmol, 1 nmol oder 100 nmol 9-cis RS. Prozentuale Darstellung relativ zur stimulierten Kontrolle als arithmetische Mittelwerte + SEM. U = Unstimuliert; S = Stimuliert. P = Mann-Whitney U Test (n = 4). Die IgM-Konzentration der stimulierten Kontrolle entspricht durchschnittlich 5,7  $\mu$ g/dl in Th2-Stimulation (A) und 1,8 mg/ml in T-Zell-unabhängiger Stimulation (B). Die IgA-Konzentration der stimulierten Kontrolle entspricht durchschnittlich 71  $\mu$ g/dl in Th2-Stimulation (A) und 166  $\mu$ g/dl in T-Zell-unabhängiger Stimulation (B). Die IgG-Konzentration der stimulierten Kontrolle entspricht durchschnittlich 9,6  $\mu$ g/dl in Th2-Stimulation (A) und 154  $\mu$ g/dl in T-Zell-unabhängiger Stimulation (B). Die IgE-Konzentration der stimulierten Kontrolle entspricht durchschnittlich 2,7 ng/ml in Th2-Stimulation (A).

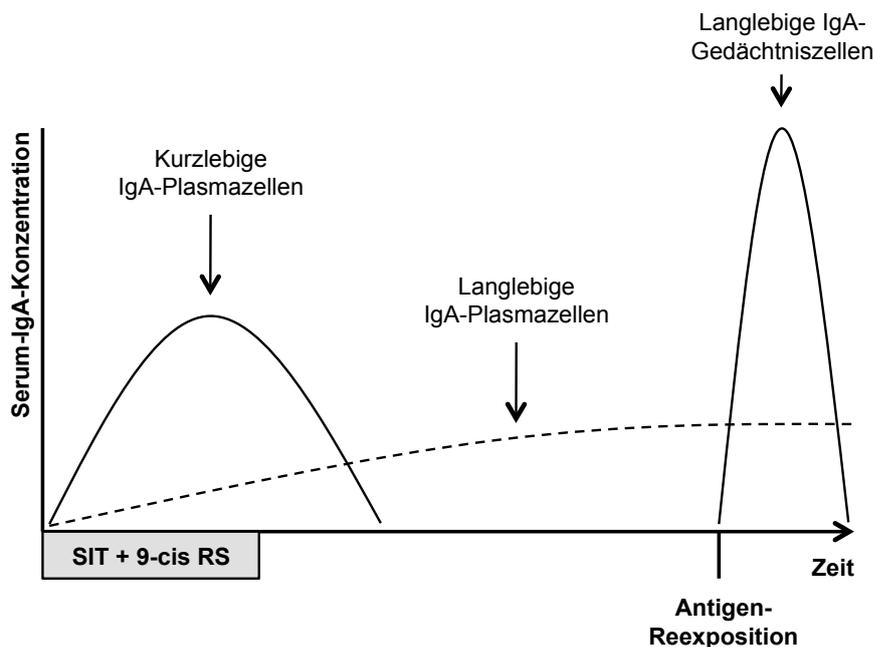
Weiterhin wurden 10 Tage nach Stimulation die Zellkulturüberstände bezüglich IgM, IgA, IgG und IgE untersucht. Zuvor wurden alle *ex vivo* sezernierten Antikörper durch einen Mediumwechsel an Tag 3 nach Stimulation entfernt, um möglichen Messungsartefakten vorzubeugen. Aufgrund der interindividuell stark unterschiedlichen Konzentrationen der Immunglobuline erfolgte die statistische Berechnung in % der stimulierten Kontrolle. Die Th2-abhängige Stimulation führte zu einer Zunahme von IgM (2,1-fach auf im Mittelwert 5,7 µg/dl), IgA (3,2-fach auf im Mittelwert 71 µg/dl), IgG (10-fach auf im Mittelwert 9,6 µg/dl) und IgE (24,4-fach auf im Mittelwert 2,7 ng/ml). Die Zugabe von 9-cis RS führte nicht zu signifikanten Änderungen der IgM-, IgA- und IgG-Konzentrationen im Vergleich zur stimulierten Kontrolle. Dagegen führte die Zugabe von 100 nmol/ml 9-cis RS zu einer signifikanten Reduktion der IgE-Konzentration um 67 % ( $\pm 8,5$  %), verglichen zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) (Abb. 24A). Die T-Zell-unabhängige Stimulation bewirkte eine Zunahme von IgM (263-fach auf im Mittelwert 1,8 mg/dl), IgA (13,2-fach auf den Mittelwert 166 µg/dl) und IgG (43,5-fach auf den Mittelwert 154 µg/dl). IgE konnte erwartungsgemäß nicht detektiert werden. Die Zugabe von 100 nmol 9-cis RS bewirkte einen 2,7-fachen Anstieg von IgM (276 % [ $\pm 129$  %]) ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) sowie eine Zunahme der IgA-Konzentration um 22 % ( $\pm 11$  %) ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ), im Vergleich zur Kontrolle. Die IgG-Konzentration zeigte eine geringe Erhöhung, die jedoch nicht signifikant war ( $p = 0,3094 > 0,05$ ;  $n = 4$ ). (Abb. 24B).

Zusammenfassend zeigen diese Daten deutliche Unterschiede in der Wirkung von 9-cis RS auf die B-Zellaktivierung, in Abhängigkeit von der Stimulation. Die Daten zeigen, dass offensichtlich die T-Zell-unabhängige Aktivierung verstärkt und die T-Zell-abhängige Antwort durch 9-cis RS vermindert wird.

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss des Vitamin-A-Derivats 9-cis Retinsäure (RS) auf die Typ-I-Allergie untersucht, um zu überprüfen, ob mithilfe dieses Adjuvans die spezifische Immuntherapie (SIT) von allergischen Erkrankungen optimiert werden kann. Darauf aufbauend wurde die Wirkung von 9-cis RS auf B-Zellen in einem humanen *in vitro* Modell untersucht.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die humorale Immunantwort durch 9-cis RS, im Zusammenhang mit einer antigenspezifischen Immuntherapie, in einem präklinischen Modell moduliert wird. Es zeigte sich eine durch 9-cis RS verstärkte IgA-Sekretion und eine erhöhte Zahl an IgA-sezernierenden Plasmablasten in den lymphatischen Organen. IgA-Antikörper sind die am häufigsten vorkommenden Immunglobulin-Isotypen der Schleimhäute und spielen eine wichtige Rolle für die mukosale Immunität [90]. Sie erfüllen zwei Funktionen des mukosalen Immunsystems: Hochspezifische IgA-Antikörper neutralisieren gezielt über die Schleimhäute



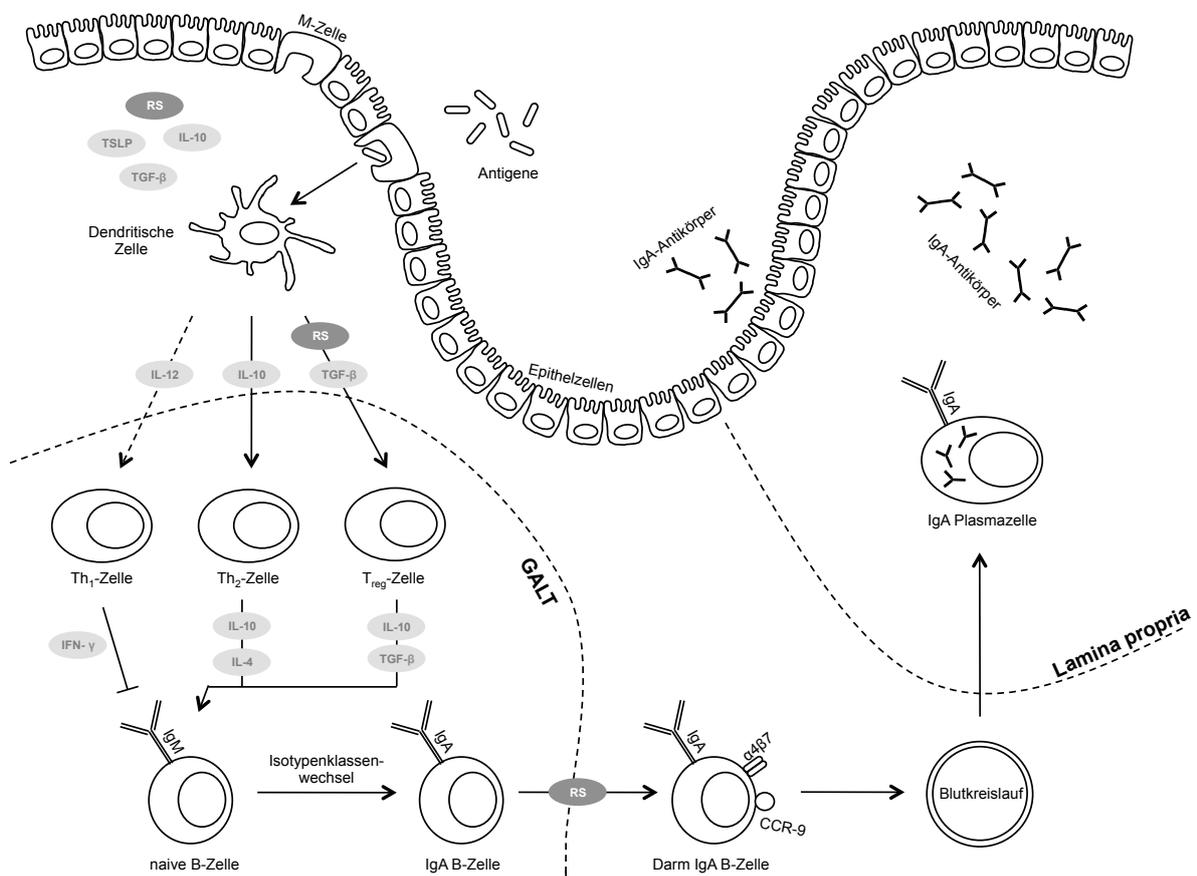
**Abb. 25 – Modell der IgA-Immunität im Therapieverlauf.**

Durch Immuntherapie mit 9-cis RS werden verstärkt kurzlebige und langlebige IgA-Plasmazellen sowie langlebige IgA-Gedächtniszellen erzeugt. Die erhöhten antigenspezifischen IgA-Konzentrationen infolge der SIT werden von kurzlebigen Plasmazellen als Reaktion auf das Antigen erzeugt. Langlebige Plasmazellen erzeugen Immunität durch kontinuierliche antigenspezifische IgA-Produktion. Bei erneuter Antigenprovokation werden Gedächtniszellen aktiviert, die infolge der SIT erzeugt wurden, jedoch inaktiv blieben. Diese differenzieren zu Plasmazellen und tragen wiederum zu hohen antigenspezifischen IgA-Konzentrationen bei.

eindringende Pathogene (ggf. auch Allergene), und unspezifische IgA-Antikörper kontrollieren die Ausbreitung der regulären apathogenen Bakterienflora [90].

### 5.1. Toleranzinduktion durch IgA-sezernierende Plasmazellen und B-Gedächtniszellen

In dieser Arbeit führte die adjuvante Gabe von 9-cis RS während der SIT dosisabhängig zu einem signifikanten Anstieg von antigenspezifischem Serum-IgA *in vivo* (bis zu 10-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe), der durch erneute Antigenprovokation nach 5 Wochen wiederholt induzierbar war (bis zu 20-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe). Dieser Effekt könnte durch die vermehrte Generation von kurz- und langlebigen IgA-Gedächtniszellen bedingt sein, die infolge der Immunreaktion entstehen [81] und kontinuierlich IgA-Antikörper



**Abb. 26 – Einfluss von RS auf den IgA-Isotypenklassenwechsel im Darm.**

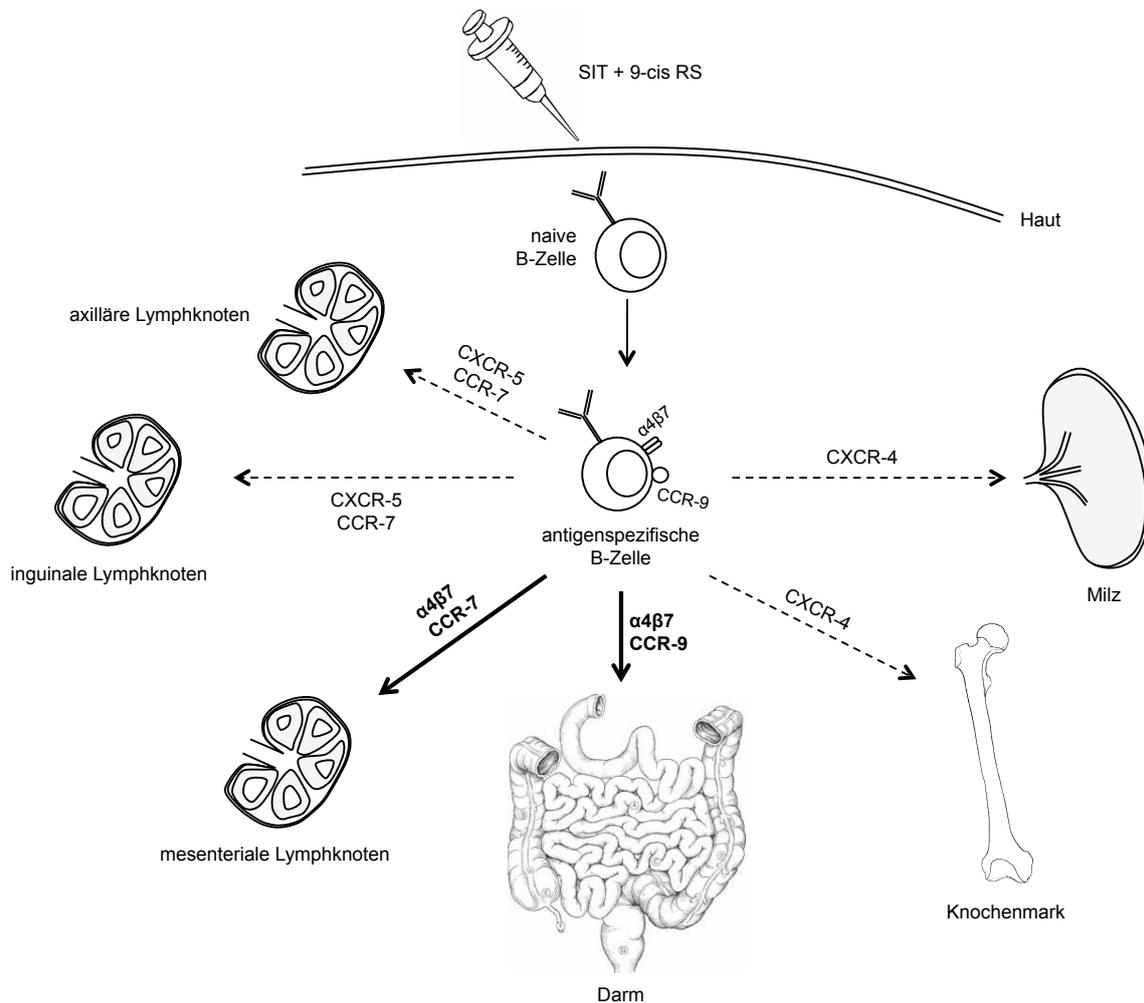
Dendritische Zellen (DC) nehmen Antigene der Darmschleimhaut auf und können unter dem Einfluss von RS und anderen Zytokinen zu tolerogenen DCs reifen, die wiederum RS, TGF-β und IL-10 sezernieren. Dadurch werden vermehrt tolerogene Treg-Zellen gebildet, die wiederum einen IgA-Isotypenklassenwechsel in naiven B-Zellen induzieren. Durch RS erwerben die IgA-B-Zellen die spezifischen Darm-Migrationsmarker α4β7 und CCR9. Über den Blutkreislauf gelangen sie so in die Lamina propria des Darms und differenzieren zu IgA-sezernierenden Plasmazellen (ASZ).

sezernieren [91] (Abb. 25). Einen Hinweis darauf gibt die erhöhte Frequenz IgA-sezernierender Lymphozyten in der Milz. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass RS die Bildung von IgA-sezernierenden Zellen im darmassoziierten Immunsystem (GALT) in Verbindung mit TGF- $\beta$  induziert [92]. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass RS unabhängig von TGF- $\beta$  einen IgA-Isotypenklassenwechsel fördern kann [93]. Dieser Prozess wird in erster Linie durch lokale tolerogene CD103<sup>+</sup> dendritische Zellen (DC) gesteuert, die RS metabolisieren und auto- und parakrin bereitstellen [94, 95]. Naive T-Zellen reifen darunter zu tolerogenen Treg-Zellen [96] und induzieren bei naiven B-Zellen einen Isotypenklassenwechsel von IgM / IgD zu IgA [96-98]. Weiterhin erhöht RS die Expression der Migrationsmarker CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  auf der Oberfläche der B-Zellen, die so über den Blutkreislauf durch Bindung an die spezifischen Liganden CCL25 und MAdCAM-1 [43, 99] in die Lamina propria des Darms gelangen, wo sie zu Plasmazellen ausdifferenzieren und IgA-Antikörper sezernieren [100, 101] (Abb. 26). Es liegt die Vermutung nahe, dass subkutan applizierte 9-cis RS in Verbindung mit der SIT einen Einfluss auf das spezifische Immunglobulinprofil hat, der der physiologischen IgA-Induktion im Darm ähnelt. Einerseits könnte 9-cis RS die Reifung regulatorischer T-Zellen bewirken, die bei B-T-Zellinteraktion in regionalen Lymphknoten wiederum eine tolerogene Immunantwort mit IgA-sezernierenden B-Zellen induzieren. Andererseits könnte 9-cis RS auch direkt in die initiale Aktivierung von B-Zellen eingreifen, indem sie die Migrationsmarker  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9 hochreguliert und somit eine Wanderung in den Darm mit nachfolgendem IgA-Isotypenklassenwechsel induziert, der ebenfalls zur Toleranzinduktion beitragen könnte. Zur genauen Untersuchung der Wirkung von 9-cis RS auf B-Zellen wurde daher die B-Zellmigration *in vivo* untersucht.

## **5.2. Veränderte Gedächtniszell-Migration in die Überlebensnischen des adaptiven Immunsystems**

Im Rahmen einer Immunreaktion spielt die Entstehung antigenspezifischer langlebiger Plasmazellen und B-Gedächtniszellen eine übergeordnete Rolle, da durch diese Zellen nach Ablauf der Immunreaktion ein »Immun-Gedächtnis« etabliert wird, das bei erneuter Provokation mit identischem Antigen eine prompte und starke Antikörpersekretion bewirkt [81]. In diesem Kontext stellt die Besiedlung von Überlebensnischen für letztgenannte Zellen einen entscheidenden Faktor dar. Die Oberflächenexpression von CXCR-4 erlaubt den Eintritt in Nischen wie die Milz und das Knochenmark. Der korrespondierende Ligand CXCL-12 wird von Stromazellen des Knochenmarks und von der roten Pulpa der Milz exprimiert [81, 102]. Ferner wird die Migration in axilläre und inguinale Lymphknoten durch Expression von CXCR-5 und

CCR-7 auf der Zellmembran ermöglicht [103]. Es fanden sich in dieser Arbeit nach der SIT in Kombination mit 9-cis RS reduzierte Zahlen *in vivo* von OVA-IgG1 Plasma- und Gedächtniszellen in den typischen Nischen wie Milz, Knochenmark, axillären und inguinalen Lymphknoten. Passend dazu wurde in der Milz und in inguinalen Lymphknoten unter 9-cis RS-Behandlung eine verminderte Frequenz von  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9+ Lymphozyten festgestellt, während sich in mesenterialen Lymphknoten eine Zunahme von OVA-IgG1 Plasma- und Gedächtniszellen und eine generelle Hochregulation der lymphozytären Expression von  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9 zeigte. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass 9-cis RS die Expression von CCR-7 und CXCR-4 und somit die Migration in Knochenmark und axilläre und inguinale Lymphknoten hemmt [104], jedoch gleichzeitig die Migration in die mesenterialen



**Abb. 27 – Einfluss von 9-cis RS auf die Migration von B-Zellen.**

Durch die SIT in Verbindung mit 9-cis RS erwarben aktivierte antigenspezifische B-Zellen die Migrationsmarker  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9 auf ihrer Oberfläche. Dadurch wurde die Migration der Immunzellen beeinflusst. Gestrichelte Pfeile: Verminderte Zellwanderung unter 9-cis RS; Schwarze Pfeile: Vermehrte Zellwanderung unter 9-cis RS.

Lymphknoten fördert [105]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die antigenspezifischen B-Zellen ihr Migrationsmuster infolge der Immuntherapie mit 9-cis RS verändern. Dies könnte durch vermehrte Expression von  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9 vermittelt sein, da diese Oberflächenmarker die B-Zellen während der Immuntherapie in den Darm bzw. die mesenterialen Lymphknoten und nicht in die klassischen Nischen wie Milz und Knochenmark lenken [105, 106] (Abb. 27).

### **5.3. Tolerogene Wirkung der modulierten IgE- und IgG1-Sekretion**

Neben der Wirkung auf IgA-Antikörper zeigte 9-cis RS auch Effekte auf weitere Immunglobulintypen. In dieser Arbeit fiel insbesondere die nachhaltig reduzierte IgE-Sekretion auf. Der Antikörper IgE stellt im humanen wie im murinen Modell das Schlüsselmolekül der allergischen Immunantwort dar. Er bindet über den hochaffinen Rezeptor Fc $\epsilon$ RI an Effektorzellen (hauptsächlich Mastzellen). Ein Antigenkontakt führt dabei über IgE-Quervernetzung zur sofortigen Zellaktivierung und Freisetzung von zahlreichen Mediatoren, die eine allergische Sofortreaktion auslösen [61]. Eine systemische Reduktion der IgE-Werte könnte eine Möglichkeit darstellen, die klinische Wirksamkeit der Immuntherapie zu optimieren. Frühere Studien konnten bereits darlegen, dass RS die IgE-Synthese hemmt [45, 47]. Interessanterweise konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass antigenspezifische IgE-Antikörper *in vivo* 5 Wochen nach SIT in Verbindung mit 9-cis RS signifikant niedriger sind. Entsprechend zeigte sich nach Antigenprovokation eine verminderte Anzahl antigenspezifischer IgE-sezernierender Zellen in der Milz. Somit könnte insgesamt weniger IgE zur Verfügung stehen, um eine allergische Sofortreaktion auszulösen. Da sich die IgE-spezifischen Werte proportional zur Anzahl IgE-produzierender Zellen verhalten, könnte dies auch ein Hinweis auf verminderte antigenspezifische Th2-Zellzahlen sein.

Ferner konnte eine durch 9-cis RS induzierte temporäre Zunahme von IgG1-Antikörpern während der SIT gemessen werden. Murines IgG1 stellt den korrespondierenden Antikörper zu humanem IgG4 dar, der durch eine SIT induziert wird und das Antigen bindet, ohne das Komplementsystem zu aktivieren [107]. Daher könnte eine vermehrte Verfügbarkeit von spezifischen IgG1-Antikörpern analog zu IgA das Antigen binden und neutralisieren, bevor es an Mastzell-gebundenes IgE binden kann. Da der durch 9-cis RS initial beobachtete Anstieg von IgG1 zum Zeitpunkt der Antigenprovokation jedoch auf das Niveau der Kontrollgruppe sank, ist fraglich, inwieweit dieser Effekt klinisch relevant ist.

#### **5.4. Die Wirkung von Retinsäure auf humane B-Zellen ist abhängig von kostimulatorischen Faktoren**

Die experimentellen Daten zeigen, dass nach Behandlung mit 9-cis RS deutlich veränderte Ig-Antworten nachweisbar waren. Die Wirkung von 9-cis RS ergibt sich dabei sehr wahrscheinlich aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Akteure im Immunsystem, wozu neben den B-Zellen auch T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen gehören. Da B-Zellen als Antikörper-Produzenten das humorale Immunsystem bestimmen, wurde in dieser Arbeit die spezifische Wirkung von 9-cis RS auf B-Zellen in einem *in vitro* Modell mit einer T-Zell-abhängigen (indirekten) und einer T-Zell-unabhängigen (direkten) Stimulation untersucht. Der T-Zell-abhängige Stimulus mit anti-CD40 und IL-4 diente zur Simulation einer Th2-abhängigen B-Zellaktivierung. Sie ist charakterisiert durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-13 und IgE. Man geht aktuell davon aus, dass sich diese spezifische Immunantwort im natürlichen Umfeld des Menschen zur Abwehr von Parasiten entwickelt hat. Es wurde einmalig beschrieben, dass eine Infektion mit Würmern eine Th2-Reaktion auslösen und gleichzeitig eine Th1- und Th17-Immunreaktion vermindern kann [108, 109]. In Hinblick auf Typ-I-Allergien spielt nun eine aus dem Gleichgewicht geratene Th2-Reaktion auf harmlose Antigene eine entscheidende Rolle [61]. Vitamin A und sein Derivat RS scheinen in diesem Kontext ein wichtiger Modulator der Th2-abhängigen Immunantwort zu sein [27]. Beispielsweise wurde einmalig beschrieben, dass ein Vitamin A-Mangel parasitäre Infektionen begünstigen kann [110] und zugleich mit einer höheren Allergie-Prävalenz assoziiert ist [18, 76, 77]. Zusätzlich wurde eine T-Zell-unabhängige Stimulation der B-Zellen durchgeführt, um zu klären, ob 9-cis RS die B-Zellen nur im Th2-spezifischen Kontext oder generell, Stimulus-unabhängig moduliert. Die T-Zell-unabhängige Stimulation mit anti-BCR, CpG und IL-10 simuliert eine direkte B-Zellaktivierung über TLR-9 (*Toll-like receptor 9*) und membrangebundenes IgM / IgG. IL-10 dient dabei als Differenzierungsfaktor und fördert die Plasmablastendifferenzierung [83]. Gemäß der 3-Signal-Theorie wird eine B-Zelle erst durch die Kombination dieser 3 Faktoren aktiviert, wobei das Thymus-unabhängige Antigen CpG das potenteste Aktivierungssignal darstellt [82, 84]. Die zusätzliche Gabe von anti-CD40 ist dagegen nicht notwendig, da die aus peripherem Blut gewonnenen B-Zellen Gedächtniszellen sind und die Reaktivierung über den Antigenkontakt ausreicht [111].

In beiden Stimulationsversuchen wurden humane B-Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet, da sie die RS-abhängigen Rezeptoren RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  [85, 112] exprimieren. PBMCs exprimieren ebenfalls RXRs und RARs [113]. Das Ansprechen der B-

Zellen auf die Stimulation mit Retinoiden wurde durch den Oberflächenmarker CD38 überprüft, der nachweislich durch Retinoide hochreguliert wird [114, 115]. Die CD38-Expression wurde in beiden verwendeten Stimulationsmodellen in Gegenwart von 9-cis RS erhöht. Weitere im Vorfeld durchgeführte Untersuchungen zur Toxizität von 9-cis RS zeigten zudem, dass 9-cis RS in einer sehr hohen Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  die Überlebensfähigkeit der B-Zellen leicht verbesserte. Diese Ergebnisse wurden auch in einer anderen Studie beobachtet, in der die Toxizität von 1  $\mu\text{mol}$  9-cis RS und ATRA auf B-Vorläuferzellen untersucht wurde [85].

Die Untersuchung der Aktivierungsmarker zeigte eine Induktion von CD23 durch 9-cis RS, einen IgE-Rezeptor mit niedriger Affinität, wie sie auch in anderen Studien mit ATRA beschrieben wurde [45, 116]. In der T-Zell-unabhängigen Stimulation war die Induktion signifikant messbar, während sie in Th2-abhängiger Stimulation durch den ebenfalls CD23-induzierenden IL-4-STAT-6 Signalweg maskiert wurde. Dagegen wurde CD86, ein wichtiges kostimulatorisches Molekül im Zuge der B-T-Zellinteraktion, in beiden Stimulationsmodellen herunterreguliert. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch den inhibitorischen Effekt von 9-cis RS auf den intrazellulären NF $\kappa$ B-Signalweg [117]. Interessanterweise ist die CD86-Expression auf B-Zellen von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale im Vergleich zu gesunden Individuen erhöht [118]. Analog dazu zeigen einige Daten, dass die Blockierung von CD80/86 eine tolerogene Immunantwort induzieren kann und somit auch positive Effekte auf allergische Erkrankungen haben könnte [119, 120].

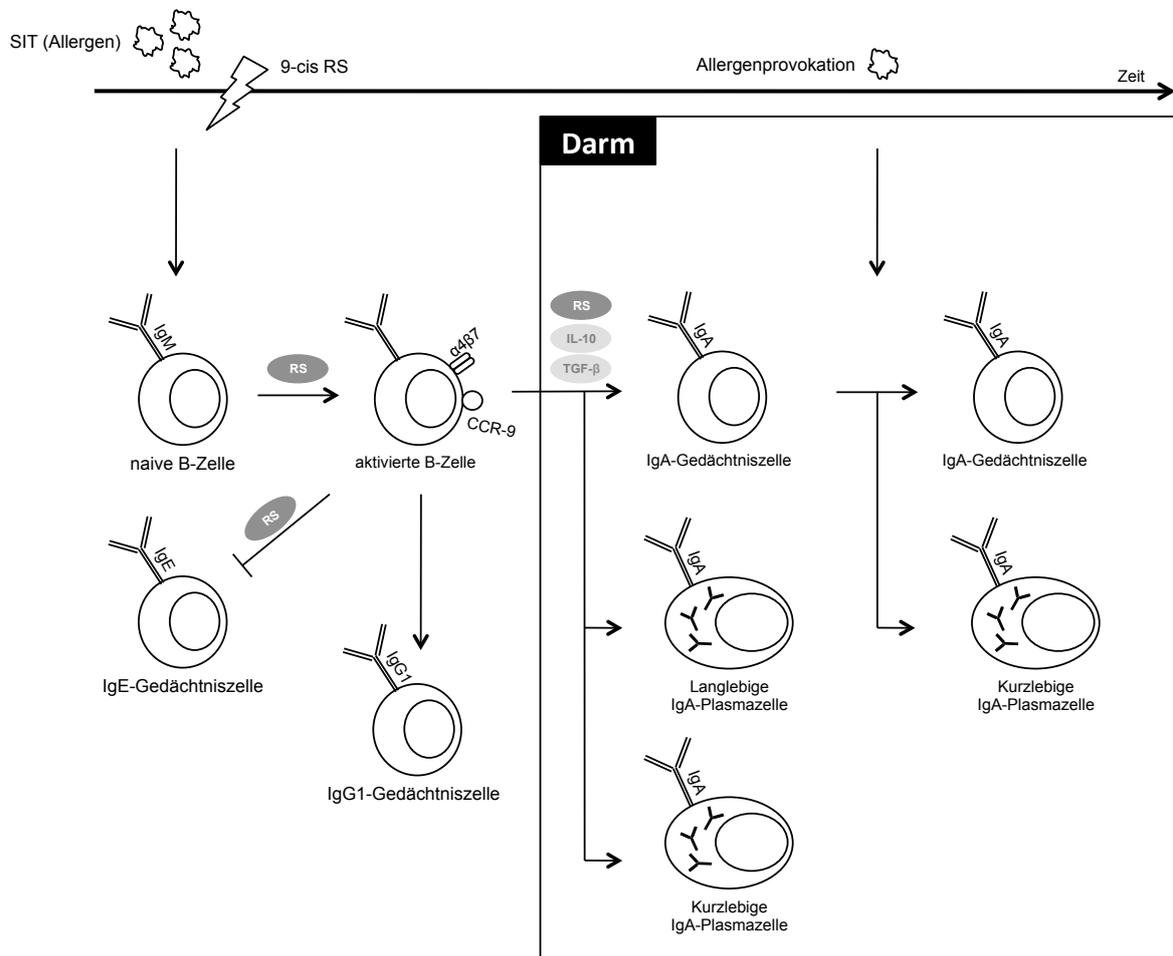
Im Rahmen der Aktivierung wurde auch die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-10 untersucht. Die IL-6-Produktion wurde durch 9-cis RS inhibiert, was auch frühere Studien zeigen [45-47]. IL-6 fördert die Plasmazelldifferenzierung von B-Zellen und wird mit Autoimmunerkrankungen assoziiert [121-123]. Ferner spielt IL-6 eine entscheidende Rolle beim IL-4 vermittelten IgE-Isotypenklassenwechsel von B-Zellen [45, 124]. IL-10 wurde in der Th2-abhängigen Stimulation vermehrt nachgewiesen. Dieser Effekt ist indirekt vermittelt, da sich auf dem IL-10 Genabschnitt keine RARE bzw. RXRE befinden [88]. Als mögliche Erklärung könnte die durch RS verstärkte Aktivierung von p38MAPK infrage kommen, die in der Folge die Transkription von IL-10 induziert [88]. IL-10 wird primär mit antiinflammatorischen Eigenschaften assoziiert. Es fördert Viabilität, Proliferation sowie die Ig-Produktion von B-Zellen und wird von T-Zellen und myeloischen antigenpräsentierenden Zellen produziert [83, 125, 126]. Weiterhin unterstützt es die Generierung tolerogener regulatorischer T-Zellen aus naiven Zellen [69].

Nach Aktivierung treten die B-Zellen in den Zellzyklus ein und teilen sich. In Bezug auf die Proliferation ist bekannt, dass RS unabdingbar für die Teilung von aktivierten B-Zellen ist [89]. Die Daten dieser Arbeit zeigen ebenfalls eine stark erhöhte B-Zellproliferation im Rahmen der T-Zell-unabhängigen Stimulation, die sogar lichtmikroskopisch sichtbar war. Tatsächlich verstärkt 9-cis RS die über CpG gesteuerte Aktivierung von p38MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) in B-Zellen und erhöht somit die Zellteilung [88]. Die exklusive Stimulation mit anti-BCR inhibiert dagegen die Proliferation unter RS, u.a. durch Hemmung des Zellzyklus [46, 127]. In der Th2-abhängigen Stimulation zeigte 9-cis RS nur marginale Effekte auf die B-Zellproliferation. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Studie, in der ebenfalls keine wesentliche Änderung der Anzahl proliferierter B-Zellen in der CD40 + IL-4 Stimulation festgestellt wurde [128]. In der gleichen Studie wird auch gezeigt, dass anti-BCR, anti-CD40 und IL-4, für sich allein genommen, die B-Zellproliferation in Gegenwart von RS nicht steigern. Die Stimulations-abhängige Wirkung von 9-cis RS auf die B-Zellproliferation könnte durch die spezifische Expression von bis jetzt unbekanntem Kofaktoren bedingt sein. Jedoch wird dadurch insgesamt die Relevanz von RS als kontextspezifischer Modulator der Immunantwort unterstrichen.

RS besitzt ebenfalls einen Einfluss auf die Immunglobulinsynthese aktivierter B-Zellen. In der T-Zell-unabhängigen Stimulation fand sich eine durch 9-cis RS vermittelte Zunahme von IgM, IgA und IgG (letzteres nicht signifikant), möglicherweise bedingt durch RS-induzierte Aktivierung von p38MAPK über den RAR-Signalweg [88]. Die T-Zell-unabhängige Aktivierung von B-Zellen mit nachfolgender schneller Ig-Sekretion spielt physiologisch eine wichtige Rolle in der initialen Thymus-unabhängigen Immunantwort, z.B. gegen Bakterien mit membranständiger Expression von Lipopolysacchariden (LPS), Lipiden oder Nukleinsäuren [129]. Dieser Effekt wird sich bereits bei der Impfung gegen *Streptococcus pneumoniae* oder in immunsupprimierten Patienten nach Splenektomie (z.B. bei idiopathischer Immuntrombozytopenie) zu nutze gemacht [130, 131]. Da die T-Zell-unabhängig initiierte Immunantwort ca. 6 Monate anhält [132], könnte eine adjuvante Gabe von 9-cis RS bei einer vergleichbaren Impfung die Antikörpersekretion steigern und die protektive Immunität optimieren. Im Rahmen der Th2-abhängigen Stimulation zeigte sich in erster Linie eine reduzierte IgE-Produktion durch B-Zellen. Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich durch eine Hemmung des IgE-Isotypenklassenwechsels und eine verminderte IL-6 Produktion zu erklären; beide Befunde wurden bereits für ATRA über den RAR-Signalweg gezeigt [45, 47]. Dieses Ergebnis deckt sich mit der *in vivo* beobachteten Reduktion von IgE-Plasmablasten und dementsprechend der IgE-Werte.

### 5.5. Zusammenfassendes Modell der Toleranzinduktion durch 9-cis Retinsäure

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass 9-cis RS im Kontext der SIT auf immunologischer Ebene adjuvante Wirkungen vermittelt, da es im Tierversuch antigenspezifisches IgA nachhaltig (d.h. auch nach Therapieende) erhöhte. Dies wurde durch eine vermehrte Generation von IgA-sezernierenden Plasma- und Gedächtniszellen in lymphatischen Organen ausgelöst. Ursächlich dafür könnte die via 9-cis RS vermittelte Hochregulation der Oberflächenmarker  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9 auf aktivierten B-Zellen sein. Die Expression dieser Oberflächenmarker fördert die Migration in den Darm und die mesenterialen Lymphknoten, wo ein Isotypenklassenwechsel zu IgA stattfindet – offensichtlich zulasten konventioneller Nischen wie der Milz, dem Knochenmark und anderer Lymphknotenstationen. Gleichzeitig waren die



**Abb. 28 – Hypothetisches Modell der adjuvanten Wirkung von 9-cis RS bei der spezifischen Immuntherapie.**

Durch die SIT in Verbindung mit 9-cis RS wird die Migration von B-Zellen in den Darm induziert. Dort findet unter dem Einfluss weiterer Faktoren ein bevorzugter Isotypenklassenwechsel zu IgA statt. Gleichzeitig wird der Isotypenklassenwechsel zu IgE von 9-cis RS direkt gehemmt. Es entstehen antigenspezifische IgA-Plasma- und Gedächtniszellen.

IgE-Konzentrationen und die Zahl IgE-sezernierender B-Zellen durch 9-cis RS reduziert. Die Untersuchung von 9-cis RS in einem humanen *in vitro* Modell bestätigte die im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse teilweise. So förderte 9-cis RS im Th2-abhängigen Kontext sowohl die Plasmazelldifferenzierung als auch die IL-10-Produktion und hemmte die Synthese von IL-6 und IgE. Im Gegenzug zeigte sich, dass 9-cis RS je nach *in vitro* Stimulation unterschiedliche Effekte auf die Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern, die Proliferation, aber auch die Zytokin- und Immunglobulinsynthese hatte, die nicht die Ergebnisse des Tierversuchs reflektierten. Dies könnte durch die isolierte Betrachtung von B-Zellen bedingt sein, die das Zusammenspiel von dendritischen Zellen, T-Zellen und anderen Faktoren des Immunsystems ausblendet. Insgesamt kann eine adjuvante Wirkung von 9-cis RS in der Allergitherapie im folgenden Modell durch die dargestellten Hypothesen nachvollzogen werden (Abb. 28).

### **5.6. Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Daten dieser Arbeit weisen auf einen positiven adjuvanten Effekt von 9-cis RS in der spezifischen Immuntherapie allergischer Erkrankungen hin. Es zeigte sich, dass 9-cis RS in Verbindung mit der spezifischen Immuntherapie (SIT) *in vivo* das Immunglobulin-Profil derart moduliert, dass möglicherweise positive klinische Effekte entstehen. Es wurde eine IgA-dominierte Immunantwort auf das Allergen induziert, was durch eine modulierte Migration der Lymphozyten und die daraus resultierende Zunahme lang- und kurzlebiger IgA-sezernierender Zellen zu erklären sein könnte. Da diese Ergebnisse jedoch nicht den klinischen Erfolg der SIT reflektieren, sollten in einem nächsten Schritt funktionelle Konsequenzen näher untersucht werden. Eine Möglichkeit stellt die Induktion von allergischem Asthma bronchiale im murinen Modell mit nachfolgender Analyse der Atemwegshyperreaktivität dar.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Fokus auf B-Lymphozyten gelegt, die in Milz, Knochenmark und Lymphknoten lokalisiert sind. Da jedoch die Hauptwirkung von RS im Darm entfaltet wird [35, 43, 106], könnten in weiteren Studien darmständige B-Zellen untersucht werden. Ferner führt RS im Darm zu einer vermehrten Bildung regulatorischer T-Zellen. Somit stellt auch die Untersuchung der T-Zellpopulationen einen nächsten Schritt zum Verständnis der tolerogenen Wirkung von RS in Verbindung mit der SIT dar. Zugleich könnte die Wirkung von 9-cis RS während der SIT genauer untersucht werden, indem eine Kinetik der B- und T-Zellmigration sowie der Expression der Migrationsmarker CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  erstellt wird. In diesem Kontext kann zudem bestimmt werden, inwieweit die Wirkung von RS direkt oder durch die Induktion von Zellmigration vermittelt wird. Die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die *in vivo* Untersuchungen teilweise, insbesondere die im Th2-Kontext beobachtete IgE-

Inhibition. In einem nächsten Schritt könnte der genaue Wirkmechanismus von 9-cis RS auf die IgE-Sekretion und die Expression der Gene Pax5, Blimp1, Bach2, BCL6 oder XBP1 studiert werden, die einen Einfluss auf die B-Zelldifferenzierung haben und als molekulare Phänotypisierungsmarker dienen [133]. Weiterhin ist zu klären, ob und welcher Vitamin A-Rezeptor die Wirkung von 9-cis RS vermittelt und ob dieser durch alternative Moleküle direkt aktiviert werden kann. Interessanterweise steigerte 9-cis RS im T-Zell-unabhängigen Modell die Proliferation mit anschließender Ig-Produktion. Hier könnten weitere Untersuchungen ansetzen, um die Wirkung von RS in Kombination mit B-Zell-unabhängigen Impfstoffen zu evaluieren, beispielsweise im Rahmen einer Pneumokokkenimpfung.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungen

7-AAD:	7-Aminoactinomycin
ADH:	Alkoholdehydrogenase
AEC:	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AK:	Antikörper
Alum:	Aluminiumhydrochlorid
APC:	Allophycocyanin
APZ:	Antigenpräsentierende Zelle
ASZ:	Antigensezernierende Zelle
ATRA:	All-Trans-Retinsäure ( <i>all-trans retinoic acid</i> )
axLK:	axillärer Lymphknoten
BCR:	B-Zell-Rezeptor
Bio:	Biotin
BSA:	Bovines Serumalbumin
CCR:	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD:	Unterscheidungsgruppen ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFSE-DA:	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CFSE:	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
DMF:	N-N-Dimethylformamid
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
DRFZ:	Deutsches Rheumaforschungszentrum
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA:	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
ELISPOT:	<i>Enzyme-linked-immunospot-assay</i>
ELIT:	epikutan applizierte spezifische Immuntherapie
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
FCS:	Fetales Kälberserum ( <i>Fetal calf serum</i> )
FOXP3:	<i>forkhead box P3</i>
GALT:	Darm-assoziiertes lymphatisches System ( <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
GATA3:	<i>trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3</i>
GZ:	Gedächtniszelle
IFN:	Interferon
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
ILIT:	intralymphatisch applizierte spezifische Immuntherapie
inLK:	inguinaler Lymphknoten
i.p.:	intraperitoneal
LU:	Laboreinheiten ( <i>labor units</i> )
LPS:	Lipopolysaccharide
LXR:	<i>Liver X Receptor</i>
MAF:	<i>macrophage-activation factor</i>
MFI:	durchschnittliche Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC:	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mLK:	mesenterialer Lymphknoten
mRNA:	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NaCl:	Natriumchlorid
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

OVA:	Ovalbumin
p38MAPK:	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBMC:	periphere mononukleäre Blutzelle ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PBS:	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid
PBST:	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid + Tween
PE:	Phycoerythrin
PerCP:	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>
PPAR $\gamma$ :	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
PZ:	Plasmazelle
RALDH:	Retinal-Dehydrogenase
RAR:	Retinsäure-Rezeptor ( <i>retinoic acid receptor</i> )
RARE:	<i>Retinoic acid response elements</i>
RBP:	Retinol-bindendes Protein ( <i>retinol-binding protein</i> )
rpm:	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RS:	Retinsäure
RXR:	<i>Retinoic X receptor</i>
RXRE:	<i>Retinoic X response elements</i>
SA:	Streptavidin
SA-AP:	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
SA-HRP:	Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase ( <i>Streptavidin-horseradish-peroxidase</i> )
SD:	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM:	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SCIT:	subkutan applizierte spezifische Immuntherapie
SIT:	spezifische Immuntherapie
SLIT:	sublingual applizierte spezifische Immuntherapie
STAT6:	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
TGF:	Tumorstromafaktor ( <i>tumor growth factor</i> )
Th1:	T-Helfer Zellen Typ 1
Th2:	T-Helfer Zellen Typ 2
Th17:	T-Helfer Zellen Typ 17
TLR-9:	<i>Toll-like receptor 9</i>
TMB:	Tetramethylbenzidin
TNF:	Tumornekrosefaktor
Treg:	regulatorische T-Zellen
TLSP:	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TZR:	T-Zell-Rezeptor
VDR:	Vitamin-D-Rezeptor

## 6.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellen

Tab. 1 – Fluorochrom-gekoppelte Antigene der OVA-IgG1 Plasma- und Gedächtniszellfärbung.....	23
Tab. 2 – Fluorochrom-gekoppelte Antigene der Migrationsmarker-Färbung.....	25
Tab. 3 – Behandlung der B-Lymphozyten mit 2 Stimulationsansätzen.....	30
Tab. 4 – Fluorochrom-gekoppelte Antigene der Aktivierungs- sowie der Differenzierungs- und Migrationsmarker-Färbung.....	31
Tab. 5 – 9-cis RS verringerte die Anzahl von CCR9+ und $\alpha 4\beta 7$ + B-Zellen in der Milz in der 3 mg Gruppe.....	43
Tab. 6 – 9-cis RS verringerte die Anzahl von CCR9+ und $\alpha 4\beta 7$ + B-Zellen in mesenterialen Lymphknoten und erhöhte gleichzeitig die zelluläre Expression von CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ .....	44

### Abbildungen

Abb. 1 – Stoffwechsel von Vitamin A.....	7
Abb. 2 – Sensibilisierungs- und Effektorphase der Typ-I-Allergie.....	11
Abb. 3 – Immunologische Wirkungsweise der spezifischen Immuntherapie.....	14
Abb. 4 – Therapieschema des Tiermodells.....	18
Abb. 5 – Schematische Darstellung des ELISPOT-Prinzips.....	20
Abb. 6 – Repräsentative 96-well-ELISPOT-Microtiterplatte.....	21
Abb. 7 – Repräsentative Darstellung der Gate-Strategie einer OVA-IgG1-Plasmazellfärbung in der Milz einer OVA-sensibilisierten Maus.....	24
Abb. 8 – Spezifität und Sensitivität der OVA-IgG1-Plasmazellfärbung.....	25
Abb. 9 – Repräsentative Darstellung der Gate-Strategie einer Darm-Homing-Färbung von Milzzellen einer OVA-sensibilisierten Maus.....	26
Abb. 10 – Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	27
Abb. 11 – Reinheitsbestimmung der B-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie.....	28
Abb. 12 – Prinzip der Proliferationsmessung mithilfe von CFSE.....	30
Abb. 13 – Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Serum-Antikörperkonzentration durch Blutentnahmen.....	34
Abb. 14 – 9-cis RS induzierte einen Anstieg der antigenspezifischen IgA-Serumwerte nach OVA-Exposition.....	35
Abb. 15 – 9-cis RS reduzierte nachhaltig die antigenspezifischen IgE-Serumwerte und induzierte einen temporären Anstieg von OVA-IgG1-Antikörpern.....	36
Abb. 16 – 9-cis RS erhöhte die Anzahl OVA-IgA sezernierender Plasmazellen in der Milz.....	38
Abb. 17 – Durch die Behandlung mit 9-cis RS war die Frequenz OVA-IgE und OVA-IgG1 sezernierender Plasmazellen vermindert.....	39
Abb. 18 – Vergleichbarer Zusammenhang von OVA-IgG1-Zellzahlen in ELISPOT und FACS-Analyse.....	40
Abb. 19 – Erhöhte Frequenz OVA-spezifischer Plasma- und Gedächtniszellen in mesenterialen Lymphknoten bei gleichzeitiger Reduktion der Frequenz in Milz infolge der Therapie mit 9-cis RS.....	42
Abb. 20 – Intakte Zellviabilität in Gegenwart von 9-cis RS.....	47
Abb. 21 – 9-cis RS reguliert die Expression von Aktivierungs- und Differenzierungsmarkern abhängig von der eingesetzten Stimulation.....	48
Abb. 22 – 9-cis RS induzierte eine vermehrte B-Zell-Proliferation in der T-Zell-unabhängigen Stimulation und verringerte die Proliferation in der T-Zell-abhängigen Stimulation.....	50
Abb. 23 – 9-cis RS reduzierte die IL-6 Konzentration in beiden Stimuli und erhöhte die IL-10-Konzentration in der Th2-abhängigen Stimulation.....	51
Abb. 24 – 9-cis RS reduzierte die IgE-Konzentration in Th2-abhängiger Stimulation und induzierte eine Zunahme von IgM und IgA in T-Zell-unabhängiger Stimulation.....	52
Abb. 25 – Modell der IgA-Immunantwort im Therapieverlauf.....	54
Abb. 26 – Einfluss von RS auf den IgA-Isotypenklassenwechsel im Darm.....	55
Abb. 27 – Einfluss von 9-cis RS auf die Migration von B-Zellen.....	57
Abb. 28 – Hypothetisches Modell der adjuvanten Wirkung von 9-cis RS bei der spezifischen Immuntherapie.....	62

### 6.3. Materialien

Antikörper und sekundäre Reagenzien	Hersteller
7-AAD (1:150, 00-6993-50)	eBioScience, San Diego, USA
Anti-IgM / -IgG Fab2 (anti-BCR)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Human CD19-Beads (130-052-201)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Human CCR9-Alexa Fluor® 647 (8 µg/ml, Klon 2331, 557975)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Human CD3-PE (1:400, Klon OKT3)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Human CD14-FITC (3 µg/ml)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Human CD19-Cy5 (790 ng/ml, Klon BU12)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Human CD23-FITC (1:25, Klon 9P25, IM0529)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Anti-Human CD27-APC (1:25, Cat.: 130-093-18)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Human CD38-FITC (1:25, Klon HIT2, 555459)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Human CD54-PE (1:25, Klon HA58, 555511)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Human CD86-APC (1:25, Klon 2331, 555660)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Human IgA (480 ng/ml, 109-005-011)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Human IgA-AP (1:5000, 109-055-011)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Human IgD-PE (1:50, Klon 112509, 555779)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Human IgE (2,5 µg/ml, Klon HP6061, 9240-01)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-Human IgE-bio (500 ng/ml, Klon HP6029, 9250-08)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-Human IgG (360 ng/ml, 109-005-088)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Human IgG-AP (1:5000, 109-055-088)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Human IgM (360 ng/ml, 109-005-129)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Human IgM-AP (1:5000, 109-055-043)	Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA
Anti-Maus α4β7-bio (1:200, Klon DATK32)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Maus B220-Pacific Blue (1,83 µg/ml, RA3.6B2)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Maus CCR9-PE (0,312 µg/ml, FAB2160P)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Anti-Maus CD138-PE (400 ng/ml, 281-2)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus CD38-PE-Cy7 (333 ng/ml, Klon 90)	BioLegend, San Diego, USA
Anti-Maus FC Rezeptor (10,2 µg/ml, 2.4G2)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Maus IgA-bio (10 ng/ml, 1040-08)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-Maus IgE (R35-72, 553413)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus IgE-bio (248 ng/ml, Klon EM 95.3)	Metschnikoff Labor, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, Deutschland
Anti-Maus IgE-bio (1 µg/ml Klon EM 95.3)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Anti-Maus IgG1-APC (2 µg/ml, X56)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus IgG1-bio (500 ng/ml, A 85-1)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-OVA-FITC (848 ng/ml)	DRFZ, Berlin, Deutschland
CD40-Ligand (human, 626L, sc-81169)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
CFSE (Cat.: 21888)	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
CpG 2006 24 mer (Syn 0,20 µmol EtOH)	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
IL-4 (human, 130-093-922)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-6 ELISA Kit (human, Cat.: DY206)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
IL-10 (rekombinant, human, 11340103)	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL-10 ELISA Kit (human, Cat.: DY217B)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Maus IgE (500 ng/ml, 557079)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Maus OVA-IgG1 (1 µg/ml, OVA-14, IgG1, A6075)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Maus OVA-bio (0,625 µg/ml)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	DRFZ, Berlin, Deutschland
Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (SA-AP)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Streptavidin-PerCP (0.2 µg/ml, 554064)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
3,3,5,5-Tetramethylbenzidin (N2640-100TAB)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
9-cis Retinsäure	Basilea Pharmaceutica, Basel, Schweiz
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Alum Imject (Cat.: 77161)	Thermo Scientific
Diethanolamin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS), ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , steril	PAA, Pasching, Österreich
Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ficoll (LSM 1077)	PAA, Pasching, Österreich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth, Kalsruhe, Deutschland
Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
p-Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
p-Nitrophenylphosphat (N2640-100TAB)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penicillin	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI-1640, steril	Biochrom, Berlin, Deutschland
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween20	Bio-Rad, München, Deutschland
Tween80	Bio-Rad, München, Deutschland
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10x PBS-Puffer	80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + 2,4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (pH 7,4)
1x PBST-Waschpuffer	100 ml 10x PBS + 900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ + 500 µl Tween20
1x PBS-EDTA	10 ml 100mM EDTA in 500 ml 1x Dulbecco's PBS (steril)
0,5 % BSA in PBS (MACS Puffer)	2,5 g BSA in 500 ml 1x Dulbecco's PBS (steril)
1 % BSA in PBS (FACS Puffer)	0,5 g BSA in 50 ml 1x PBS
3 % BSA in PBS (ELISA Block)	1,5 g BSA in 50 ml 1x PBS
3 % Milchpulver in PBS (ELISA Block)	1,5 g Milchpulver in 50 ml 1x PBS
2 % p-Formaldehyd-Lösung	10 g p-Formaldehyd in 0,5 Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (60°C)
0,5 % Saponin-Lösung	2,5 g Saponin in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
ELISA Coating-Puffer (pH 9)	1,46 g $\text{NaHCO}_3$ + 4,5 g NaCl + 0,8 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in 0,5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
ELISA AP-Substrat-Puffer	48,5 ml Diethanolamin + 50 mg $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 0,5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (pH 9,9)
ELISA TMB-Substrat-Puffer	= 128,5 ml A + 121,5 ml B + 250 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ A = 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ B = 10,6 g Zitronensäure in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
ELISPOT Substrat-Puffer	7,5 ml Essigsäure (0.2 M) + 10,55 ml Natriumacetat Lösung in 15 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (pH 5)
Natrium-Karbonat-Puffer:	= 500 ml Lösung A + 50 ml Lösung B (pH 9) A = 4,2 g $\text{NaHCO}_3$ in 0,5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (pH 8,15) B = 5,3 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in 0,5 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (pH 11,27)
Lyse-Puffer	1x RBC-Lysis Buffer (eBioscience, 00-4333-57)
Zellkultur-Medium	RPMI 1640-Medium, steril, ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
ELISA 96-well Microtiterplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark
ELISPOT 96-well Microtiterplatten (Multiscreen HTS Cat. MSIPN4550)	Millipore, Billerica, USA
LS Columns (magnetische Filter)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nylonnetze (40 µm, Cat.: 352340)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Nylonnetze (100 µm, Cat.: 352360)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Falcons	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Pipetten & Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatten (48-well)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

<b>Geräte und Software</b>	<b>Hersteller</b>
CASY-Zellenzählsystem	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
CTL-ImmunoSpot S5 Core Analyzer (ELISPOT-Lesegerät)	CTL, Bonn, Deutschland
FlowJo Software	Tree Star, Ashland, USA
Graphpad Prism Software	GraphPad Software, La Jolla, USA
MACS Quant Reader (Durchflusszytometer)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
MRX - Elisareader (ELISA-Lesegerät)	Dynex Technologies, Chantilly, USA

## Literaturverzeichnis

1. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):685-98. PubMed PMID: 19172691. Pubmed Central PMCID: 2906676. Epub 2009/01/28. eng.
2. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006 Aug 26;368(9537):733-43. PubMed PMID: 16935684. Epub 2006/08/29. eng.
3. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*. 2004 Nov;24(5):758-64. PubMed PMID: 15516669. Epub 2004/11/02. eng.
4. ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998 Apr 25;351(9111):1225-32. PubMed PMID: 9643741. Epub 1998/06/27. eng.
5. Kleine-Tebbe J. Specific immunotherapy by different allergen applications: subcutaneous, sublingual, oral or rectal administration and lymph node injection. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut*. 2009;96:87-95; discussion PubMed PMID: 20799448.
6. Matricardi PM, Kuna P, Panetta V, Wahn U, Narkus A. Subcutaneous immunotherapy and pharmacotherapy in seasonal allergic rhinitis: a comparison based on meta-analyses. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Oct;128(4):791-9 e6. PubMed PMID: 21620452.
7. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 (1):CD001936. PubMed PMID: 17253469. Epub 2007/01/27. eng.
8. Passalacqua G, Durham SR. Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):881-91. PubMed PMID: 17418661. Epub 2007/04/10. eng.
9. Kleine-Tebbe. Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. *Allergo J*. 2006;15:56-74.
10. Durham SR, Walker SM, Varga EM, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med*. 1999 Aug 12;341(7):468-75. PubMed PMID: 10441602.
11. (DGE) DGfEeV. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Frankfurt: Neuer Umschau Buchverlag (ISBN 3-82957-114-3); 2008.
12. Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas*. Berlin: Springer Berlin; 1998.

13. Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ.* 2004 Dec;11 Suppl 2:S126-43. PubMed PMID: 15608692. Epub 2004/12/21. eng.
14. Petkovich M. Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:443-71. PubMed PMID: 1323983. Epub 1992/01/01. eng.
15. Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:201-21. PubMed PMID: 15189119. Epub 2004/06/11. eng.
16. Germain P, Chambon P, Eichele G, et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev.* 2006 Dec;58(4):760-72. PubMed PMID: 17132853. Epub 2006/11/30. eng.
17. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 2006 Jun;66(7):606-30. PubMed PMID: 16688755. Epub 2006/05/12. eng.
18. Mihaly J, Gamlieli A, Worm M, Ruhl R. Decreased retinoid concentration and retinoid signalling pathways in human atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2011 Apr;20(4):326-30. PubMed PMID: 21410762. Epub 2011/03/18. eng.
19. Kuwata T, Wang IM, Tamura T, et al. Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3349-56. PubMed PMID: 10828015. Epub 2000/05/29. eng.
20. Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:167-92. PubMed PMID: 11375434. Epub 2001/05/26. eng.
21. Miller SC, Kearney SL. Effect of in vivo administration of all trans-retinoic acid on the hemopoietic cell populations of the spleen and bone marrow: profound strain differences between A/J and C57BL/6J mice. *Lab Anim Sci.* 1998 Feb;48(1):74-80. PubMed PMID: 9517895. Epub 1998/03/28. eng.
22. Twining SS, Schulte DP, Wilson PM, Fish BL, Moulder JE. Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J Nutr.* 1997 Apr;127(4):558-65. PubMed PMID: 9109605. Epub 1997/04/01. eng.
23. Ahmad SM, Haskell MJ, Raqib R, Stephensen CB. Markers of innate immune function are associated with vitamin a stores in men. *J Nutr.* 2009 Feb;139(2):377-85. PubMed PMID: 19091796. Pubmed Central PMCID: 2646203. Epub 2008/12/19. eng.
24. Dennert G, Lotan R. Effects of retinoic acid on the immune system: stimulation of T killer cell induction. *Eur J Immunol.* 1978 Jan;8(1):23-9. PubMed PMID: 346357. Epub 1978/01/01. eng.
25. Ertesvag A, Engedal N, Naderi S, Blomhoff HK. Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5555-63. PubMed PMID: 12421932. Epub 2002/11/08. eng.

26. Carman JA, Smith SM, Hayes CE. Characterization of a helper T lymphocyte defect in vitamin A-deficient mice. *J Immunol.* 1989 Jan 15;142(2):388-93. PubMed PMID: 2463304. Epub 1989/01/15. eng.
27. Dawson HD, Collins G, Pyle R, et al. Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. *BMC Immunol.* 2006;7:27. PubMed PMID: 17118196. Pubmed Central PMCID: 1665462. Epub 2006/11/23. eng.
28. Iwata M, Eshima Y, Kagechika H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol.* 2003 Aug;15(8):1017-25. PubMed PMID: 12882839. Epub 2003/07/29. eng.
29. Lovett-Racke AE, Racke MK. Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol.* 2002 Jan;215(1):54-60. PubMed PMID: 12142036. Epub 2002/07/27. eng.
30. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1765-74. PubMed PMID: 17620363. Pubmed Central PMCID: 2118687. Epub 2007/07/11. eng.
31. Mucida D, Park Y, Kim G, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 2007 Jul 13;317(5835):256-60. PubMed PMID: 17569825. Epub 2007/06/16. eng.
32. Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1775-85. PubMed PMID: 17620362. Pubmed Central PMCID: 2118682. Epub 2007/07/11. eng.
33. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity.* 2004 Oct;21(4):527-38. PubMed PMID: 15485630. Epub 2004/10/16. eng.
34. Xiao S, Jin H, Korn T, et al. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol.* 2008 Aug 15;181(4):2277-84. PubMed PMID: 18684916. Pubmed Central PMCID: 2722959. Epub 2008/08/08. eng.
35. von Boehmer H. Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1737-9. PubMed PMID: 17620364. Pubmed Central PMCID: 2118658. Epub 2007/07/11. eng.
36. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):769-76. PubMed PMID: 18516037. Epub 2008/06/03. eng.
37. Hall JA, Cannons JL, Grainger JR, et al. Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. *Immunity.* 2011 Mar 25;34(3):435-47. PubMed PMID: 21419664. Pubmed Central PMCID: 3415227.

38. Geissmann F, Revy P, Brousse N, et al. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Aug 18;198(4):623-34. PubMed PMID: 12925678. Pubmed Central PMCID: 2194172. Epub 2003/08/20. eng.
39. Mohty M, Morbelli S, Isnardon D, et al. All-trans retinoic acid skews monocyte differentiation into interleukin-12-secreting dendritic-like cells. *Br J Haematol*. 2003 Sep;122(5):829-36. PubMed PMID: 12930397. Epub 2003/08/22. eng.
40. Jin CJ, Hong CY, Takei M, et al. All-trans retinoic acid inhibits the differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Leuk Res*. 2010 Apr;34(4):513-20. PubMed PMID: 19883939. Epub 2009/11/04. eng.
41. Ertesvag A, Naderi S, Blomhoff HK. Regulation of B cell proliferation and differentiation by retinoic acid. *Semin Immunol*. 2009 Feb;21(1):36-41. PubMed PMID: 18703353. Epub 2008/08/16. eng.
42. Sato A, Hashiguchi M, Toda E, Iwasaki A, Hachimura S, Kaminogawa S. CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3684-90. PubMed PMID: 14500666. Epub 2003/09/23. eng.
43. Mora JR, von Andrian UH. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Semin Immunol*. 2009 Feb;21(1):28-35. PubMed PMID: 18804386. Pubmed Central PMCID: 2663412. Epub 2008/09/23. eng.
44. Bjersing JL, Telemo E, Dahlgren U, Hanson LA. Loss of ileal IgA+ plasma cells and of CD4+ lymphocytes in ileal Peyer's patches of vitamin A deficient rats. *Clin Exp Immunol*. 2002 Dec;130(3):404-8. PubMed PMID: 12452829. Pubmed Central PMCID: 1906545. Epub 2002/11/28. eng.
45. Scheffel F, Heine G, Henz BM, Worm M. Retinoic acid inhibits CD40 plus IL-4 mediated IgE production through alterations of sCD23, sCD54 and IL-6 production. *Inflamm Res*. 2005 Mar;54(3):113-8. PubMed PMID: 15883744. Epub 2005/05/11. eng.
46. Blomhoff HK, Smeland EB, Erikstein B, et al. Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. *J Biol Chem*. 1992 Nov 25;267(33):23988-92. PubMed PMID: 1429735. Epub 1992/11/25. eng.
47. Worm M, Krah JM, Manz RA, Henz BM. Retinoic acid inhibits CD40 + interleukin-4-mediated IgE production in vitro. *Blood*. 1998 Sep 1;92(5):1713-20. PubMed PMID: 9716600. Epub 1998/08/26. eng.
48. Ross AC. Vitamin A supplementation and retinoic acid treatment in the regulation of antibody responses in vivo. *Vitam Horm*. 2007;75:197-222. PubMed PMID: 17368317. Epub 2007/03/21. eng.
49. Hoffman E, Mielicki WP. [All-trans retinoic acid (ATRA) in prevention and cancer therapy]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2010;64:284-90. PubMed PMID: 20558866. Epub 2010/06/19. Kwas całkowicie trans-retinowy (ATRA) w prewencji i terapii nowotworow. pol.

50. Thielitz A, Gollnick H. Topical retinoids in acne vulgaris: update on efficacy and safety. *Am J Clin Dermatol*. 2008;9(6):369-81. PubMed PMID: 18973403. Epub 2008/11/01. eng.
51. Ortonne JP. Oral isotretinoin treatment policy. Do we all agree? *Dermatology*. 1997;195 Suppl 1:34-7; discussion 8-40. PubMed PMID: 9310744. Epub 1997/01/01. eng.
52. Lee CS, Li K. A review of acitretin for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Saf*. 2009 Nov;8(6):769-79. PubMed PMID: 19998529. Epub 2009/12/10. eng.
53. Talpur R, Cox K, Duvic M. Efficacy and safety of topical tazarotene: a review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009 Feb;5(2):195-210. PubMed PMID: 20213916. Epub 2010/03/10. eng.
54. Paulden M, Rodgers M, Griffin S, et al. Alitretinoin for the treatment of severe chronic hand eczema. *Health Technol Assess*. 2010 May;14 Suppl 1:39-46. PubMed PMID: 20507802. Epub 2010/06/12. eng.
55. Gell PGH CR, eds. *Clinical Aspects of Immunology*. 1st ed. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.; 1963.
56. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 2):S547-58. PubMed PMID: 10669540. Epub 2000/02/11. eng.
57. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):721-32. PubMed PMID: 12949496. Epub 2003/09/02. eng.
58. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):761-71. PubMed PMID: 16998509. Epub 2006/09/26. eng.
59. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007 Dec;7(12):975-87. PubMed PMID: 18007680. Pubmed Central PMCID: 2258092.
60. Stingl G, Maurer D. IgE-mediated allergen presentation via Fc epsilon RI on antigen-presenting cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 May-Jul;113(1-3):24-9. PubMed PMID: 9130475. Epub 1997/05/01. eng.
61. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001 Jan 4;344(1):30-7. PubMed PMID: 11136958. Epub 2001/01/04. eng.
62. Trautmann A. *Allergiediagnose - Allergitherapie*. Würzburg: Georg Thieme Verlag; 2006.
63. Worm M, Hompes S. [The registry for severe allergic reactions in German-speaking countries. Recent data and perspectives]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2012 Mar;55(3):380-4. PubMed PMID: 22373852. Das deutschsprachige Anaphylaxie-Register. Aktueller Stand und Perspektiven.
64. Noon. Prophylactic inoculation of hay fever. *Lancet*. 1911;1:572-3.

65. Pfaar. Die spezifische Immuntherapie bei allergischer Rhinitis - Aktueller Stellenwert und innovative Entwicklungen. HNO. 2008;56:764–75.
66. Senti G, Graf N, Haug S, et al. Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Nov;124(5):997-1002. PubMed PMID: 19733905. Epub 2009/09/08. eng.
67. Senti G, Johansen P, Kundig TM. Intralymphatic immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009 Dec;9(6):537-43. PubMed PMID: 19680119. Epub 2009/08/15. eng.
68. Senti G, Cramer R, Kuster D, et al. Intralymphatic immunotherapy for cat allergy induces tolerance after only 3 injections. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1290-6. PubMed PMID: 22464647.
69. Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003 May;33(5):1205-14. PubMed PMID: 12731045. Epub 2003/05/06. eng.
70. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jan;127(1):18-27; quiz 8-9. PubMed PMID: 21211639. Epub 2011/01/08. eng.
71. Mendel I, Shevach EM. The IL-10-producing competence of Th2 cells generated in vitro is IL-4 dependent. *Eur J Immunol*. 2002 Nov;32(11):3216-24. PubMed PMID: 12555667. Epub 2003/01/31. eng.
72. Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Nov;116(5):961-8; quiz 9. PubMed PMID: 16275361. Epub 2005/11/09. eng.
73. Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1389-97. PubMed PMID: 15545986. Pubmed Central PMCID: 525754. Epub 2004/11/17. eng.
74. Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, et al. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 1997 Jan;27(1):68-74. PubMed PMID: 9117883. Epub 1997/01/01. eng.
75. Rak S, Lowhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 1988 Sep;82(3 Pt 1):470-80. PubMed PMID: 3170995. Epub 1988/09/01. eng.
76. Pesonen M, Kallio MJ, Siimes MA, Ranki A. Retinol concentrations after birth are inversely associated with atopic manifestations in children and young adults. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jan;37(1):54-61. PubMed PMID: 17210042. Epub 2007/01/11. eng.
77. Mizuno Y, Furusho T, Yoshida A, Nakamura H, Matsuura T, Eto Y. Serum vitamin A concentrations in asthmatic children in Japan. *Pediatr Int*. 2006 Jun;48(3):261-4. PubMed PMID: 16732791. Epub 2006/05/31. eng.

78. Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol.* 2008 Apr 15;180(8):5211-21. PubMed PMID: 18390702. Epub 2008/04/09. eng.
79. Reichling. *Heilpflanzenkunde für die Veterinärpraxis.* Springer; 2008. p. 24-5.
80. McHeyzer-Williams LJ, Cool M, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment. *J Exp Med.* 2000 Apr 3;191(7):1149-66. PubMed PMID: 10748233. Pubmed Central PMCID: 2193163. Epub 2000/04/05. eng.
81. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):741-50. PubMed PMID: 16977339. Epub 2006/09/16. eng.
82. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol.* 2006 Apr;36(4):810-6. PubMed PMID: 16541472.
83. Rousset F, Garcia E, Defrance T, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1890-3. PubMed PMID: 1371884. Pubmed Central PMCID: 48559. Epub 1992/03/01. eng.
84. Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol.* 2003 Jun;33(6):1576-85. PubMed PMID: 12778475.
85. Fahlman C, Jacobsen SE, Smeland EB, et al. All-trans- and 9-cis-retinoic acid inhibit growth of normal human and murine B cell precursors. *J Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):58-65. PubMed PMID: 7602122. Epub 1995/07/01. eng.
86. Shepherd DM, Stepan LB, Hedstrom OR, Kerkvliet NI. Anti-CD40 Treatment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-exposed C57Bl/6 mice induces activation of antigen presenting cells yet fails to overcome TCDD-induced suppression of allograft immunity. *Toxicology and applied pharmacology.* 2001 Jan 1;170(1):10-22. PubMed PMID: 11141351.
87. Morikawa K, Nonaka M. All-trans-retinoic acid accelerates the differentiation of human B lymphocytes maturing into plasma cells. *Int Immunopharmacol.* 2005 Dec;5(13-14):1830-8. PubMed PMID: 16275619. Epub 2005/11/09. eng.
88. Ertesvag A, Aasheim HC, Naderi S, Blomhoff HK. Vitamin A potentiates CpG-mediated memory B-cell proliferation and differentiation: involvement of early activation of p38MAPK. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3865-72. PubMed PMID: 17209053. Epub 2007/01/09. eng.
89. Buck J, Ritter G, Dannecker L, et al. Retinol is essential for growth of activated human B cells. *J Exp Med.* 1990 May 1;171(5):1613-24. PubMed PMID: 2332732. Pubmed Central PMCID: 2187880. Epub 1990/05/01. eng.

90. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008 Jan;1(1):11-22. PubMed PMID: 19079156. Epub 2008/12/17. eng.
91. Yoshida T, Mei H, Dorner T, et al. Memory B and memory plasma cells. *Immunol Rev.* 2010 Sep;237(1):117-39. PubMed PMID: 20727033. Epub 2010/08/24. eng.
92. Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity.* 2011 Jul 22;35(1):13-22. PubMed PMID: 21777796. Pubmed Central PMCID: 3418663.
93. 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.* 1999 Feb 25;192(1):41-7. PubMed PMID: 10066345.
94. Manicassamy S, Pulendran B. Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol.* 2009 Feb;21(1):22-7. PubMed PMID: 18778953. Pubmed Central PMCID: 2642591. Epub 2008/09/10. eng.
95. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med.* 2008 Sep 1;205(9):2139-49. PubMed PMID: 18710932. Pubmed Central PMCID: 2526207. Epub 2008/08/20. eng.
96. Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity.* 2008 Jun;28(6):740-50. PubMed PMID: 18549797. Epub 2008/06/14. eng.
97. Fayette J, Dubois B, Vandenabeele S, et al. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med.* 1997 Jun 2;185(11):1909-18. PubMed PMID: 9166420. Pubmed Central PMCID: 2196343. Epub 1997/06/02. eng.
98. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):421-34. PubMed PMID: 18483500. Pubmed Central PMCID: 3062538. Epub 2008/05/17. eng.
99. Iwata M. Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin Immunol.* 2009 Feb;21(1):8-13. PubMed PMID: 18849172. Epub 2008/10/14. eng.
100. Mora JR, Iwata M, Eksteen B, et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science.* 2006 Nov 17;314(5802):1157-60. PubMed PMID: 17110582. Epub 2006/11/18. eng.
101. Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med.* 2008 Oct 27;205(11):2483-90. PubMed PMID: 18852290. Pubmed Central PMCID: 2571923. Epub 2008/10/15. eng.
102. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol.* 2003 Oct;3(10):822-9. PubMed PMID: 14523388. Epub 2003/10/03. eng.

103. Muller G, Lipp M. Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation*. 2003 Jun;10(3-4):325-34. PubMed PMID: 12851649. Epub 2003/07/10. eng.
104. Villablanca EJ, Zhou D, Valentinis B, et al. Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 2008 Sep;84(3):871-9. PubMed PMID: 18515328. Epub 2008/06/03. eng.
105. Hammerschmidt SI, Friedrichsen M, Boelter J, et al. Retinoic acid induces homing of protective T and B cells to the gut after subcutaneous immunization in mice. *J Clin Invest*. 2011 Aug;121(8):3051-61. PubMed PMID: 21737878. Pubmed Central PMCID: 3223921.
106. Mora JR. Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflammatory bowel diseases*. 2008 Feb;14(2):275-89. PubMed PMID: 17924560.
107. Hussain R, Dawood G, Abrar N, et al. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Nov;2(6):726-32. PubMed PMID: 8574838. Pubmed Central PMCID: 170229. Epub 1995/11/01. eng.
108. Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med*. 1991 Jan 1;173(1):159-66. PubMed PMID: 1824635. Pubmed Central PMCID: 2118762.
109. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KH. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J Immunol*. 2009 Aug 1;183(3):1577-86. PubMed PMID: 19587018.
110. Sturchler D, Hanck A, Weiser H, Manz U, Weiss N. Retinol deficiency and *Dipetalonema viteae* infection in the hamster. *Journal of helminthology*. 1985 Sep;59(3):201-10. PubMed PMID: 4067243.
111. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2199-202. PubMed PMID: 12481138.
112. Buck J, Myc A, Garbe A, Cathomas G. Differences in the action and metabolism between retinol and retinoic acid in B lymphocytes. *J Cell Biol*. 1991 Nov;115(3):851-9. PubMed PMID: 1655814. Pubmed Central PMCID: 2289173. Epub 1991/11/01. eng.
113. Szabova L, Macejova D, Dvorcakova M, et al. Expression of nuclear retinoic acid receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects. *Life Sci*. 2003 Jan 3;72(7):831-6. PubMed PMID: 12479981. Epub 2002/12/14. eng.
114. Drach J, McQueen T, Engel H, et al. Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor-alpha. *Cancer Res*. 1994 Apr 1;54(7):1746-52. PubMed PMID: 7511050. Epub 1994/04/01. eng.

115. Kishimoto H, Hoshino S, Ohori M, et al. Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19;273(25):15429-34. PubMed PMID: 9624127. Epub 1998/06/23. eng.
116. Oberg F, Botling J, Nilsson K. Functional antagonism between vitamin D3 and retinoic acid in the regulation of CD14 and CD23 expression during monocytic differentiation of U-937 cells. *J Immunol*. 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3487-95. PubMed PMID: 7682243. Epub 1993/04/15. eng.
117. Austenaa LM, Carlsen H, Hollung K, Blomhoff HK, Blomhoff R. Retinoic acid dampens LPS-induced NF-kappaB activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF-kappaB reporter mice. *J Nutr Biochem*. 2009 Sep;20(9):726-34. PubMed PMID: 18926686.
118. Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, Leung DY. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Jan;101(1 Pt 1):96-102. PubMed PMID: 9449507. Epub 1998/02/04. eng.
119. Lu P, Wang YL, Linsley PS. Regulation of self-tolerance by CD80/CD86 interactions. *Curr Opin Immunol*. 1997 Dec;9(6):858-62. PubMed PMID: 9492990. Epub 1998/03/11. eng.
120. Pereira C, Tavares B, Loureiro G, et al. Dynamics of CD86 expression on allergic inflammation--new insights. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009;3(2):128-31. PubMed PMID: 19519589. Epub 2009/06/13. eng.
121. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989 Jul;74(1):1-10. PubMed PMID: 2473791. Epub 1989/07/01. eng.
122. Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4699-706. PubMed PMID: 20351305. Epub 2010/03/31. eng.
123. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Aug-Oct;13(4-5):357-68. PubMed PMID: 12220549. Epub 2002/09/11. eng.
124. Vercelli D, Jabara HH, Arai K, Yokota T, Geha RS. Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. *Eur J Immunol*. 1989 Aug;19(8):1419-24. PubMed PMID: 2789139. Epub 1989/08/01. eng.
125. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med*. 1992 Mar 1;175(3):671-82. PubMed PMID: 1371300. Pubmed Central PMCID: 2119142. Epub 1992/03/01. eng.
126. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol*. 1992 Jul;12(4):239-47. PubMed PMID: 1512298. Epub 1992/07/01. eng.

127. Naderi S, Blomhoff HK. Retinoic acid prevents phosphorylation of pRB in normal human B lymphocytes: regulation of cyclin E, cyclin A, and p21(Cip1). *Blood*. 1999 Aug 15;94(4):1348-58. PubMed PMID: 10438723. Epub 1999/08/10. eng.
128. Chen Q, Ross AC. Retinoic acid promotes mouse splenic B cell surface IgG expression and maturation stimulated by CD40 and IL-4. *Cell Immunol*. 2007 Sep;249(1):37-45. PubMed PMID: 18082674. Pubmed Central PMCID: 2262177. Epub 2007/12/18. eng.
129. Amlot PL, Grennan D, Humphrey JH. Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens. *Eur J Immunol*. 1985 May;15(5):508-12. PubMed PMID: 2581791. Epub 1985/05/01. eng.
130. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009 Oct 31;374(9700):1543-56. PubMed PMID: 19880020. Epub 2009/11/03. eng.
131. Shatz DV. Vaccination considerations in the asplenic patient. Expert review of vaccines. 2005 Feb;4(1):27-34. PubMed PMID: 15757471. Epub 2005/03/11. eng.
132. Goldblatt D, Borrow R, Miller E. Natural and vaccine-induced immunity and immunologic memory to *Neisseria meningitidis* serogroup C in young adults. *The Journal of infectious diseases*. 2002 Feb 1;185(3):397-400. PubMed PMID: 11807724. Epub 2002/01/25. eng.
133. Kjeldsen MK, Perez-Andres M, Schmitz A, et al. Multiparametric flow cytometry for identification and fluorescence activated cell sorting of five distinct B-cell subpopulations in normal tonsil tissue. *American journal of clinical pathology*. 2011 Dec;136(6):960-9. PubMed PMID: 22095383.

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Tim Hollstein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema »Untersuchung der Wirkung von 9-cis Retinsäure in der Allergietherapie« selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe »Uniform Requirements for Manuscripts (URM)« des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Curriculum vitae**

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

**Publikationsliste**

Guido Heine, Tim Hollstein, Andreas Radbruch\*, Margitta Worm. 9-cis retinoic acid modulates the differentiation of activated human B cells depending on the instructing signals. 2013. Deutsche Gesellschaft für Immunologie. 11th B Cell Forum, Schluchsee, Germany

## **Danksagung**

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. In erster Linie möchte ich Frau Prof. Dr. Margitta Worm und Dr. med. Guido Heine für die exzellente Betreuung in allen Phasen dieser Doktorarbeit danken. Beide waren für mich immer erreichbar und haben sich viel Zeit genommen, um Experimente zu planen und Ergebnisse zu diskutieren. Ich fühlte mich stets in guten Händen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Worm, insbesondere Kerstin Hilt, Maria Nassiri, Gennadiy Drozdenko, Juliane Lindner, Kiran Kumar und Vandana Kumari. Die Arbeit im Labor hat sehr viel Spaß gemacht, und bei Problemen konnte ich mich jederzeit an meine Kollegen wenden. Ich danke zudem Björn Hartmann für die geleistete Vorarbeit, die Einarbeitung in das Projekt und die sehr unterhaltsamen Gespräche. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Dennis Ernst bedanken, der mir mit seinem Wissen und seiner Tatkraft stets zur Seite gestanden hat.

Der Austausch mit anderen Forschergruppen aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) hat mich sehr inspiriert und motiviert. Hier möchte ich Prof. Andreas Radbruch, Dr. Hyung-Dong Chang und im Besonderen René Riedel danken. Erst durch seine Hilfe konnten wichtige Teile der Experimente etabliert werden. Ebenso bedanke ich mich für das Stipendium des DRFZ für die Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Ohne die Unterstützung meiner Familie, insbesondere meiner Eltern, meiner Großeltern und meines Bruders, wäre ich nicht da, wo ich jetzt stehe. Daher gilt ihnen mein tiefster Dank für die vielen gemeinsamen Jahre voller Höhen und Tiefen.