

# **Expression und Funktion des Arylhydrocarbon Rezeptor Repressors (AhRR) im darmassoziierten Immunsystem**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Olga Joanna Brandstätter**

aus

Świecie (Polen)

Bonn, Juni 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Irmgard Förster
2. Gutachter: Prof. Dr. Sven Burgdorf

Tag der Promotion: 08.12.2015

Erscheinungsjahr: 2016

*Für Daniel, Bela und Milo*

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Einleitung .....	6
2.1	Das Immunsystem.....	6
2.1.1	Das angeborene Immunsystem .....	6
2.1.2	Das adaptive Immunsystem .....	8
2.2	Aufbau des darmassoziierten Immunsystems .....	9
2.2.1	Mesenteriale Lymphknoten .....	10
2.2.2	Peyersche Plaques.....	11
2.2.3	Cryptopatches und isolierte lymphatische Follikel .....	12
2.2.4	Lamina propria .....	14
2.2.5	Immunzellen im GALT .....	14
2.3	Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) .....	21
2.3.1	Allgemeines.....	21
2.3.2	AhR-Signaltransduktion .....	21
2.3.3	Der Arylhydrocarbon Rezeptor Repressor (AhRR).....	23
2.3.4	AhR-Liganden .....	23
2.3.5	Die Rolle des AhR in Immunsystem .....	24
2.4	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) .....	27
2.4.1	Epidemiologie und Ätiologie von CED .....	27
2.4.2	DSS-Colitis .....	29
2.5	Zielsetzung der Arbeit .....	31
3	Material und Methoden .....	32

3.1	Material .....	32
3.1.1	Geräte .....	32
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	33
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	34
3.1.4	Puffer und Lösungen .....	36
3.1.5	Antikörper für Durchflusszytometrie .....	37
3.1.6	Primärantikörper für Histologie .....	38
3.1.7	Sekundärantikörper für Histologie .....	38
3.1.8	Medium .....	38
3.1.9	Zellkulturstimuli .....	39
3.1.10	Kits .....	39
3.1.11	Primersequenzen für RT-PCR .....	39
3.1.12	Enzyme .....	40
3.1.13	Computerprogramme .....	40
3.2	Methoden .....	41
3.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	41
3.2.2	Verabreichung der AhR-Liganden .....	41
3.2.3	DSS-induzierte Colitis .....	42
3.2.4	Gewinnung und Aufbereitung des Gewebematerials .....	44
3.2.5	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Vital-Färbung .....	46
3.2.6	Durchflusszytometrie .....	46
3.2.7	Kultivierung von Zellen .....	48
3.2.8	ELISA ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ) .....	49
3.2.9	Sequenzierungsanalysen von intestinalen Mikrobiota .....	50
3.2.10	RT-PCR .....	52

3.2.11	Histologie .....	56
3.2.12	Statistik .....	58
4	Ergebnisse .....	59
4.1	Expressionsanalyse des endogenen und des transgenen AhRR locus.....	59
4.2	Abhängigkeit der konstitutiven AhRR-Expression von der Anwesenheit des AhR ..	60
4.3	Einfluss von AhR-Liganden auf die AhRR-Expression im intestinalen Immunsystem	65
4.3.1	Behandlung von AhRR Mäusen mit AhR-Liganden.....	65
4.3.2	Behandlung der AhRR Mäuse mit AhR-Liganden reduziertem Futter.....	67
4.4	Rolle des AhRR bei der DSS-induzierten Colitis.....	70
4.4.1	Etablierung des DSS-induzierten Colitis Modells.....	70
4.4.2	Untersuchung der Funktion des AhRR bei DSS-induzierter Colitis.....	72
4.5	Untersuchung der Rolle des AhRR bei der Aufrechterhaltung der Epithelbarriere	79
	des Colons .....	79
4.5.1	Analyse der zellulären Permeabilitätsbarriere .....	79
4.5.2	Untersuchung des extrinsischen Anteils der Permeabilitätsbarriere.....	82
4.5.3	Analyse der Zellpopulationen des intestinalen Immunsystems in naiven und DSS-	87
	behandelten AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen.....	87
4.5.4	Cryptopatches und ILF.....	101
4.5.5	Sequenzierungsanalyse des intestinalen Mikrobioms.....	102
5	Diskussion.....	106
5.1	AhRR-Expression in verschiedenen Organen und ihre Abhängigkeit von der	107
	Anwesenheit des AhR .....	107
5.1.1	Kanonische und nicht-kanonische Signalwege zur Aktivierung des AhRR.....	109
5.2	Regulation der AhRR-Expression durch AhR-Liganden.....	111
5.2.1	Wirkung von Curcumin und Quercetin auf die AhRR-Expression.....	111

5.2.2	Nahrungsbestandteile als Hauptaktivator der AhRR-Expression .....	112
5.3	Rolle des AhRR im darmassoziierten Immunsystem .....	113
5.3.1	Überempfindlichkeit der AhRR <sup>E/E</sup> -Mäuse auf DSS-induzierte Colitis.....	113
5.3.2	Einfluss des AhRR auf die Aufrechterhaltung der Epithelbarriere .....	114
5.3.3	Die Rolle des AhR im aktuellen Modell für intestinale Homöostase.....	117
5.3.4	Analyse der AhRR-Expression in T-Zellen und myeloiden Zellen in Zusammenhang mit Colitis.....	121
5.3.5	Untersuchungen der Mikrobiota des Darms.....	122
6	Literaturverzeichnis.....	124
	Abbildungverzeichnis.....	145
	Tabellenverzeichnis.....	147
	Abkürzungsverzeichnis.....	148
	Danksagung.....	151

## Zusammenfassung

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) ist ein ligandeninduzierter Transkriptionsfaktor, der als Rezeptor für Dioxin beschrieben wurde, aber auch endogene Liganden, sowie Pflanzeninhaltsstoffe aus der Nahrung binden kann. Es ist klar belegt, dass der AhR für die Expression fremdstoff-metabolisierender Enzyme und damit den Abbau niedermolekularer chemischer Substanzen verantwortlich ist. Darüber hinaus spielt der AhR eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems. In einem negativen Rückkopplungsmechanismus induziert er die Expression des AhR-Repressors (AhRR), welcher wiederum den AhR kompetitiv reprimiert. Das Expressionsmuster und die Funktion des AhRR im darmassoziierten Immunsystem sind bisher nur unzureichend untersucht. In der hier vorgelegten Dissertation wurden vor allem die in unserer Arbeitsgruppe generierten AhRR/EGFP-Mäuse, die grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein* - EGFP) unter der Kontrolle des *ahrr*-Lokus ausprägen, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Dünndarm und Colon die AhRR-Expression von der Expression des AhR vollkommen abhängig ist, während der AhR die Ausprägung des AhRR in Peyerschen Plaques (PP), mesenterialen Lymphknoten (mLK) und Haut nur partiell steuert. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Nahrungsbestandteile die Expression des AhRR vor allem in *innate lymphoid cells* (ILC) und intraepithelialen Lymphozyten (IEL) stark beeinflussen.

In einem chemisch-induzierten Colitis Modell für entzündliche Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass AhRR-defiziente- genauso wie AhR-defiziente Mäuse überempfindlich auf DSS (Dextran-Natrium-Sulfat) -Behandlung reagieren. Experimente zur Permeabilität des Colons ergaben, dass AhRR und AhR keinen messbaren Einfluss auf die Durchlässigkeit der Darmbarriere haben. Interessanterweise wiesen unbehandelte AhRR-defiziente Mäuse signifikant reduzierte IgA Titer im Stuhl auf, während im Blut der IgA Spiegel im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen deutlich erhöht war. Dies kann möglicherweise auf eine beeinträchtigte Wanderung von IgA produzierenden B1-Zellen aus der Bauchhöhle in die Lamina propria (LP) in Abwesenheit des AhRR hindeuten. Weiterhin wurden sowohl in AhRR-defizienten als auch in AhR-defizienten Mäusen reduzierte Anteile an IEL festgestellt, was zur Pathogenese der Colitis beitragen könnte. Die Sequenzierungsanalysen der bakteriellen DNA deuteten außerdem auf eine aberrante Diversität der Mikrobiota im Dünndarm und Colon der AhR-defizienten Mäusen aber nicht in AhRR-defizienten Mäusen hin.

Im Zuge dieser Studie wurden klare Hinweise auf eine wichtige Funktion des AhRR im mukosalen Immunsystem gefunden, die die Bedeutung des Zusammenspiels von AhR und AhRR bei der Immunregulation hervorheben.



## Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Da alle Organismen von Pathogenen angegriffen werden können und selbst Bakterien sich gegen Parasiten und Bakteriophagen wehren müssen, haben sich in der Evolution verschiedenartigste Schutzmechanismen entwickelt. Bereits die wirbellosen Tiere verfügen über ein sogenanntes angeborenes Immunsystem. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr gegen konservierte Strukturen von Mikroorganismen. Sie kann jedoch die Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion entwickeln. Das Immunsystem der Wirbeltiere vermittelt sowohl eine angeborene als auch erworbene Immunität. Es ist hochkomplex und besteht aus vielen verschiedenen Zellen, Organen und Mechanismen, die im Kampf gegen pathogene Bakterien, Viren, Pilze als auch gegen Schadstoffe aufeinander abgestimmt funktionieren. Die Blutbahnen, Lymphgefäße, Gewebe und Organe agieren als ein dynamisches Netzwerk, in dem sich die Immunzellen als eine Art Wächter bewegen und vor unerwünschten Eindringlingen schützen. Das adaptive Immunsystem der Wirbeltiere entwickelt zusätzlich ein Gedächtnis für eine schnellere Abwehr bei sekundären Infektionen mit dem gleichen Erreger. Wesentliche Unterschiede beider Formen der Abwehr, der angeborenen und der adaptiven Immunität liegen in den Rezeptoren und auch den Mechanismen der Pathogenerkennung. Die angeborene Immunität wird insbesondere durch antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (DC) repräsentiert. Das adaptive Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, den B- und T-Lymphozyten.

#### 2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus vielen verschiedenen Komponenten, die die primäre Immunabwehr gewährleisten. Die erste umfasst die Barrierefunktionen der Körperepithelien, die das Eindringen eines Krankheitserregers in den Organismus und die Etablierung einer Infektion verhindern sollen. Wenn der Erreger jedoch die Epithelbarriere überwunden hat, werden als nächstes Zellen und Moleküle aktiviert, die das Pathogen erkennen und zerstören. Zu den humoralen Bestandteilen der angeborenen Immunabwehr zählen antimikrobielle Peptide, die sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen vorkommen, und vermutlich die älteste Form der Immunität repräsentieren. Es wird angenommen, dass beispielsweise die Defensine Membranen von Bakterien und Pilzen, sowie

die Hüllen mancher Viren zerstören können (1). Ein weiterer bedeutender humoraler Abwehrmechanismus ist das Komplementsystem. Die Plasmaproteine des Komplementsystems befinden sich in Gewebewischenräumen, sowie im Blut, und können direkt durch Krankheitserreger oder indirekt durch die an Pathogene gebundenen Antikörper aktiviert werden. Dies führt zu einer Kaskade der proteolytischen Aktivierung von verschiedenen Proteinen. Das Komplementsystem spielt eine Rolle bei der direkten Zerstörung von Zellen und Erregern, aber auch bei der Opsonisierung von Pathogenen als Voraussetzung für deren Phagozytose. Einige Faktoren des Komplementsystems wirken auch chemotaktisch.

Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören vorwiegend Zellen myeloiden Ursprungs wie Makrophagen und DC, oder auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile, Basophile und Eosinophile. Wenn es einem Pathogen gelingt, die Epithelbarriere des Körpers zu durchzudringen, wird es durch gewebeständige Makrophagen oder DC sofort erkannt. Makrophagen reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten heran, die während einer Infektion den Blutkreislauf verlassen und sich in verschiedenen Geweben ansiedeln. Die Neutrophilen, die ebenso zur Familie der Phagozyten gehören, sind kurzlebig und kommen im Blut und betroffenen Gewebe während einer Infektion in großer Zahl vor, sind aber im gesunden Gewebe kaum vorhanden.

Die von Makrophagen nach Antigenaufnahme gebildeten  $O_2$ -Radikale, Stickstoffmonoxid (NO), Stickstoffoxide (NOx), proteolytische Enzyme sowie zytotoxische Moleküle, unterstützen die Eliminierung von Pathogenen. Außerdem regulieren Makrophagen die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen und Chemokinen, die zusammen weitere Phagozyten, vor allem Neutrophile, zum Infektionsherd leiten.

DC und Makrophagen besitzen die wichtige Fähigkeit, zwischen körpereigenen und körperfremden Molekülen unterscheiden zu können. Sie exprimieren unterschiedlichste Mustererkennungs-Rezeptoren (PRR - *pattern recognition receptors*), die eine Vielzahl von konservierten Strukturen erkennen, die mit Pathogenen (PAMP - *pathogen-associated molecular pattern*) und vermutlich auch wirtsspezifischen Gefahrensignalen (DAMP - *Danger-associated molecular pattern molecules*) assoziiert sind. *Toll-like* Rezeptoren (TLR) sind die bislang am besten charakterisierten PRR. Sie stehen an der Spitze von Signalwegen, die zur Transkription von Genen für antimikrobielle Peptide, Zytokine und Chemokine und zu weiteren Abwehrmechanismen führen. Beispiele für solche pathogenassoziierten Mustern sind Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, Mannane, Glykane, aber auch Nukleinsäure, wie etwa bakterielle DNA oder doppelsträngige RNA. Diese verschiedenen molekularen Strukturen werden vom Erreger und nicht vom Wirt selbst gebildet, sie kommen in einer Vielzahl von Pathogenen vor und sind meist essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des

Mikroorganismus. Neben der Erkennung von PAMP haben DC und Makrophagen die wichtige Aufgabe, durch ihre antigenpräsentierende Funktion die adaptive Immunantwort durch Lymphozyten zu induzieren.

### 2.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Antwort bedarf immer einer Anlaufphase, die mehrere Tage dauern kann und erst einmal von der angeborenen Immunantwort eingeleitet werden muss. Als Schaltstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem fungieren die DC, die die Fähigkeit haben, eine hoch effiziente Phagozytose und Antigenpräsentation zu verbinden. Unreife DC liegen in fast allen peripheren Geweben des Körpers in einem dichten Netzwerk vor und kontrollieren ihre Umgebung. Nach der Erkennung von PAMPs, nehmen DC die Antigene auf und reifen aus. Danach wandern DC aus dem Gewebe in die drainierenden Lymphknoten (LK), um dort mit T-Zellen zu interagieren. Durch diese Interaktionen wird die adaptive Immunantwort induziert. T-Zellen benötigen dafür zwei Signale: Erstens müssen sie mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) ein spezifisches Antigen auf der DC im Kontext mit MHC (*Major Histocompatibility Complex*)- Molekülen erkennen. Das Sekundärsignal wird über kostimulatorische Moleküle auf der APC vermittelt, z.B. CD80/CD86, die mit CD28 interagieren, was letztlich die T-Zellen zur klonalen Proliferation anregt. MHC-Moleküle der Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren Peptide von Virenbestandteilen, malignen Zellen, oder bestimmten Bakterien und Parasiten, die im Zytoplasma prozessiert werden. Nach dem Transport an die Zelloberfläche wird der Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Die Expression von MHC Klasse II (MHCII) Molekülen, die mit Peptiden aus phagozytierten extrazellulären und membranständigen Proteinen beladen sind, ist auf APC beschränkt. Durch die Antigenpräsentation auf MHCII Molekülen wird die Differenzierung von T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) favorisiert. Eine naive T<sub>H</sub>-Zelle kann beispielweise zu einer T<sub>H</sub>1-Zelle differenzieren und durch Sezernieren von z.B. IL-2 und Interferon (IFN)- $\gamma$  die zellvermittelte Immunantwort begünstigen. Sollte sich die T-Zelle zu einer T<sub>H</sub>2-Zelle spezialisieren, so sezerniert sie vor allem IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und unterstützt durch dieses Zytokinprofil die humorale adaptive Immunantwort. Ein weiterer Typ der T<sub>H</sub>-Zellen, die T<sub>H</sub>17-Zellen, produzieren IL-17 sowie IL-23 und spielen eine bedeutende Rolle bei der Generierung und Mobilisierung von Neutrophilen als auch bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien (2).

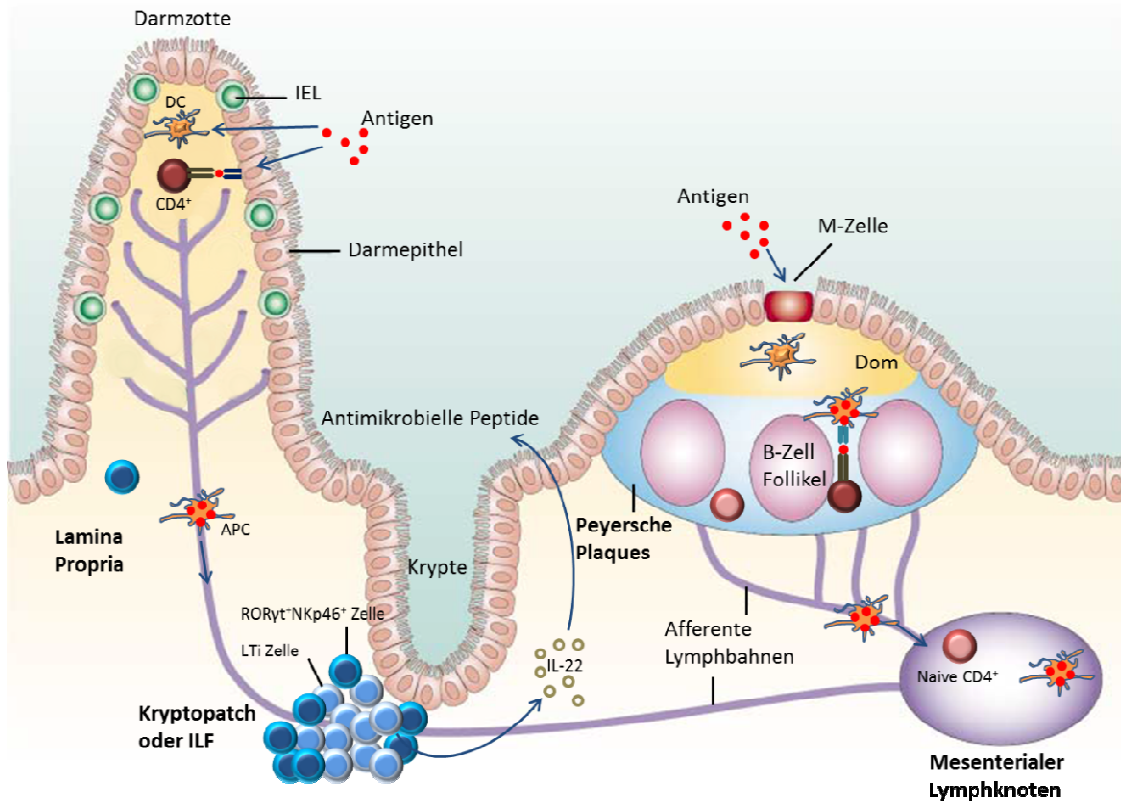
Die T<sub>H</sub>-Zellen induzieren außerdem durch Interaktion mit B-Zellen eine Phase starker B-Zell-Proliferation und steuern so die Differenzierung der sich klonal vermehrenden naiven B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. Durch somatische Rekombination

Ist es T- als auch B-Lymphozyten erlaubt, ein fast unbegrenztes Repertoire von TCR oder B-Zell-Rezeptoren (BCR) mit verschiedenen Spezifitäten zu produzieren. Nachdem die adaptive Immunantwort beendet ist, werden nicht alle stimulierten Lymphozyten aus dem Körper eliminiert. Ein kleiner Teil der spezifischen T- und B-Zellen bleibt erhalten und kann bei einem Zweitkontakt mit dem gleichen Erreger schneller und effizienter reagieren als bei der Erstreaktion. Dies wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet.

## 2.2 Aufbau des darmassoziierten Immunsystems

Die Darmschleimhaut der Menschen repräsentiert mit ca. 200 m<sup>2</sup> Oberfläche die größte Grenzfläche zwischen Körper und Umwelt und ist einer Vielzahl von Antigenen ausgesetzt, die für den Organismus gesundheitsschädigend sein können. Physiologisch betrachtet erfüllt der Darm zwei wichtige Aufgaben, die jedoch separat ablaufen. Auf der einen Seite ist der Darm als Teil des Verdauungstraktes für den Verdau und Aufnahme von Nahrungsbestandteilen zuständig, auf der anderen Seite muss der Darm sehr sensibel gegenüber körperfremden Antigenen und potentiellen Pathogenen reagieren. Darüber hinaus lebt eine Vielzahl verschiedener Bakterienarten im Darm unter symbiotischen Bedingungen mit dem Wirt.

Um dieses Gleichgewicht zu gewährleisten, wurde das darmassoziierte lymphatische Gewebe – auch als GALT (*gut associated lymphoid tissue*) bezeichnet mit etwa 50 Prozent aller Lymphozyten des gesamten Organismus ausgestattet. Das GALT setzt sich aus organisierten, aggregierten lymphatischen Geweben wie den mesenterialen Lymphknoten (mLK), Peyerschen Plaques (PP) und den isolierten Lymphfollikeln (ILF), sowie aus einzelnen lymphatischen Zellen in Effektororten zusammen (Abb. 1). Neben intraepithelialen Lymphozyten (IEL) befinden sich in der Lamina propria T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, DC, *innate lymphoid cells* (ILC) sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten (3).



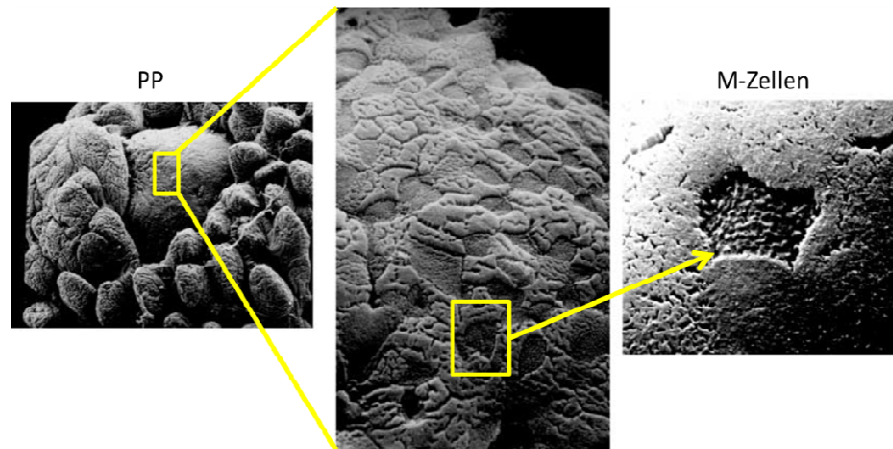
**Abb. 1: Schematische Darstellung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes.** Die Peyerschen Plaques und mesenterialen Lymphknoten sind an der Induktion von Immunantworten und Toleranz beteiligt, während die Effektorzellen in der Lamina propria und im Epithelium des Darms verstreut vorliegen. IEL, intraepitheliale Lymphozyten; DC, dendritische Zelle; APC, antigenpräsentierende Zelle; LTi, *lymphoid tissue inducer*; ILF, isolierte lymphatische Follikel. Modifiziert nach Mowat, 2003 (4).

### 2.2.1 Mesenteriale Lymphknoten

Die mLK, die sich im Abdomen befinden, zählen zu den größten Lymphknoten des Körpers und entwickeln sich in der Maus bereits zwischen Tag 10.5 und 15.5 der Embryogenese. Während der Differenzierung der mLK werden im Gegensatz zu peripheren LK oder PP Faktoren, wie Zytokine der TNF (Tumornekrosefaktor)-Familie benötigt (5, 6). Die mLK sind den anderen Lymphknoten morphologisch sehr ähnlich und setzen sich aus einem äußeren Cortex mit B-Lymphozyten, die in lymphatischen Follikeln organisiert sind, und einer inneren Medulla zusammen. Die Medulla besteht aus strangförmig angeordneten Makrophagen und antikörpersezernierenden Plasmazellen. Antigenbeladene DC aus der LP und den PP können direkt über die afferente Lymphe in die mLK gelangen. T-Zellen treten aus den Blutgefäßen über spezialisierte Endothelzellen in die mLK ein.

### 2.2.2 Peyersche Plaques

Die PP wurden erstmals 1677 von dem Anatomen Conrad Peyer beschrieben und nach ihm benannt. Diese hochorganisierten lymphatischen Follikel sind auf der antimesenterialen Seite des gesamten Dünndarms verteilt und makroskopisch sehr gut zu erkennen. Die PP liegen direkt unter dem Darmepithel, hier Follikel-assoziiertes Epithel (FAE) genannt, und wölben dieses kuppelartig in das Darmlumen vor (Abb. 2). Nach eigenen Beobachtungen gibt es in C57Bl/6 Mäusen 5-9 Plaques pro Darm, wobei bei älteren Tieren die Anzahl auf nur zwei reduziert sein kann. Morphologisch sind sie ähnlich wie Lymphknoten strukturiert und setzen sich aus B-Zellen in großen B-Zellfollikeln mit Keimzentren und T-Zellzonen zusammen, außerdem sind in PP DC und Makrophagen enthalten. In den B-Zellen läuft der Klassenwechsel zu Immunglobulin (Ig) A ab, welches vor allem gegen Bakterien, die im Darmlumen vorkommen, gerichtet ist und in das Darmlumen sekretiert wird. Die Entwicklung der PP, genau wie mLK, erfolgt bereits pränatal, wobei die Keimzentren erst nach der Geburt während der Besiedlung der Darmschleimhaut mit den kommensalen Mikrobiota gebildet werden. Im Gegensatz zu Lymphknoten besitzen die PP jedoch keine afferenten Lymphgefäße und die Antigenaufnahme geschieht durch spezialisierte M-Zellen (*microfold cells*), die sich im FAE befinden. Im Gegensatz zu den anderen Enterozyten sind die M-Zellen nur mit einer sehr dünnen Glykokalix- bzw. Mucusschicht bedeckt und besitzen keine Bürstensaummembran. Stattdessen weist deren Oberfläche charakteristische kleine Faltungen (*microfolds*) auf, die die Oberfläche deutlich vergrößern und die Antigenaufnahme erleichtern (7). M-Zellen nehmen aus dem Darmlumen Antigene über Endozytose auf, schleusen diese durch ihr Zytoplasma und geben sie durch Exozytose an die, in der subepithelialen Domregion liegenden DC, ab. Die durch Antigen aktivierten DC migrieren entweder zur benachbarten T-Zell Region oder zu B-Zell-Follikeln im Plaque um dort naive Lymphozyten zu stimulieren, oder sie gelangen über die Lymphwege zu mLK, in denen sie ebenfalls eine Immunreaktion initiieren (8). PP sind nicht nur wichtig bei der Immunabwehr gegen unerwünschte Antigene, sondern spielen auch eine essentielle Rolle bei der Entstehung von Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen. Eine Beeinträchtigung der Induktion der oralen Toleranz gegenüber luminalen Antigenen kann zur Ausbildung entzündlicher Darmerkrankungen führen (9).



**Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Peyerschen Plaques (PP) und des Follikel-assoziierten Epithels.** Unter niedriger Vergrößerung (links), kuppelartige Form des PP gewölbt zwischen den Villi in Richtung des Darmlumen. Unter hoher Vergrößerung (Mitte und rechts), M-Zellen mit kleinen Faltungen (*microfolds*) die die Antigenaufnahme erleichtern. Modifiziert nach Mowat, 2003 (4).

### 2.2.3 Cryptopatches und isolierte lymphatische Follikel

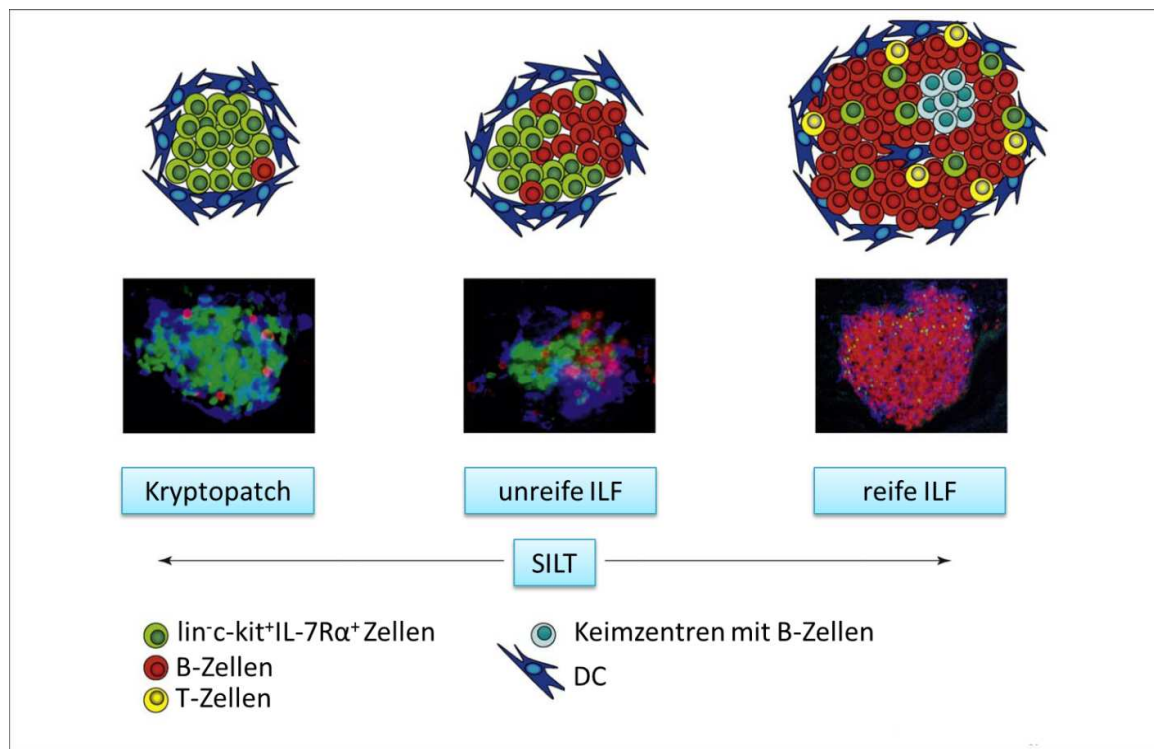
Cryptopatches (CP) wurden 1996 von Ishikawa als Lymphzell-Cluster von etwa 1000 Zellen in der LP am Fuß der Krypten zwischen zwei Darmzotten entdeckt (10). Charakteristisch für diese Zellansammlungen ist, dass sie aus nur zwei unterschiedlichen Zellpopulationen bestehen. In der Mitte des CP befinden sich LTi (*lymphoid tissue inducer*) Zellen, die c-kit, die Interleukin-7 Rezeptor  $\alpha$ -Kette, und CD44 aber keine für T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten oder Makrophagen spezifische Marker exprimieren ( $\text{lin}^- \text{c-kit}^+ \text{IL-7R}\alpha^+ \text{CD44}^+$ ) und somit einen mit lymphoiden Vorläuferzellen assoziierten Phänotyp aufweisen (Abb. 3). Diese Zell-Cluster sind von  $\text{CD11c}^+$  DC umgeben.

Einen wesentlichen Beitrag zur Erklärung der Funktion von CP leisteten genetische *fate mapping* Experimente von Eberl et al. (11, 12). Die Arbeitsgruppe hat herausgefunden, dass LTi Zellen in CP den *retinoic acid-related orphan receptor- $\gamma$ t* (ROR $\gamma$ t) exprimieren und dass deren Entwicklung von diesem Rezeptor abhängt. Außerdem konnten sie mit Hilfe von ROR $\gamma$ t<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen, dass diese keine CP und ILF entwickeln. Des Weiteren weisen sie darauf hin, dass CP die Vorläufer der ILF darstellen.

ILF wurden in der Literatur zum ersten Mal von Hamada et al. im Jahr 2002 beschrieben (13). Sie befinden sich sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm, wobei ihre Anzahl zunehmend von proximal nach distal steigt. Im Gegensatz zu den PP bestehen die ILF aus nur einem B-Zellfollikel mit vereinzelt T-Zellen und ihre Entwicklung erfolgt erst postnatal. In den ILF und PP erfolgt der Klassenwechsel zu IgA, das Darmbakterien kontrolliert (14). Da bereits gezeigt wurde, dass Patienten mit Morbus Crohn (MC) eine erhöhte Zahl der ILF aufweisen, wird über die mögliche Rolle der ILF bei

der Induktion der Immunreaktion bei entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert (15). Größe und Anzahl der ILF werden von der Art der bakteriellen Besiedlung des Darmes beeinflusst (16) und sind nach einer Behandlung mit Antibiotika reduziert (17). Durch ihre Induzierbarkeit und ihre reversible Natur scheinen die ILF eine wichtige Rolle in der Gewährleistung des Gleichgewichts zwischen dem Immunsystem und den kommensalen Bakterien zu spielen.

Oft werden die CP und ILF mit dem zusammenfassenden Begriff SILT (*Solitary Intestinal Lymphoid Tissue*) bezeichnet, wenn auch die beiden Strukturen gewisse Unterschiede aufweisen.



**Abb. 3: Die Struktur von Kryptopatches (CP) und isolierten lymphatischen Follikeln (ILF).** Als CP werden Aggregate von Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>IL-7Rα<sup>+</sup> Zellen bezeichnet, die von DC umgeben sind. Die ILF beinhalten zusätzlich einen großen Anteil an B-Zellen. Der Begriff SILT fasst CP, unreife und reife ILF zusammen. Modifiziert nach Eberl, 2009 (18).

Die CP enthalten viele LT<sub>i</sub> Zellen, die ILF hingegen sind ein lymphatisches Gewebe, das der Struktur und Funktion nach, dem B-Zell Follikel in PP ähnlich ist.



## 2.2.4 Lamina propria

Als lose Bindegewebsschicht stellt die LP ein Hauptkompartiment des efferenten Schenkels des GALTs dar. Sie erstreckt sich von der Basalmembran zur *Muscularis mucosae* und besteht aus einem Stützgerüst aus glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Bindegewebsfasern, in dem sowohl Blut- als auch Lymphgefäße verlaufen. Infiltriert wird das Gewebe von einer Vielzahl intestinaler Lymphozyten, die aus dem Blutsystem als Effektorzellen zurückkehren und gemeinsam mit Makrophagen, DC und Plasmazellen in der LP verbleiben.

## 2.2.5 Immunzellen im GALT

### 2.2.5.1 B-Zellen

B-Zellen der LP scheinen sich im Gegensatz zu den B-Zellen des peripheren Blutes in einem aktivierten Zustand zu befinden, was für eine permanente Stimulation dieser Zellen durch Antigene des intestinalen Lumens spricht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass 10-15% von ihnen den Transferrinrezeptor oder den IL-2 Rezeptor exprimieren, die spezifisch für eine Immunaktivierung sind (19). Interessanterweise sezernieren frisch aus der LP isolierte B-Zellen spontan Immunglobuline, ohne dass weitere Stimulation notwendig ist. B-Zellen der LP scheinen sich im Gegensatz zu B-Zellen des peripheren Blutes in einem aktiven Zustand zu befinden, was für eine permanente Stimulation der Zellen durch Antigene des intestinalen Lumens spricht. Sie sezernieren vor allem IgA (90%). Für die Differenzierung einer B-Zelle zu einer IgA produzierenden Plasmazellen wird das antiinflammatorisch wirkende Zytokin TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) benötigt, das von vielen Zellen, unter anderem von DC, folliculären DC, Epithelzellen bzw. T-Zellen, gebildet werden kann (20). Im Darm findet vor allem die Produktion von sekretorischen IgA-Dimeren statt, die die erste Barriere gegen Pathogene bilden. In der LP haftet IgA an einem membranständigen Glykoprotein, dem *polymeric Ig receptor* (pIgR) und wird durch Endozytose in die Epithelzelle aufgenommen. Das IgA Dimer wird eingeschlossen in einem Vesikel durch die Epithelzelle transportiert, um danach auf der luminalen Seite freigesetzt zu werden. IgA, das im Darmlumen große Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen zeigt, kann in die Mukosamatrix integriert werden. Es verhindert so die Diffusion von Antigenen durch die Glykokalix auf der Oberfläche der Epithelzellen, blockiert die Bindung an Oberflächenrezeptoren von Epithelzellen oder inhibiert die Motilität von Antigenen (21, 22). Es ist außerdem möglich, dass sich IgA-Dimere an spezifische Antigene binden und so deren Adhäsion mit der Mukosa verhindern, ohne das Komplementsystem

zu aktivieren oder die antikörperabhängige Zytotoxizität zu initiieren (23). Des Weiteren inhibiert IgA die Attraktion von Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen und reduziert dadurch deren proinflammatorische Aktivität (24). Zusätzlich kann IgA die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  herunterregulieren (25). IgA vermittelt somit einen lokalen Schutz, ohne dass eine entzündliche Reaktion entsteht und sorgt zugleich für eine mukosale Homöostase.

### 2.2.5.2 T-Zellen

Differenzierung von T-Zellpopulation ist in erste Linie von DC abhängig. Deren Aktivierungsstatus und das vorherrschende Zytokinmilieu treibt die Differenzierung der T-Zellen. Die durch DC aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen können zu Effektor T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen) oder zu regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> Treg) spezialisieren. CD8<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln sich größtenteils zu zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen (CTL, *cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes*), die auf antigen-gebundene Zellen zytotoxisch wirken. Es ist, vor allem im Darm, auch eine Differenzierung zu CD8<sup>+</sup> Treg möglich.

Charakteristisch für T<sub>H</sub>1-Zellen ist die Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-12, die einerseits zur Aktivierung von DC und Makrophagen in der LP beitragen, andererseits aber die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>17-Zellen, oder zu regulatorischen T-Zellen verhindern. Eine starke T<sub>H</sub>1 Antwort führt zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, die eine Entzündungsreaktion begünstigen und so zur Zerstörung des Darmepithels führen können. Dadurch können luminale Antigene in die LP eindringen. Eine überschießende T<sub>H</sub>1-Immunantwort ist ein Zeichen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) (26, 27). Es konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit verschiedenen Antikörpern gegen IFN- $\gamma$  nur teilweise erfolgreich ist und erst die Gabe eines Antikörpers gegen IL-12p40, der sowohl IL-12 als auch IL-23 neutralisierte, die Entzündung effektiv eindämmen konnte (28).

T<sub>H</sub>2-Zellen setzen große Mengen an IL-4, IL-5 und IL-13 frei, die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen auslösen. In Folge werden auch Mastzellen, Eosinophile und Basophile durch T<sub>H</sub>2-Zellen angeregt. Untersuchungen von LP Lymphozyten von Patienten mit Colitis ulcerosa zeigen *in vitro*, im Gegensatz zu gesunden Probanden und Patienten mit Morbus Crohn, eine erhöhte Expression von IL-5 und IL-13 (29).

IL-17-produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden erstmals im Jahr 2000 beschrieben (30) und fünf Jahre später wurden sie als autonome Zellpopulation der T<sub>H</sub>17-Zellen dargestellt (31, 32). Die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen, die in keinem Gewebe so zahlreich vorkommen wie in der LP, wird durch das immunregulatorische Zytokin *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und durch das proinflammatorische, pleiotrope Zytokin IL-6 induziert (33, 34). TGF- $\beta$  allein hingegen steuert *in vitro*

die Differenzierung naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen ( $CD25^+Foxp3^+$ ), während IL-6 die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 unterdrückt. Da IL-6-defiziente Mäuse eine abgeschwächte Generierung von  $T_H17$ -Zellen, aber eine verstärkte Generierung von  $Foxp3^+$  Treg zeigen, wird IL-6 eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Differenzierung zugeschrieben. Außerdem ist IL-23, ein Zytokin der IL-12 Familie, an der Differenzierung von  $T_H17$ -Zellen beteiligt. Ein spezifischer Transkriptionsfaktor für aktivierte  $T_H17$ -Zellen ist ROR $\gamma$ t (*retinoic acid-related orphan receptor*), der für die Expression T-Zell-spezifischer Zytokine wie z.B. IL-17, IL-22, als auch für die Expression von Zytokinrezeptoren verantwortlich ist. Da IL-17 zur Differenzierung sowie zur Rekrutierung von Neutrophilen in die LP und IL-22 zur Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere beitragen, ist für die  $T_H17$  Zellen eine proinflammatorische Funktion beschrieben (35).

$CD4^+CD25^+$  regulatorische Zellen wurden zum erstem mal durch Sakaguchi et al. beschrieben als Zellen, die die Fähigkeit besitzen, pathogene T-Zell-Antworten zu kontrollieren (36). Heutzutage weiß man, dass Treg mit ihren antinflammatorischen Eigenschaften für die Toleranz gegenüber den kommensalen Mikrobiota von maßgeblicher Bedeutung sind. Treg sind durch ihr Zytokinprofil und durch die Expression des für ihre Entwicklung und Funktion essentiellen Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead box protein P3*) gekennzeichnet. Sie sind in der Lage, große Mengen TGF- $\beta$  und IL-10, moderate Mengen von IL-5 und IFN- $\gamma$  aber kein IL-4 und IL-2 zu produzieren (37, 38). Treg können, basierend auf dem Ort ihrer Entstehung, in Thymus-gereifte natürliche Treg (nTreg) und in der Peripherie durch die Interaktion mit APC generierten Tregs (iTregs) eingeteilt werden. Ein Toleranzverlust durch Insuffizienz von Treg ist ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese von Allergien aber auch von CED. Bei CED kommt es zu einer unzureichenden Expansion funktionell aktiver, regulatorischer T-Zellen im Darm, die dann die lokale, massive Expansion von Effektor T-Zellen nicht genügend kompensieren können (39–41).

### **2.2.5.3 DC**

DC als antigenpräsentierende Zellen (APC) zeichnen sich durch ihre außergewöhnliche Plastizität und Heterogenität aus und spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. DC entwickeln sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark, zirkulieren in Blut und Lymphe und wandern in peripheres Gewebe. Dort nehmen sie als immature DC Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren sie auf ihrer Zelloberfläche in Fragmentform über MHC Klasse I- oder II Moleküle naiven antigen-spezifischen T-Zellen in sekundären Lymphorganen. Somit wird eine T-Zellvermittelte Immunantwort induziert.

Im Darm und den mLK können viele verschiedene Subpopulationen von DC identifiziert werden und die Anzahl der neu entdeckten Subpopulationen steigt weiterhin an. Verschiedenste Faktoren können herangezogen werden, um DC einzuteilen, unter anderem ihre Lokalisation, Migrationsfähigkeit, Ursprung, Expression von Oberflächenmolekülen (z.B. CD11b, CD11c, CD103) und/oder von Chemokin-Rezeptoren (CX<sub>3</sub>CR1, CCR6). Diese Subpopulationen erfüllen im GALT unterschiedliche Funktionen.

Mononukleäre Phagozyten im Darm können oft aufgrund ihrer migratorischen Fähigkeit und der Expression von Markern wie CD103 und CX<sub>3</sub>CR1, dem Rezeptor für Fraktalkin, auseinander gehalten werden. Dabei unterscheidet man CX<sub>3</sub>CR1<sup>int</sup>CD68<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> und CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>-Zellen, wobei CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellen Makrophagen repräsentieren. Die CX<sub>3</sub>CR1<sup>int</sup>CD68<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> DC können durch Ausbildung von transepithelialen Fortsätzen Antigene direkt aus dem Darmlumen aufnehmen, sind aber nicht in der Lage in mLK zu migrieren (42). Die Anteilsverhältnisse dieser Subpopulationen, insbesondere CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>-Zellen, können in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Darmbakterien variieren (42, 43). CX<sub>3</sub>CR1<sup>int</sup>CD68<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> DC, die zusätzlich CD11b exprimieren, haben einen ähnlichen Phänotyp wie intestinale Makrophagen, aber anders als die Makrophagen expandieren sie in Antwort auf *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3L) und stammen nicht von Ly6c<sup>hi</sup> Monozyten ab. Diese Subpopulation beeinflusst die Entwicklung der IFN-γ und IL-17 produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen im Darm und ist weit verbreitet in den meisten lymphoiden und peripheren Geweben, inklusive der PP, sie ist aber eher selten in der LP des Colons oder des Dünndarms zu finden (44, 45).

CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>-Zellen stammen von einer monozytären Vorläuferzellen, die durch Signale der Mikrobiota in den Darm rekrutiert werden kann, während sich die CD103<sup>+</sup> DC von zirkulierenden DC Vorläufern ableiten (46). Interessanterweise konnte in Mausmodellen für Colitis eine drastische Reduktion der CD103<sup>+</sup> DC in der LP beobachtet werden, während sie jedoch in der Milz noch zu detektieren waren (47). Darüber hinaus lassen sich die CD103<sup>+</sup> DC weiter durch die Expression von CD11b unterteilen. Die CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DC sind die Haupt-DC-Subpopulation in der LP des Dünndarms, während sie in der LP des Colons eher unterrepräsentiert sind. Eine Depletion dieser Zellen hat zwar keinen Einfluss auf die Anzahl von intestinalen FoxP3<sup>+</sup> T Zellen, korreliert aber mit einer Reduktion der T<sub>H</sub>17 Zellen (48, 49). Migratorische CD103<sup>+</sup> DC interagieren nach Antigen-Aufnahme mit B- und T-Zellen der PP und der mLK. Dort initiieren sie die Expansion von FoxP3 Treg in Abhängigkeit von Retinsäure und TGF-β, T<sub>H</sub>2-Zellen als auch von IgA<sup>+</sup> B-Zellen (9). CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC sind funktional und entwicklungsphysiologisch ähnlich zu CD8α<sup>+</sup> DC der Milz. Sie entstehen aus Flt3 abhängigen pre-DC Vorläufern, exprimieren CD8α<sup>+</sup> und sind sowohl im lymphatischen Gewebe der PP und ILF als auch verteilt in der LP zu finden (50–52). Wie CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC in anderen Geweben, sind sie auch im Darm in der Lage effizient lösliche Antigene zu präsentieren (Kreuzpräsentation) und damit Effektor CD8<sup>+</sup> T Zellen nach

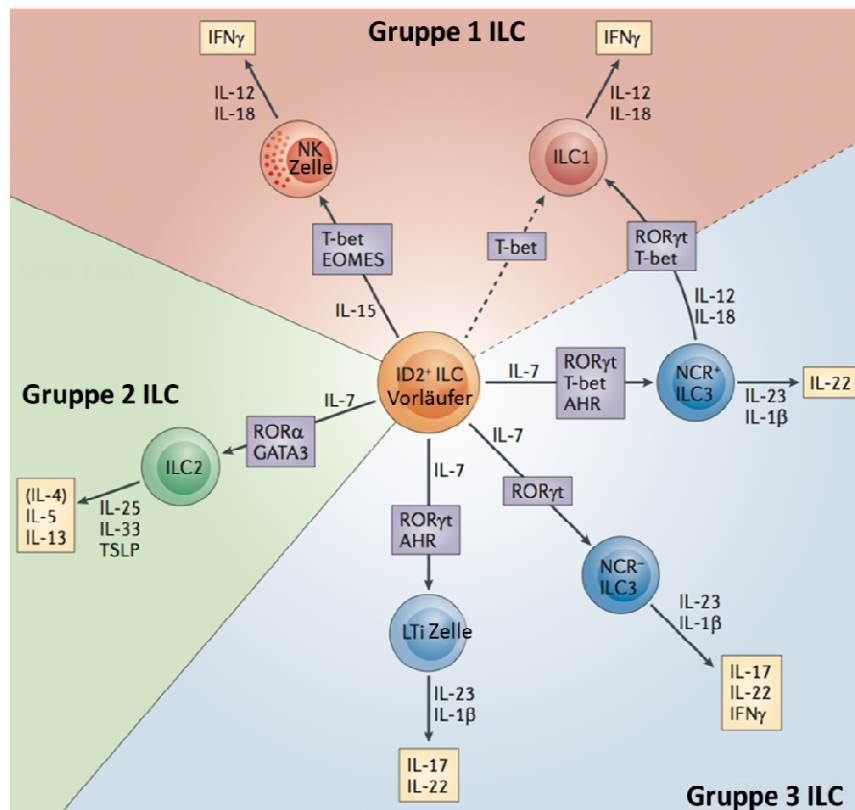
TLR Aktivierung zu expandieren (50, 53). Außerdem unterstützen sie in mLK die Treg Differenzierung und Expansion (50, 52).

#### **2.2.5.4 Makrophagen**

Makrophagen produzieren Zytokine, können Bakterien eliminieren und fördern dabei die Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm. Auf der Oberfläche exprimieren die intestinalen Makrophagen verschiedene Marker, wie F4/80, CD11b, CD64 und CX<sub>3</sub>CR1, zeigen hohe phagozytische Aktivität und eine charakteristische Morphologie mit zytoplasmatischen Vakuolen und einem großen Zytoplasmaanteil (45, 45, 54). Im Gegensatz zu den DC, die in der Lage sind, zu den mLK zu migrieren, um dort durch Aktivierung von naiven T-Zellen eine adaptive Immunantwort zu induzieren, bleiben die Makrophagen in der LP, wo sie als Effektorzellen agieren. Dort können sie die sekundäre Expansion der FoxP3<sup>+</sup> Treg erleichtern und deren suppressive Aktivität während einer Entzündung verstärken. Es konnte gezeigt werden, dass die Prozesse in Abhängigkeit von IL-10 und CX<sub>3</sub>CR1 ablaufen, da CX<sub>3</sub>CR1-defiziente Mäuse keine orale Toleranz entwickeln (55). Ein Grund dafür ist eine fehlende Expansion der antigenspezifischen Treg.

#### **2.2.5.5 *Innate lymphoid cells (ILC)***

ILC gehören zu einer Familie von lymphoiden Zellen, deren Aufgabe einerseits die Differenzierung von lymphatischen Geweben, andererseits die Kontrolle der Immun- und Entzündungsreaktion ist. Die drei Hauptmerkmale der ILC sind: Die Abwesenheit von RAG (*Recombination Activating Gene*) abhängigen Antigenrezeptoren, das Fehlen von Markern, die typisch für myeloide oder dendritische Zellen sind und die lymphoide Morphologie (56). Prototypische ILC Populationen sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und *lymphoid tissue inducer* (LTi) Zellen. NK-Zellen vermitteln frühe immunologische Antworten gegen Viren und sind an der Bekämpfung von Krebszellen beteiligt. Die LTi Zellen spielen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Lymphknoten während der Embryogenese. Obwohl NK- und LTi Zellen unterschiedliche Funktionen erfüllen, ist ihre Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Id2 abhängig und sie stammen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der so genannten *common lymphoid progenitor cell* ab (57).



**Abb. 4: Klassifizierung von innate lymphoid cells in drei Gruppen basierend auf deren funktionalen Eigenschaften.** Modifiziert nach Spits, 2013 (58).

Die im Jahr 2013 von Spits et al. vorgeschlagene Nomenklatur klassifiziert die ILC anhand von phänotypischen und funktionalen Merkmalen in drei Gruppen (Abb. 4). Die bislang bekannten Subpopulationen der ILC wurden nach dieser Klassifizierung analog zu T-Helferzellpopulationen ( $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ) eingeteilt. ILC der Gruppe 1 sind gekennzeichnet durch die Produktion von IFN $\gamma$ . Gruppe 2 ILC sezernieren Typ II-Zytokine (einschließlich IL-5 und IL-13) und benötigen Transkriptionsfaktoren, wie GATA3 und ROR $\alpha$  für ihre Entwicklung und Funktion. Durch die Sekretion von Typ-II Zytokinen wird in erster Linie metabolische Homöostase aufrechterhalten, außerdem wird dadurch das Rekrutieren weiterer Gruppe 2 ILC gefördert (59, 60). Stimuli, wie Allergene oder parasitäre Würmer führen zur Freisetzung von ILC2 induzierenden Zytokine durch das Epithel und eingewanderte Entzündungszellen (61, 62). Die dritte ILC Population ist in weitere Subpopulationen aufgeteilt, von denen aber alle IL-17 und/oder IL-22 produzieren und für deren Entwicklung ROR $\gamma$ t essentiell ist.

### 2.2.5.6 Intraepitheliale Lymphozyten

Wenn man davon ausgeht, dass jede vierte bis sechste Zelle die in der Epithelschicht zu finden ist, eine IEL darstellt (63), und dazu die große Oberfläche des Darmes mit einbezieht, dann fällt auf, dass die IEL die größte Lymphozytenpopulation des Körpers ausmachen. Die IEL repräsentieren eine Effektor-T-Zellpopulation, die zu 80% aus  $CD8^+$ -, 10% aus  $CD4^+$ - und etwa 6% aus  $CD4^-CD8^-$ -Zellen besteht (64). Weniger als 40% der  $CD8^+$  IEL exprimieren CD8, das aus einem membranständigen  $\alpha/\beta$  Heterodimer ( $CD8\alpha\beta$ ) besteht. Über die Hälfte der  $CD8^+$  IEL weisen hingegen ein homodimeres, aus zwei  $\alpha$  Ketten gebildetes CD8 Molekül ( $CD8\alpha\alpha$ ) auf (65). Im Gegensatz zu den T-Zellen des peripheren Immunsystems, die fast ausschließlich den  $\alpha\beta$  TCR exprimieren, prägen über die Hälfte der intraepithelialen T-Lymphozyten den  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor aus. Allerdings schwankt der prozentuale Anteil an  $\gamma\delta TCR^+$  Zellen in der Darmmukosa beträchtlich zwischen verschiedenen Spezies. So sind bei Mäusen bis über 50% der IEL  $\gamma\delta TCR^+$ , wohingegen beim Menschen deren Anteil bei 10-15% liegt (66, 67). Neben dem ungewöhnlichen T-Zellrezeptor enthalten IEL auch zahlreiche unreife doppelt positive ( $CD4^+CD8^+$ ) und doppelt negative ( $CD4^-CD8^-$ ) sonst nur im Thymus anzutreffende Lymphozyten. Der Nachweis dieser unreifen Zellen in der Darmschleimhaut führte zur Hypothese einer thymusunabhängigen T-Zellreifung im Darm, wobei die Kryptopatches möglicherweise für die Entwicklung von bestimmten IEL von Bedeutung sind.

Auch funktionell unterscheiden sich die IEL von den restlichen Lymphozyten des GALT und von T-Zellen des peripheren Immunsystems. So reagieren IEL *in vitro* nur schwach auf Concanavalin A oder PMA/Ionomycin, wohingegen diese Stimuli sehr effizient die Proliferation peripherer Lymphozyten anregen können (68). Auch ist die Stimulation der IEL durch  $CD3/TCR$  vermittelte Signale schwächer ausgeprägt als bei T-Zellen des peripheren Immunsystems. Jedoch sind IEL im Stande, nach Stimulation durch Mitogene oder  $TCR$ -vermittelte Signale verschiedene Zytokine, wie IL-3, IL-4, IL-5 und  $IFN-\gamma$  zu produzieren (69, 70). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass IEL als zytokinproduzierende Zellen eine regulatorische Rolle bei der Immunantwort im Darm spielen können. Angesichts ihrer ausgeprägten spontanen zytolytischen Aktivität sind IEL möglicherweise Teil der Initiation von Abwehrmechanismen gegen Infektionen oder der Tumorabwehr durch Lyse entarteter Darmzellen. Des Weiteren tragen sie zur Erhaltung der mukosalen IgA Antwort bei gleichzeitig bestehender oraler Toleranz bei. Außerdem besitzen sie eine protektive Funktion bei intestinalen Entzündungen und unterstützen die Wiederherstellung der Epithelbarriere nach Verletzungen. Auf eine mögliche Funktion dieser Zellen bei entzündlichen Erkrankungen weist die vermehrte Proliferation und Zytokinproduktion von IEL Zelllinien, die von Patienten mit Morbus Crohn gewonnen wurden, hin (71).

Durch ihre prädestinierte Lage in direkter Nachbarschaft vom Darmlumen erfüllen IEL eine immunologische Überwachungsfunktion mit dem Ziel sowohl eine überschießende Immunantwort zu verhindern, als auch essentielle Abwehrmaßnahmen gegenüber Tumoren und Mikroorganismen zu initiieren.

## 2.3 Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR)

### 2.3.1 Allgemeines

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR), auch Dioxinrezeptor genannt, wurde das erste Mal im Jahre 1982 (72) als Protein, das in der zytosolischen Fraktion der Leber 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) spezifisch und mit hoher Affinität bindet, beschrieben. Weitergehende Analysen, als auch Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen haben zur Identifizierung des AhR als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor beigetragen, der neben der Detoxifikation von Umweltchemikalien eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und der Proliferation, aber auch bei der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems der Leber spielt (73, 74).

AhR-defiziente Mauslinien wurden Mitte der 90er Jahre in drei unabhängigen Arbeitsgruppen gleichzeitig generiert und analysiert (75–77). AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen keine Induktion der Expression von *Cyp1a1* und *Cyp1b1* nach Aktivierung des AhR und sind resistent gegenüber TCDD vermittelter Toxizität. Außerdem weisen die AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse zahlreiche physiologische Defekte, wie verzögertes Wachstum, eine kleinere Leber, Veränderungen im vaskulären System der Leber und eine verminderte Fruchtbarkeit auf. Genexpressionsanalysen der Leber von Wildtyp und AhR-defizienten Mäusen haben über 200 unterschiedlich exprimierte Gene ergeben, was auf eine Beteiligung des AhR an einem breiten Spektrum physiologischer Prozesse hindeutet (78).

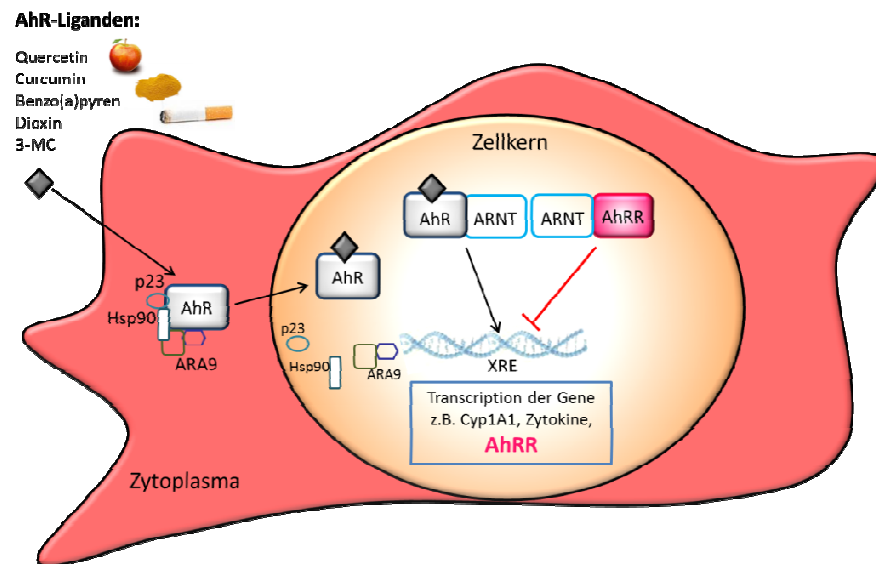
Die Identifizierung der Aminosäuresequenz des gereinigten AhR Proteins führte zur molekularen Klonierung der cDNA des Rezeptors und machte deutlich, dass es sich bei dem AhR um ein Protein der PAS Superfamilie handelt (79).

### 2.3.2 AhR-Signaltransduktion

Der klassische Mechanismus der AhR-abhängigen Genaktivierung ist in Abb. 5 schematisch dargestellt. Unter unstimulierten Bedingungen liegt der AhR im Zytoplasma als Multiproteinkomplex mit stabilisierenden Proteinen wie Hsp90, ARA9 (auch als AIP1 oder XAP3 bezeichnet) und p23 vor



(80, 81). Nach dem ein AhR-Ligand, der immer sehr hydrophob ist, per Diffusion die Zellmembran durchdringt, bindet er an den AhR und ändert somit die Konformation des Transkriptionsfaktors. Weiterhin exponiert der AhR seine sog. N-terminale Kernlokalisationssequenz, die die Translokation des AhR in den Zellkern ermöglicht. Im Zellkern zerfällt der stabilisierende Proteinkomplex und der AhR kann als freies Protein mit einem anderen PAS Protein, ARNT (AhR *Nuklear Translocator*) heterodimerisieren. Zusammen mit ARNT bindet der Rezeptor mit hoher Affinität an XRE (*Xenobiotic Responsive Elements*) und kann damit als Transkriptionsfaktor wirken.



**Abb. 5: Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) vermittelte Signaltransduktion.** Nach der Bindung eines AhR-Ligandes transloziert der AhR vom Zytoplasma in den Zellkern, wo der stabilisierende Proteinkomplex abdissoziiert. Im Zellkern heterodimerisiert der AhR mit dem AhR *Nuklear Translocator* (ARNT). Das AhR/ARNT Heterodimer bindet wiederum an Xenobiotic Responsive Elements (XRE) und kann die Expression einer Vielzahl von Genen induzieren, wie z.B. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, Zytokine und AhR-Repressor (AhRR). Der AhRR konkurriert mit dem AhR um die ARNT Bindestelle. Da ihm aber die transaktivierende Domäne fehlt, kann der AhRR die Expression von Genen nicht induzieren. Somit werden nicht nur die AhR-Zielgene supprimiert aber auch die Expression des ahr selbst wird in einem negativen Rückkopplungsmechanismus reprimiert.

In der Folge wird eine Vielzahl von Genen, die sog. AhR-Genbatterie, wie fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Cytochrom P450 Familie, beispielweise CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, induziert. Außerdem ist die AhR vermittelte Signaltransduktion auf vielen Ebenen reguliert, darunter durch proteosomale Degradierung des AhR/ARNT Komplexes, Autoregulation durch induzierte, metabolische Enzyme und die Induktion des AhR-Repressors (AhRR).

### 2.3.3 Der Arylhydrocarbon Rezeptor Repressor (AhRR)

Zu den Zielgenen des AhR gehört auch der zuerst von Mimura et al. beschriebene, AhRR (82). Seine Funktion als Repressor der AhR Aktivität konnte in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden, wobei als Mechanismus eine negative Rückkopplung der AhR-abhängigen Genregulation postuliert worden ist (83). Der Repressor ist wie der AhR in der Lage, mit ARNT zu dimerisieren, daraufhin mit dem AhR-ARNT Komplex um die DNA-Bindestelle zu konkurrieren und dadurch die Aktivität des Rezeptors zu dämpfen. Da aber dem AhRR eine transaktivierende Domäne fehlt, bleibt das AhRR/ARNT Heterodimer transkriptionell inaktiv. Darüber hinaus kann der AhRR keine Liganden binden, obwohl die N-terminale Sequenz des AhRR stark homolog zu der des AhR ist (84). Der AhRR kann durch AhR Agonisten, wie zum Beispiel TCDD oder 3-Methylcholanthren (3-MC), ähnlich wie CYP1A1 induziert werden (82, 83, 85). Die Regulation der Genexpression über solche Rückkopplungsmechanismen ist in der bHLH- (*basic helix-loop-helix*) PAS Proteinfamilie weit verbreitet, wie z. B. bei Proteinen, die an der Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt sind. Das Gen *clock* induziert die Expression seines eigenen Inhibitors, *Per* [96]. Ein weiteres Beispiel ist die HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia inducible Factor  $\alpha$* ) Signalkaskade, in der das inhibierende Protein iPAS (*inhibitory PAS*) induziert wird, um die HIF1 $\alpha$ -Aktivität über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu inhibieren [97].

### 2.3.4 AhR-Liganden

Der AhR besitzt als einziges Mitglied der ganzen bHLH-PAS Proteinfamilie eine Ligandenbindestelle. Die Liganden des AhR sind strukturell sehr unterschiedlich und lassen sich in synthetische Liganden, die als Folge anthropogener und nicht-biologischer Reaktionen entstehen und in natürlich vorkommende Liganden einteilen. Zu den synthetischen Liganden des AhR zählen nicht-halogenierte, polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sowie halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAH). PAH sind z.B. Benzoflavon, Benzo[a]pyren und 3-MC, die in der Umwelt weit verbreitet sind. Sie entstehen als Nebenprodukte der unvollständigen Pyrolyse von Kohlenstoffquellen bei industriellen Prozessen und sind in Dieselabgasen, im Zigarettenrauch und in stark gegrillten Lebensmitteln enthalten. HAH sind unter anderem polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD), polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) und polychlorierte Biphenyle (PCB). Eine Hauptquelle der PCDD war früher die Herstellung und Verarbeitung chlorierter organischer Verbindungen, während heute vor allem thermische Prozesse in Anwesenheit von Chlorverbindungen, wie z.B. bei der Müllverbrennung, sowie der Verbrennung von Holz und fossilen Brennstoffen, zur Entstehung von HAH führen.

Außerdem sind manche natürlich vorkommenden Substanzen, besonders Nahrungsbestandteile in der Lage, den AhR-abhängigen Signalweg zu aktivieren oder/und zu deaktivieren. Obwohl einige Nahrungsfaktoren als Aktivatoren des AhR beschrieben sind, weisen viele von ihnen auch antagonistische Effekte auf und konkurrieren mit den klassischen Liganden. Zu den prominenten Beispielen der natürlich vorkommenden AhR-Liganden gehören vor allem sekundäre Pflanzenstoffe wie Flavonoide, die mehr als 4000 Substanzen aus der Gruppe der Polyphenole umfassen, und die in nahezu allen essbaren Pflanzen zu finden sind (86, 87). Flavonoidreiche Nahrung ist gesundheitsfördernd, weil Flavonoide anti-inflammatorische, anti-karzinogene, anti-allergische sowie anti-thrombotische Wirkungen zeigen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Curcumin, Quercetin und Resveratrol durch Inhibition des TCDD-abhängig aktivierten AhR als seine Antagonisten agieren (88–90). Außerdem induzieren diese Flavonoide *in vitro* die Transkription von CYP1A1 (91). Curcumin ist ein intensiver gelb-oranger Extrakt aus der Gelbwurzel (*Curcuma longa*) und ist als wesentlicher Bestandteil von Curry-Mischungen bekannt. Große Mengen an Quercetin sind in häufig verzehrten Nahrungsmitteln enthalten, wie Zwiebeln, Äpfeln, Weintrauben, Brokkoli oder grünen Bohnen. Quercetin ist außerdem in zahlreichen Arzneipflanzen wie z.B. *Ginkgo biloba*, Johanniskraut oder den Holunderbeeren zu finden und hat häufig erheblichen Anteil an der Heilwirkung dieser Pflanzen.

Die Annahme, dass der AhR viele wichtige physiologische Funktion erfüllt, führte zur Suche nach potentiellen endogenen Liganden. Dabei konnte eine große Liste der endogenen AhR-Liganden zusammengestellt werden, die z.B. Sterole, Indigoide, Metabolite von Häm oder der Arachidonsäure, Tetrapyrrole, wie Bilirubin, als auch Nahrungsbestandteile beinhaltet (92, 93). Regelmäßig werden neue AhR-Liganden identifiziert, allerdings sind spezifische und höchst wirksame endogene Liganden des AhR in biologisch relevanter Konzentration bis heute noch nicht bekannt. Einzig ein UV Photoprodukt von Tryptophan, 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole (FICZ) konnte bisher als hochspezifischer AhR-Ligand identifiziert werden (94). Weitere endogene AhR-Liganden entstehen durch bestimmte Darmbakterien (95) durch Metabolisierung von Tryptophan und Indolen. Beispielweise nutzen Bakterien aus der grampositiven Gattung *Lactobacillus* Tryptophan als Energiequelle und produzieren dabei Metabolite, wie Indol-3-aldehyde, die den AhR in ILC aktivieren können (96).

### 2.3.5 Die Rolle des AhR in Immunsystem

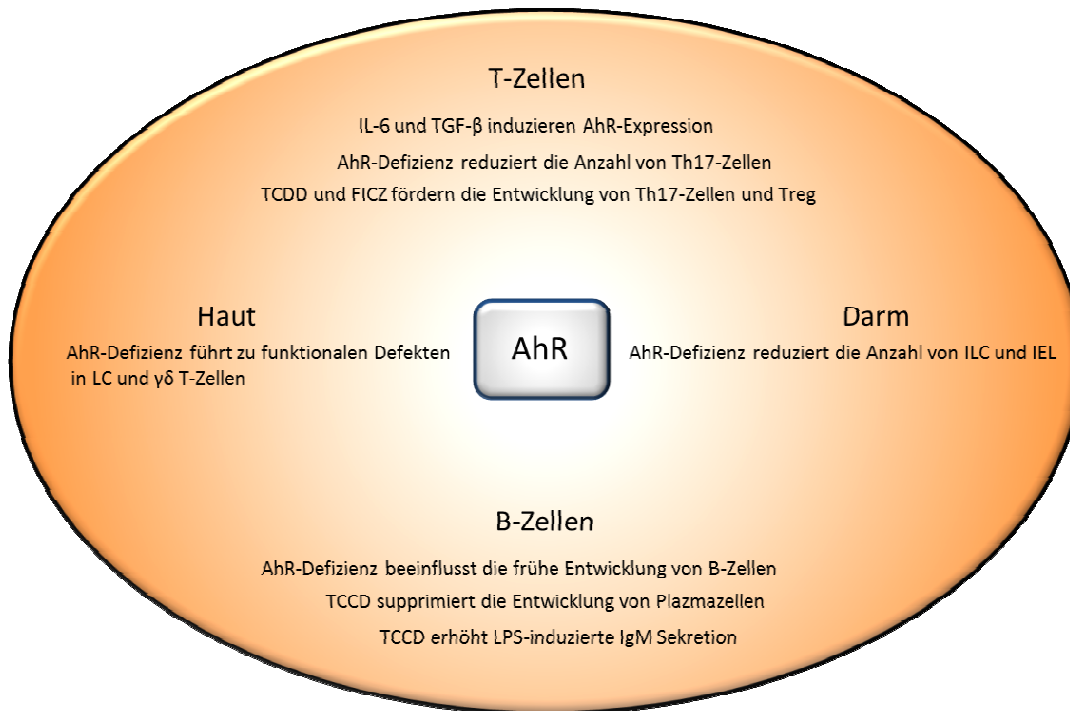
Zellen des angeborenen Immunsystems, wie DC und Makrophagen exprimieren nach der Stimulation mit LPS oder CpG große Mengen an AhR (97, 98). Langerhanszellen (LC) weisen hohe AhR Level auf und die Abwesenheit des AhR führt zur Beeinträchtigung der Aufregulierung der LC und deren

Antigenpräsentation als auch zu einer verminderten Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) Produktion (99). Die AhR-Aktivierung in DC kann eine autoimmune Entzündungsreaktion beeinflussen. Beispielweise, führt die Gabe von TCDD zur Differenzierung von Treg durch Induktion von IDO in den DC (97).

Die adaptive Immunantwort wird durch Aktivierung, Differenzierung und klonale Expansion von T- und B-Lymphozyten ausgelöst und hängt vom Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren ab. Immuntoxikologische Untersuchungen zeigen, dass der AhR Immunantworten gegen Pathogene, wie zum Beispiel *Streptococcus pneumoniae* (100), Influenzaviren (101) und Herpesviren (102) beeinflusst. Der durch TCDD aktivierte AhR wirkt immunsuppressiv und ist an der Apoptose von T-Zellen und Thymozyten, Thymusinvolution, sowie Milzatrophy beteiligt. T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen weisen während der Differenzierung keine Expression des AhR auf (103). M50367 ist ein AhR Agonist, der in der Lage ist, das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Gleichgewicht in Richtung T<sub>H</sub>1 zu verschieben und somit die Symptome einer Allergie oder allergischen Asthmas zu lindern. Drei unabhängige Arbeitsgruppen berichteten, dass der AhR eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Funktion von Th17-Zellen und Treg spielt (104–106) (Abb. 6). Dabei wurde ein interessantes Paradigma der Ligandspezifischen Funktion des aktivierten AhR postuliert. Es konnte gezeigt werden, dass TCDD Treg induziert und gleichzeitig Th17-Zellen inhibiert (104, 106), während FICZ die Th17 Differenzierung und damit die Th17-abhängige Autoimmunreaktion verstärkt (105). Treg AhR-defizienter Mäuse produzieren eine geringere Menge von IL-10 (107), dafür aber erhöhte Spiegel von IL-12 und IFN- $\gamma$  (108), die IL-10 unterdrücken.

Es ist wenig über die Rolle des AhR bei der Differenzierung von B-Zellen bekannt. Thurmond et al. konnten zeigen, dass AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse mehr pro-/pre- B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>FLT3<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>) haben als AhR<sup>+/-</sup>-Tiere (109). Interessanterweise wird in Abwesenheit des AhR die frühe Entwicklung von B Zellen im Knochenmark beeinträchtigt. Eine Behandlung von Mäusen mit TCDD reduziert außerdem die Population der IgM-sezernierenden Plasmazellen (110) und vermindert die Ausschüttung von IgE. Weiterhin kann TCDD die Effektorfunktionen von primären humanen B-Zellen beeinflussen und die IgM Antworten supprimieren (111).

Es ist mittlerweile bekannt, dass der AhR die Immunantwort auch durch Interaktionen mit anderen Signalwegen, wie zum Beispiel dem NF- $\kappa$ B Signalweg, reguliert. NF- $\kappa$ B kontrolliert die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und anderen inflammatorischen Zytokinen. Der durch AhR-Liganden ausgelöste oxidative Stress kann den NF- $\kappa$ B Signalweg aktivieren und somit eine Entzündung verschlimmern (112).



**Abb. 6: AhR-vermittelte immunologische Effekte in verschiedenen Zellen und Organen.**

Eine weitere Zellpopulation, die mit der Entstehung von Autoimmunität assoziiert ist, den AhR und ROR $\gamma$ t exprimiert und seit den letzten Jahren sehr stark im Focus der Forschung steht, sind die ILC. Untersuchungen von Kiss et al. demonstrierten, dass AhR-Signalwege für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Homöostase der ILC im darmassoziierten Immunsystem erforderlich sind (113). Außerdem zeigen die Autoren, dass Mäuse, die einer Indol-freien Diät ausgesetzt worden sind, sehr empfindlich gegenüber Darmpathogenen waren. Das Fehlen von Cryptopatches und ILF in AhR-defizienten Mäusen, weist darauf hin, dass der AhR eine wichtige Rolle in der postnatalen Entwicklung dieser lymphoiden Strukturen spielt (114).

Interessanterweise ist der AhR auch für die postnatale Aufrechterhaltung von IEL und auch  $\gamma\delta$  T-Zellen und CD8 $\alpha\alpha^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen notwendig (115). Vor der Geburt entwickeln sich die IEL und auch die ILC normal und migrieren in den Darm der AhR-defizienter Mäuse; ihre postnatale Expansion ist jedoch AhR-abhängig.

## 2.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

### 2.4.1 Epidemiologie und Ätiologie von CED

Unter dem Begriff CED fasst man chronische, rezidivierende, multifaktoriell bedingte, intestinale Entzündungen unklaren Ursprungs zusammen. Am häufigsten auftretende Erkrankungen sind Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die anhand ihrer histopathologischen Krankheitsbilder unterschieden werden.

Bei Morbus Crohn-Patienten kann der gesamte Verdauungstrakt vom Mund bis zum Anus betroffen sein. Am häufigsten treten Entzündungsreaktionen im terminalen Ileum, Blinddarm und dem Colon auf, wobei gesunde und entzündete Darmabschnitte nebeneinander liegen können. Der Entzündungsprozess erfasst hierbei alle Schichten der Darmwand, so dass es häufig zur Bildung von Fisteln, Fissuren, eitrigen Abszessen und Stenosen kommt.

Im Gegensatz zu Morbus Crohn ist die Entzündung bei Colitis ulcerosa auf das Colon begrenzt. Meistens beginnt die Erkrankung im Rektum und breitet sich im weiteren Verlauf in Richtung des proximalen Dickdarms aus (116). Die Entzündung ist auf die Mucosa beschränkt und durch Ulzerationen, Ödembildung und Blutungen gekennzeichnet. Histologisch zeigt sich bei der akuten und auch der chronischen Entzündungsreaktion der Schleimhaut das Vorliegen von Kryptenabszessen, Infiltration von Granulozyten, Verformung der Schleimhautdrüsen und der Verlust an schleimproduzierenden Becherzellen (117). Zusätzlich gilt die Colitis ulcerosa als Präkanzerose, da das Risiko ein Coloncarcinom zu bekommen, stark erhöht ist.

Beide Krankheiten zeigen ähnliche klinische Erscheinungsbilder mit heftigen Durchfällen, krampfartigen Bauchschmerzen, Gewichtsverlust und Übelkeit, die zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen.

Insgesamt ist Colitis ulcerosa, ebenso wie Morbus Crohn, eine Erkrankung mit vielen Komplikationen und Begleiterkrankungen. Dadurch senkt sich die Lebensqualität der Patienten enorm, welches sich in einem hohen Leidensdruck äußert. Nicht zuletzt deswegen, sondern auch wegen der steigenden Inzidenz beider Syndrome sollte die Forschung an diesen Krankheiten weiter gefördert werden.

Weltweit erkranken pro Jahr 20-150 Personen auf 100.000 Einwohner an CED, wobei vor allem Bewohner der westlichen Industrieländer (USA, Großbritannien, skandinavische Länder) betroffen sind. Die Anzahl der Erkrankten nimmt drastisch zu und hat sich in den letzten 50 Jahren um das 8-10-fache erhöht. Interessanterweise steigt die Inzidenz an CED zu erkranken bei Emigranten aus Regionen mit niedrigem Risiko nach Einwanderung in Regionen mit hoher Erkrankungswahrscheinlichkeit stark an (118).

Die Ursache von CED ist trotz intensiver Forschungen in den letzten Jahrzehnten noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Faktoren wie eine genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse, Mikrobiota und eine Dysregulation des Immunsystems werden als Auslöser diskutiert.

Von der genetischen Seite wurde beispielweise eine eindeutige Assoziation von Morbus Crohn mit Mutationen in TLR4 und drei verschiedenen Mutationen im *nucleotide binding and oligomerization domain/Caspase recruitment domain* (Nod2/CARD15) Gen auf Chromosom 16 gefunden, die immunologische Fehlregulationen verursachen (119). Über die TLR kann das Immunsystem extrazelluläre Mikroorganismen erkennen (120, 121), während Proteine der NOD/CARD-Familie Bestandteile intrazellulärer Bakterien detektieren (122). Bindung der Bakterienbestandteile an TLR bzw. NOD-Proteine, hat eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B zur Folge, die wiederum Zytokinsynthese induzieren kann. Interessanterweise fungiert NOD2 als negativer Regulator der TLR2-vermittelten Immunantworten (123). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TLRs und NOD2/CARD15 bei der durch DC vermittelten immunologischen Toleranz gegenüber Darmbakterien beteiligt sind (124).

Zu den umweltbedingten Faktoren zählen unter anderem Rauchen, Stress und westlicher Lebensstil, der laut der Hygienehypothese einen negativen Einfluss auf die Entwicklung eines ausgewogenen Immunsystems hat. Bei Rauchern, die an Morbus Crohn erkrankten, konnte sogar eine Verschlechterung des Entzündungszustandes beobachtet werden, während interessanterweise bei Colitis ulcerosa der Zigarettenkonsum eher protektiv zu sein scheint (125).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Pathogenese von CED stellt die Beteiligung der Darmbakterien dar. Die Behandlung von Morbus Crohn-Patienten mit Antibiotika reduziert nicht nur die Kommensalen, sondern auch die Entzündungsreaktionen im Magen-Darm-Trakt und führt zu einer Verbesserung der klinischen Symptome (126). Außerdem weisen CED-Patienten eine Verschiebung der Bakterienzusammensetzung, eine sog. Dysbiose, auf. CED-Patienten weisen eine stärkere Besiedlung des Darms mit *Bacteroides*, *E. coli* und *Enterokokken* auf, wohingegen *Bifidobakterien* und *Lactobacillen* im Vergleich zu gesunden Menschen weniger häufig vorkommen (127–129). In verschiedenen Tiermodellen für Colitis konnte gezeigt werden, dass bei keimfreien Mäusen die Entzündung ausbleibt.

Studien lassen vermuten, dass es nach einer Störung der intestinalen Epithelbarriere zum Kontakt von Darmkommensalen mit Immunzellen kommt, die in einem genetisch prädisponierten Organismus eine überschießende Immunantwort auslösen. CED-Patienten zeigen eine Dysregulation des Immunsystems, die durch Zusammenbrechen der Toleranz gegenüber den Kommensalen und harmlosen im Darmlumen vorkommenden Antigenen hervorgerufen wird. Im entzündeten Gewebe wurden Infiltrate von DC, Makrophagen und Lymphozyten, als auch ein starker Anstieg proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IL-6 erfasst (130). TNF- $\alpha$  verursacht eine

Zerstörung der Epithelbarriere, induziert Apoptose in Epithelzellen, führt zur Sekretion von Chemokinen und aktiviert Granulozyten, Makrophagen und B-Zellen. TNF- $\alpha$  ruft auf diese Weise zusammen mit IL-1 $\beta$  und IL-6 die charakteristischen Krankheitszeichen der CED hervor. Demzufolge wird eine Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF, bereits erfolgreich in der Behandlung von CED angewandt. Zu den entzündungshemmenden Mediatoren gehören vor allem TGF- $\beta$ , IL-1ra (IL-1 Rezeptorantagonist), IL-10, IL-4 und IL-13.

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterscheiden sich nicht nur durch Lokalisation der Entzündung, sondern auch durch die Art der T-Zell-Antworten. In der Darmwand von CED Patienten kann im Vergleich zu gesunden Menschen ein stark erhöhter Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen gefunden werden. Bei Morbus Crohn scheint eine T<sub>H</sub>1 Antwort und damit die Produktion von Mediatoren wie IFN- $\gamma$  und IL-2 vorzuherrschen, wohingegen bei Colitis ulcerosa eine atypische, überschüssige T<sub>H</sub>2-Antwort hervorgerufen wird, die mit der Freisetzung von TGF- $\beta$  und IL-5, aber nicht IL-4 einhergeht (29, 131).

#### 2.4.2 DSS-Colitis

In den letzten Jahren wurden viele neue Tiermodelle für CED beschrieben, die zur Aufklärung der Pathogenese und Mechanismen von CED beitragen. Die Zahl der Tiermodelle für CED stieg seit 1993 kontinuierlich an und umfasst momentan mehr als 100 Modelle (132). Sie werden in vier Kategorien klassifiziert: Genetische, adaptive Transfer-, spontane und chemisch induzierbare Modelle. Beispielweise erkranken Mäuse mit Defizienz von IL-2 und IL-10 Zytokinen spontan an Colitis. Die IL-2<sup>-/-</sup> und IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln unter konventioneller Tierhaltung eine chronische Colitis, bleiben jedoch unter keimfreien Bedingungen entzündungsfrei bzw. zeigen nur eine sehr milde, verzögerte Darmentzündung (133–135). Daher eignen sich diese gnotobiotischen Mäuse sehr gut für Analysen einzelner kommensaler Bakterien, die bei der Pathogenese von Colitis beteiligt sind.

Chemisch kann eine Entzündung des Colons unter anderem durch orale Gabe von DSS (Dextran-Sodium-Sulfat) und durch rektale Applikation von TNBS (*Trinitrobenzene Sulfuric Acid*) oder Oxazolone hervorgerufen werden. Bei dem TNBS-Colitis-Modell wird einmalig intrarektal das zuvor in Ethanol gelöste TNBS den Versuchstieren appliziert (136). Durch das Ethanol wird die Schleimhaut des Colons geschädigt und somit die Darmbarriere für den Eintritt des TNBS durchbrochen. TNBS ist in der Lage als Hapten an Darmbakterien und Proteine zu binden, sie immunogen zu machen und dadurch das Immunsystem zu aktivieren. Binnen weniger Stunden entsteht eine akute transmurale Entzündung, wobei CD4-T Lymphozyten vom T<sub>H</sub>1-Typ eine wichtige Rolle spielen. Außerdem konnten erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-12 beobachtet werden, was einem Morbus Crohn



ähnlichen Modell entspricht (137). Im Gegensatz dazu erhöht die Verabreichung von Oxazolon die Spiegel von durch NK-T Zellen produzierten IL-13 (138). Die Oxazolon-Colitis stellt somit ein Modell für die Colitis ulcerosa dar.

Das DSS-Modell der Maus kommt dem klinischen Erscheinungsbild und den morphologischen Veränderungen, die bei Colitis ulcerosa Patienten auftreten, ziemlich nahe und ist relativ einfach durchzuführen. Die akute DSS-Colitis manifestiert sich nach sechs bis neun Tagen Behandlung mit 3-5% DSS im Trinkwasser und äußert sich histologisch durch eine massive Infiltration der Lamina propria des Colons durch Monozyten und Granulozyten, mit einer Zerstörung der Darmkrypten und lymphoider Hyperplasie (139, 140). Klinisch ist die DSS-Colitis durch Gewichtsverlust, Diarrhö und Blut im Stuhl gekennzeichnet.

Dextransulfat ist ein geruchloses, weißes bis weißgelbliches, wasserlösliches Natriumsalz, das durch Veresterung von Dextran mit Chlorschwefelsäure erzeugt wird. DSS ist eine toxische Substanz, die in erster Linie Epithelschäden verursacht. Es hemmt die Proliferationsrate, als auch die Vitalität der Epithelzellen. Außerdem wird DSS über Phagozytose durch Monozyten und Granulozyten aufgenommen und führt zur Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Die akute DSS-Colitis tritt auch bei SCID-Mäusen (*Severe Combined Immunodeficiency*) auf, so dass eine Rolle des erworbenen Immunsystems im Akutstadium eher fraglich ist (141).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Der AhR stellt eine interessante Verknüpfung zwischen externen Einflüssen, wie chemischen Schadstoffen aber auch Nahrungsbestandteilen und dem Immunsystem dar. In den letzten Jahren lieferte eine Reihe von Studien wertvolle Erkenntnisse über die Rolle dieses Transkriptionsfaktors im Immunsystem unter anderem in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der darmassoziierten Lymphozyten. Außerdem ist bekannt, dass die Aktivierung des AhR Symptome der Colitis abmildert. Deswegen sollte der Regulation der AhR-Aktivität eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es demzufolge, ein besseres Verständnis der Funktion des AhRR im darmassoziierten Immunsystem zu erlangen. Durch die Untersuchungen der in unserer Arbeitsgruppe generierten AhRR/EGFP-Mäuse sollte mehr über funktionelle Aspekte des AhRR in Erfahrung gebracht werden.

Um einen besseren Einblick in die Mechanismen des AhR-Signalwegs und der Abhängigkeit der AhRR Expression vom AhR zu erhalten, wurden AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse analysiert. Weiterhin wurde die Frage adressiert, ob die AhR-Liganden aus der Nahrung und bakterielle Bestandteile einen Einfluss auf die AhRR-Expression ausüben.

Da die Aufklärung der Rolle des AhRR im mukosalen Immunsystem im Mittelpunkt dieser Arbeit stand, wurde das DSS-induzierte Colitis Modell verwendet. Dabei wurde zum einen untersucht, ob die Aufrechterhaltung der Epithelbarriere in Abwesenheit des AhRR beeinträchtigt ist. Zum anderen wurden verschiedene Zellpopulationen im darmassoziierten Immunsystem auf Veränderungen in der Anzahl und auf ihre AhRR-Expression analysiert. Da Änderungen der Darmbakterien die Auslösung und Ausprägung entzündlicher Darmerkrankungen determinieren können, wurde zusätzlich die Zusammensetzung der Bakterien im Dünndarm und im Colon der AhR<sup>-/-</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse im Vergleich mit Wildtyp-Kontrolltieren ermittelt.

Auf diese Weise können möglicherweise neue Prinzipien der Immunregulation im darmassoziierten Immunsystem sowie ihre Beeinflussbarkeit durch Nahrungsbestandteile definiert werden. Bessere Kenntnisse über AhR/AhRR Wechselwirkungen sind für die zukünftige Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von CED von erheblicher Bedeutung.

## Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Absorptions-Mikroplatten-Lesegerät EL800	Biotek, Bad Friedrichshall
Biofuge fresco	Thermo Scientific, Bonn
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus, Düsseldorf
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence, Essen
Geldokumentationssystem DarkHood DH-40/50	Biostep, Jahnsdorf
Grobwaage Kern	Kern, Balingen-Frommern
Homogenisator Precelly's®	Peqlab, Erlangen
Inkubationsschüttler Innova® 44/44R	Eppendorf, North America
Kryostat CM3050 S	Leica, Nussloch
Kühl- und Gefriergeräte	Bosch, Stuttgart / New Brunswick, USA
Magnetrührer VARIOMAG® POLY 15	neoLab, Heidelberg
Mehrkanalpipetten	Abimed, Langenfeld
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-Maschine T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald

Gerät	Hersteller
Real-Time System	CFX96™, Biorad, München
Sicherheitswerkbank Klasse II für Zellkultur, BDK-SK	BDK Luft- und Reinraumt + B25technik, Sonnenbühl
Spektrophotometer NanoDrop1000	Peqlab, Erlangen
Sterile bench HERAsafe	Thermo Scientific, Bonn
Tecan Infinite® 200 Mikroplatten-Photometer	Tecan Group, Crailsheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 5415R für Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R für Mikrottestplatten und 15/ 50 ml-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Einbettform für Gewebe-Gefrierschnitte	Sakura Finetek, USA
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Spritzen	Braun, Melsungen
ELISA Platten, 96-well, half area, Bindekapazität mittel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Röhrchen für Durchflusszytometrie (Falcon)	BD Biosciences, Heidelberg
Haemocult®	CARE diagnostica, Voerde
ImmEdge Stift (Histologie)	Vector Laboratories, USA
Kanülen	Microlance BD Bioscience, Heidelberg
Objekträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, USA
Reaktionsgefäße 1,5/2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsiebe 100 µm/70 µm/40 µm	BD Biosciences, Heidelberg

Sofern nicht anderes aufgeführt, wurden die Standard-Verbrauchsmaterialien von den Firmen Sarstedt, Nümbrecht und Greiner Bio-One, Frickenhausen bezogen.

## 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Seelze
3-Methylcholanthrene	Merck, Darmstadt
ABsolute™ Sybr® Green	Thermo Scientific, USA
Aceton	Sigma-Aldrich, Munich
Agarose	Peqlab, Erlangen
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Curcumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO HYBRID-MAX®	Merck, Darmstadt
DNA Leiter 100bp	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTP (100 $\mu$ M)	Solis BioDyne, Estland
DSS (36.000 - 50.000 Da)	MP Biomedicals, Eschwege
DTT (100 $\mu$ M)	Promega, USA
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
EGTA	Carl Roth, Karlsruhe
Einbettmedium für Gewebe-Gefrierschnitte	Jung/ Leica Microsystems, Wetzlar
Ethanol	Sigma-Aldrich, Munich
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
FICZ	Abcam, Cambridge, UK
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Imject® Alum	Thermo Scientific, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin

Chemikalie	Hersteller
Mausserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe
MyTaq HS Red Polymerase Mix	Bioline, Luckenwalde
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	Thermo Scientific, USA
Olivenöl (hoch raffiniert)	Carl Roth, Karlsruhe
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS Pulver	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
PFA	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Roche, Mannheim
Quercetin	Honeywell Riedel-de Haen, Seelze
Rattenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reaction Buffer for RT (5x)	Thermo Scientific, USA
Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, USA
RNAlater™	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Thermo Scientific, USA
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sybr®Safe DNA Gel stain	Life Technologies, Darmstadt
TAE-Puffer (TrisHCl-Acetat-EDTA), ultrapure	Life Technologies, Darmstadt
TMB Plus Substrat	Kem-En-Tec, Biotrend, Köln
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich, Seelze
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Vectashield Hard-Set Einbettmedium mit DAPI	Vector Laboratories, USA

Sofern nicht speziell angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck, Darmstadt, Carl Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen verwendet.

## 3.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 1: Selbst hergestellte Lösungen und Puffer.

Puffer	Lösungsmittel	Zusätze
Blockierungspuffer (Immunhistologie)	PBS	1 % FCS 1 % Mausserum 1 % Rattenserum
FACS-Puffer (Durchflusszytometrie)	PBS	0,5 % BSA 0,2 mM EDTA
Lysepuffer (Genotypisierung)	A. dest.	10 mM Tris-HCl, pH 8,5 5 mM EDTA, pH 8,0 0,2 % SDS 200 mM NaCl 0,1 mg/ml Proteinase K
TE-Puffer (Genotypisierung)	A. dest.	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
Waschpuffer (ELISA)	PBS	0,05 % Tween® 20
Permeabilisationspuffer		0,5 % Saponin 0,5 % BSA
LPL Isolierungspuffer I	PBS	3 mM EDTA
LPL Isolierungspuffer II	RPMI	1 % FCS 19 mg EGTA 0,15 % 1M MgCl <sub>2</sub>
LPL Isolierungspuffer IIIa	RPMI	25 % FCS 100 U/ml Kollagenase VIII
LPL Isolierungspuffer IIIb	RPMI	25 % FCS 0,5 mg/ml Kollagenase D 0,5 mg/ml DNase I
IEL Isolierungspuffer	PBS	10 % FCS 15 mM HEPES 5 mM EDTA
Mowiol/DABCO	A. dest.	2.4 g Mowiol 6 g Glycerol 2.5 % DABCO

## 3.1.5 Antikörper für Durchflusszytometrie

Tab. 2: Antikörper für Durchflusszytometrie.

Antikörper gegen	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3ε	PE; APC; PE/Cy7; APC/Cy7	145-2C11	1:200	BioLegend
CD4	FITC; PE; PerCP; APC; PE/Cy7; APC/Cy7	RM4-5	1:200	BioLegend
CD5	APC	53-7.3	1:100	eBioscience
CD8a	PerCP	53-6.7	1:100	BD Biosciences
CD8b	PE	YTS156.7.7	1:200	BioLegend
CD11c	APC; APC/Cy7	N418	1:200	BioLegend
CD11b	PE/Cy7	M1/70	1:100	eBioscience
CD19	PerCP	6D5	1:100	BioLegend
CD25	PE	PC61	1:100	BD Biosciences
CD25	APC; PE/Cy7; APC/Cy7	PC61	1:100	BioLegend
CD86	PE/Cy7	GL-1	1:100	BioLegend
F4/80	PE; APC	BM8	1:200	eBioscience
NKp46	PE; PE/Cy7	29A1.4	1:100	eBioscience
MHCII	PE; APC; PE/Cy7	M5/114.15.2	1:2000	BioLegend
MHCII	PerCP	M5/114.15.2	1:200	BioLegend
CCR6	PE	29-2L17	1:100	BioLegend
TCR γ/δ	APC	GL3	1:100	BioLegend
B220	APC/CY7	RA3-6B2	1:100	BioLegend
FoxP3	PE	FJK-16s	1:50	eBioscience
RORγt	APC	AFKJ-9	1:50	eBioscience
IgG2a	PE	eBR2a	1:50	eBioscience
IgG2a	APC	eBR2a	1:50	eBioscience
IgM	PE	R6-60.2	1:100	BD Biosciences
GFP	Purified	Polyklonal (Kaninchen IgG)	1:500	Life Technologies
Kaninchen-Ig	Alexa 488	Polyklonal (Ziegen-IgG)	1:500	Life Technologies
TruStain (CD16/CD32)	Purified	93	1:100	BioLegend

BioLegend – USA, San Diego; BD Biosciences - Heidelberg; Bioscience - Frankfurt am Main; Life Technologies – Darmstadt



### 3.1.6 Primärantikörper für Histologie

Tab. 3: Primärantikörper für Histologie.

Antikörper gegen	Konjugat	Klon	Verd.*	Hersteller
B220	Purified	RA3-6B2	1:100	eBioscience
EpCAM	Purified	G8.8	1:200	BD Bioscience
F4/80	APC	BM8	1:100	eBioscience
F4/80	Biotin	BM8	1:100	BioLegend
GFP	Purified	Polyklonal (Kaninchen IgG)	1:500	Life Technologies
IgA	Purified	C10-3	1:100	BD Bioscience
IgG2b	Biotin	eB149/10H5	1:100	eBioscience
MHCII	APC	M5/114.15.2	1:100	BioLegend

\* Verdünnung

### 3.1.7 Sekundärantikörper für Histologie

Tab. 4: Sekundärantikörper für Histologie.

Spezifität	Konjugat	Klon	Verd.*	Hersteller
Kaninchen-Ig	Alexa 488	Polyklonal (Ziegen-IgG)	1:500	Life Technologies
Ratten-Ig	Alexa 594	Polyklonal (Esel-IgG)	1:100	Life Technologies
Biotin	Alexa 594	(Streptavidin)	1:200	Life Technologies

\* Verdünnung

### 3.1.8 Medium

Medium	Zusätze
RPMI 1640 Medium	50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol 0,5% Penicilin-Streptomycin 1% L-Glutamin 10% FCS

### 3.1.9 Zellkulturstimuli

Stimuli	Hersteller
Anti-CD40 pur (3/23)	BD Pharmingen
F(ab') <sub>2</sub> Anti-Mouse IgM, u chain specific Functional Grade Purified	eBioscience
LPS E. coli 0111.B4	Sigma-Aldrich

### 3.1.10 Kits

Kit	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, USA/Burlingame
ELISA DuoSet development kits: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-22	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IgA Ready-Set-Go!	eBioscience
QIAamp <sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit	Qiagen

\*alle verwendete ELISA-Kits sind gegen murine Proteine gerichtet

### 3.1.11 Primersequenzen für RT-PCR

Gen	Primersequenz
$\beta$ -Aktin	Fwd: CTAAGGCCAACCGTGAAAAG Rev: ACCAGAGGCATACAGGGACA
AhRR (Exon3-4)	Fwd: GGGTAAAGAGCTTCTTCCAAG Rev: ACGGGGAACCCTCTGTATG
EGFP	Fwd: AAGGGCGAGGAGCTTCAC Rev: TTGTGCCCCAGGATGTTGCC

**3.1.12 Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Proteinase K	Roche, Mannheim
Kollagenase D	Roche, Mannheim
Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Roche, Mannheim

**3.1.13 Computerprogramme**

<b>Programme</b>	<b>Hersteller</b>
Argus X1	Biostep, Jahnsdorf
AxioVision Rel 4.8	Carl Zeiss, Jena
BZ-II Viewer/ Analyzer	Keyence, Essen
FlowJo 7.5	TreeStar, USA/Oregon
Gen5	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
MS Office Paket 2010	Microsoft, USA/Redmond
Prism 6®	GraphPad, USA/California
NanoDrop 1000 V3.8.1	Peqlab, Erlangen
Citavi	Citavi, Schweiz/Wädenswil

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Experimente wurden Mäuse im Alter von 6-16 Wochen verwendet, die unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen im Tierhaus des IUF an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und des LIMES Instituts an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gehalten wurden. Hierbei handelte es sich um die in unserer Arbeitsgruppe generierten AhRR-Reporter und -Knockout Mäuse, die 9 Generationen auf den C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt waren. Es wurden heterozygote AhRR/EGFP (enhanced GFP)- Reporterermäuse ( $AhRR^{E/+}$ ), bei denen nur ein Allel durch die EGFP Kasette ersetzt wurde, und homozygote AhRR-defiziente- ( $AhRR^{E/E}$ ) Mäuse verwendet. Als WT Kontrollen wurden ausschließlich Wurfgeschwister benutzt. Alle Experimente wurden in Wahrung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt. Die Tiere wurden in Tecniplast GreenLine Käfigen (501 cm<sup>2</sup>) gehalten und hatten stets uneingeschränkten Zugang zu Trinkwasser und Futter (im IUF - ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest und im LIMES Institut - LasVendi Rod16, Soest). Die Luftfeuchtigkeit in den Räumlichkeiten betrug  $55 \pm 15\%$  bei einer Raumtemperatur von  $21 \pm 2$  °C. Durch künstliche Beleuchtung wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus erzeugt.

In den Experimenten, in denen der Einfluss von AhR-Liganden auf die AhRR-Expression untersucht wurde, wurden Mäuse mit einer AhR-Liganden-reduzierten (ALR) Diät gefüttert. Dafür wurde das Experimentalfutter EF R/M AIN 93G, das mit 25 kGy sterilisiert wurde, von der Firma Ssniff verwendet.

Für Versuche, in denen durch Applikation von DSS Colitis induziert wurde, wurden weibliche Tiere mit entsprechenden Genotypen im Alter von 8-12 Wochen und einem Körpergewicht von  $20 \pm 2$  g zusammengesetzt.

Für die Sequenzierungsanalyse der bakteriellen DNA im Darm wurden die weiblichen Tiere im Alter von 4-5 Wochen für weitere 4 Wochen einzeln in die Käfige gesetzt. Durch die Isolierung der Mäuse konnte die sogenannte Koprophagie, der Verzehr von Kot und somit von Darmbakterien anderer Mäuse, vermieden werden.

### 3.2.2 Verabreichung der AhR-Liganden

Um den Einfluss von AhR-Liganden auf die Expression des AhRR untersuchen zu können, wurden  $AhRR^{+/+}$ -,  $AhRR^{E/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse mit 3-MC (10 mg pro kg Körpergewicht), Curcumin und Quercetin (jeweils 250 mg pro kg Körpergewicht) peroral mit Hilfe einer Schlucksonde gefüttert. Die

analysierten Substanzen wurden in 50 µl DMSO gelöst, mit 200 µl Olivenöl gemischt und unmittelbar nach der Herstellung den Tieren verabreicht. Nach 16 Stunden wurde der Dünndarm, die PP und mLK für weitere Analysen entnommen. Die aus LP, mLK und PP isolierten Zellen konnten anschließend mit Antikörpern markiert und unter Anwendung der Durchflusszytometrie näher charakterisiert werden.

### **3.2.3 DSS-induzierte Colitis**

#### **3.2.3.1 Versuchsablauf**

Zur Induktion der Colitis wurde DSS in einer Konzentration von 3,5% oder 5% verwendet und den Versuchstieren für 4 bis 7 Tage oral über das Trinkwasser verabreicht. Das Wasser wurde in schwarzen Flasche, die kein UV-Licht durchlassen, gefüllt. Nach 4 Tagen wurden das DSS-Wasser erneuert. Anschließend folgte bei einigen Experimenten eine DSS-freie Beobachtungsperiode von 2 Tagen.

#### **3.2.3.2 Klinischer „Score“**

Während des Versuchs wurden die Tiere alle zwei Tage klinisch untersucht. Das Körpergewicht der Tiere wurde bestimmt und mit ihrem initialen Gewicht des ersten Versuchstages in Korrelation gesetzt. Die Daten wurden als prozentualer Anteil des Ausgangsgewichts ausgedrückt. Zusätzlich wurde an den gleichen Tagen eine Stuhluntersuchung bezüglich Konsistenz und okkultem Blut durchgeführt. Bei der Analyse der Stuhlbeschaffenheit wurde zwischen geformtem, breiigem und flüssigem Stuhl differenziert. Mit den frischgewonnenen Stuhlproben wurde anschließend ein Guajak-Test zur Untersuchung des okkulten Blutes (hemoCARE) durchgeführt. Dazu wurde eine kleine Menge des Stuhls auf ein mit Guajakharz imprägniertes Filterpapier gestrichen und einen Tag später mit 1-2 Tropfen einer Wasserstoffperoxid-Lösung für 30 Sekunden bis 2 Minuten beschichtet. Bei der Anwesenheit von Blut kam es aufgrund der Pseudoperoxidaseaktivität des Häm-Restes im Hämoglobin zur Blaufärbung des Teststreifens. Mit Hilfe der Peroxidase oxidiert das Wasserstoffperoxid Guajakonsäure im Guajakharz zu Guajakblau. Aus der Gesamtheit der erhobenen Daten der Körpergewichtsmessung, Stuhlbeschaffenheit und dem okkulten Blut entstand der Disease Activity Index (DAI), der auf Ausführungen von Cooper et al. (1993) zurückzuführen ist. Die genaue Zusammensetzung des DAI ist in Tab. 5 geschildert.

**Tab. 5: Disease Activity Index (DAI).**

Punktzahl	0	1	2	3	4
Gewichtverlust	0%	< 5%	5 -10%	10 -20%	> 20%
Stuhlbefchaffenheit	geformt		breiig		flüssig
Blut im Stuhl	negativer Guajak-Test		positiver Guajak-Test		sichtbare Blutung

Die einzelnen Punktzahlen der verschiedenen DAI wurden addiert und die Gesamtsumme durch 3 dividiert, so dass eine maximale Punktzahl von 4 möglich war.

### 3.2.3.3 Untersuchungen zur Permeabilität der Darmbarriere

Die Permeabilität der mukosalen Barriere des Colons wurde nach 4 Tagen der DSS-Behandlung untersucht. Um die Aufnahme von FITC-Dextran zu verbessern, wurde den Versuchsmäusen zuerst das Futter für vier Stunden entzogen. Zusätzlich wurden die Tiere in neue Käfige umgesetzt, so dass keine Futterreste mehr vorhanden waren. Hiernach wurde den Mäusen 60 mg pro 100 g Körpergewicht in PBS gelöstes FITC-Dextran mit Hilfe einer Schlucksonde per oral verabreicht. Um eine große Menge Blut nach weiteren vier Stunden für folgende Analysen zu entnehmen, wurden die behandelten Tiere mittels CO<sub>2</sub> getötet. Zur Gewinnung des Blutes wurde der Brustkorb unmittelbar nach der Tötung mit einer Schere geöffnet und die Aorta durchtrennt. Das in den Brustraum fließende Blut (0,4 - 0,6 ml) wurde mit einer Spritze aufgezogen und in ein Reaktionsgefäß ohne Koagulanzen überführt. Die Trennung des Serums von den koagulierten zellulären Blutbestandteilen erfolgte durch Inkubation des Blutes für mindestens 30 min bei RT und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm. Um die durch die Darmbarriere ins Blut penetrierten FITC-Dextran-Moleküle zu messen, wurden je 30 µl Serum in eine 96-well-Platte pipettiert. Die FITC Fluoreszenz konnte am Tecan Plattenphotometer bei einer Exzitationswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm gemessen werden.

### **3.2.4 Gewinnung und Aufbereitung des Gewebematerials**

#### **3.2.4.1 Präparation von Dünndarm und Colon**

Den Mäusen wurde nach Öffnung des Abdomens durch einen V-Schnitt der gesamte Dünndarm und das Colon entnommen und gründlich mit kaltem PBS mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer Schlucksonde gespült. Danach wurden die Organe auf Papiertüchern aufgespannt und das Fettgewebe vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Die PP (etwa 5-9 pro Dünndarm) wurden mit einer Schere ausgeschnitten, um eine Kontamination der Lamina propria Zellen mit den dort vorhandenen zahlreichen Lymphozyten zu vermeiden. Sowohl der Dünndarm als auch das Colon wurden zuerst longitudinal aufgeschnitten und anschließend in 1 cm große Stücke geschnitten. Die gewonnenen Darmstücke konnten somit für die Isolierung von Zellen aus der Lamina propria oder zur Isolierung von intraepithelialen Lymphozyten herangezogen werden.

#### **3.2.4.2 Isolierung von Zellen aus der Lamina propria**

Die 1 cm großen, zuvor präparierten Darmstücke wurden unmittelbar nach der Bearbeitung in 60 ml Lösung I - PBS mit 3 mM EDTA - in ein 80 ml Becherglas überführt (siehe 3.1.4). EDTA wurde zugefügt um  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen, die für die Zell-Zelladhäsion wichtig sind, abzufangen und damit verbleibende Epithelzellen von der Basalmembran zu lösen. Alle benutzten Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt. Die Darmstücke wurden zweimal für 10 min in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C auf einem Magnetrührer mit einer Geschwindigkeit von 220 rpm gerührt. Danach folgten zwei weitere Inkubationen für je 15 min in 15 ml Lösung II mit 15 ml RPMI/FCS/EGTA/MgCl<sub>2</sub> (siehe 3.1.4). Am Ende jeder Inkubation wurden die Lösungen vorsichtig abgegossen und verworfen. Nach dem letzten Rühren wurde das Medium mit den Darmstücken nicht dekantiert sondern durch ein 100 nm Zellsieb filtriert. Schließlich wurden die Gewebestücke in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Lösung II - 1% FCS, 19 mg EGTA, 0,15% 1m MgCl<sub>2</sub> in RPMI Medium - platziert und 30 s kräftig auf einem Vortexer geschüttelt. Nach anschließender Filtration wurden die Darmstücke mit PBS gespült, um die Inaktivierung der Kollagenase durch Chelatbildner wie EDTA oder EGTA zu verhindern. Die Darmstücke wurden im Anschluss auf einer Wägeschale ca. 1 min lang mit einer Schere mechanisch zerkleinert, so dass sie nach Überführen in das Becherglas für den eigentlichen Verdau vorbereitet waren. Zum Verdau wurde meistens Lösung IIIa mit Kollagenase VIII benutzt. Da es jedoch eine wochenlange Lieferungsverzögerung bei der Kollagenase VIII von Sigma gab, wurde in manchen Experimenten Kollagenase D und DNase I von Roche genutzt. Die beiden Kollagenasen wurden

hauptsächlich dazu verwandt, die extrazelluläre Matrix zu zersetzen. Die DNase I hingegen wurde genutzt, um freigesetzte DNA zu spalten. Nach 90 min Kollagenaseverdau wurden die isolierten Zellen durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und anschließend 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Vitalität und Anzahl der isolierten Zellen mit Trypanblau-Färbung am Mikroskop bestimmt.

#### **3.2.4.3 Isolierung von intraepithelialen Lymphozyten**

Um die Epithelzellen von der Basalmembran zu lösen, wurden die 1 cm großen, zuvor präparierten Darmstücke in 25 ml 5mM EDTA/FCS/HEPES (siehe 3.1.4) Lösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde dann senkrecht in einem Inkubationsschüttler fixiert und bei 37 °C mit 70 rpm für 45 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung mit den Darmstücken durch ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße filtriert und der Durchfluß für weitere Analysen verwendet.

#### **3.2.4.4 Isolierung von Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und Peyerschen Plaques**

Die mLK, die sich hauptsächlich am ileocecalen Übergang befinden und nebeneinander liegen, wurden im Gewebsverbund entnommen und zunächst mechanisch aus dem umgebenden Fettgewebe frei präpariert. Die PP sind makroskopisch als helle, körnige Strukturen an der Wand des Dünndarms einfach zu erkennen. Sie wurden mit einer Schere möglichst flach aus dem Darm herausgeschnitten und in PBS bis zur Aufarbeitung aufbewahrt. Im Folgenden wurden die mLK und PP in eine 48-well-Platte mit kaltem PBS überführt und mit der Rückseite des Stempels einer 1 ml Spritze zerdrückt und durch ein 100 µm Zellsieb gepresst. Im Anschluss wurden die Zellen bei 1200 rpm 8 min abzentrifugiert und in einem definierten Volumen FACS-Puffer mittels Trypanblau-Färbung gezählt.

#### **3.2.4.5 Gewinnung von B-Zellen aus der Peritoneallavage**

Zur Gewinnung der peritonealen B-Zellen wurde zunächst nur die Bauchdecke entlang der Linea alba vorsichtig geöffnet. Mit Hilfe einer 10 ml Spritze und 0,90 mm Kanüle wurde 10 ml kaltes steriles PBS in die Bauchhöhle injiziert und anschließend langsam ohne Verletzung des Darms wieder abgezogen. Nach 8 min Zentrifugieren bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen, die Zellen gezählt und in RPMI-Kulturmedium aufgenommen. Im Durchschnitt wurden etwa  $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Maus gewonnen.



### 3.2.4.6 Gewinnung von Stuhlproben für Antikörperbestimmung

Pro Maus wurden 2-5 Kotproben in einem 2 ml Reaktionsgefäß eingesammelt und wegen des unterschiedlichen Wassergehalts für 7 Tage bei 4 °C mit offenem Deckel, abgedeckt mit einem Papiertuch getrocknet. Je 100 mg Stuhl wurde 1 ml 0,01% NaN<sub>3</sub> in PBS zugegeben und 4 Stunden bei 30 °C und 1400 min<sup>-1</sup> im Schüttler gelöst. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5000 rpm. Der Überstand wurde bis zur Durchführung des IgA ELISA bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Vital-Färbung

Die Trypanblau-Färbung beruht auf der Tatsache, dass lebendige Zellen über eine intakte Zellmembran verfügen, die für Trypanblau undurchlässig ist. Ist die Zellmembran jedoch geschädigt, dringt der Farbstoff in das Zytoplasma ein und markiert somit die toten Zellen blau. Lebende Zellen schließen dagegen den sauren Farbstoff aus und erscheinen unter dem Mikroskop weiß vor einem blauen Hintergrund.

Um die Vitalität und Zellzahl zu ermitteln, wurden die Zellen abzentrifugiert, in einem bestimmten Volumen FACS-Puffer bzw. Medium aufgenommen und in einer 96-well-Platte 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Da Trypanblau nach längerer Zeit zytotoxisch für die Zellen ist, wurden 10 µl dieser Lösung sofort in eine Neubauer-Zählkammer mit markierten Quadraten eingebracht. Es wurden mindestens 2 Großquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Anzahl der Zellen pro ml mit folgender Formel ausgerechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = (\text{Gesamtzellzahl}/\text{Anzahl gezählter Quadrate}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

(Kammerfaktor)

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl pro ml} \times \text{Ausgangsvolumen der Zellsuspension.}$$

### 3.2.6 Durchflusszytometrie

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) genannt, dazu verwendet, die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Antigenen der isolierten Zellen zu erfassen. Diese Charakterisierung von Einzelzellen in Suspension basiert auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften und erfolgt, indem die Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom durch eine feine Kapillare an einem Laser vorbeigeführt werden. Die Quantität des gestreuten Lichts ist dabei vom Volumen und der Granularität der Zelle abhängig. Die Vorwärts-Lichtstreuung (*Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen

Winkel und korreliert mit der Zellgröße. Die seitliche Lichtstreuung (*Side Scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im 90°-Winkel, die der Granularität bzw. dem Plasma/Kern Verhältnis der Zelle entspricht. Diese zwei physikalischen Phänomene ermöglichen es, Lymphozyten (geringes Volumen, hoher Kernanteil) von Granulozyten (Granularität, großes Volumen, hohe Plasma/Kern Relation) und Monozyten (dazwischenliegende Eigenschaften) abzugrenzen.

Weitere Informationen über zelluläre Parameter können aus zuvor durchgeführten Färbungen mit Antikörpern gewonnen werden. Für Immunzellen sind mittlerweile mehrere hundert Marker bekannt, die unterschiedliche Subpopulationen charakterisieren. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte monoklonale und polyklonale Antikörper, die kommerziell erhältlich sind, erkennen und markieren diese spezifischen Strukturen auf den Zellen. Die Fluorochrome werden bei der Passage der Zellen durch das Laserlicht angeregt, wodurch das Fluoreszenzlicht emittiert wird. Die Fluoreszenz-Eigenschaften der Zellsuspension werden mit Hilfe spezieller Detektoren gemessen und bei der Auswertung der Daten mittels FlowJo 7.5 als *dot plot* oder Histogramm dargestellt.

### 3.2.6.1 Extrazelluläre Färbung

Für durchflusszytometrische Färbungen wurde die Einzelzellsuspension mit ca.  $0,5-1 \times 10^6$  *ex vivo* isolierten Zellen in FACS-Rörchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Für die Verdünnung der Antikörper sowie bei allen durchgeführten Waschschritten wurde FACS-Puffer verwendet. Um die Interaktionen der Fc-Region der zur Färbung verwendeten monoklonalen Antikörper mit Fc-Rezeptoren auf analysierten Zellen zu vermeiden, wurde das Zellpellet zunächst 10 min bei 4 °C im Dunkeln mit 50 µl  $\alpha$ -CD16/CD32 (Fc-Block) (2 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der zuvor vorbereiteten Antikörpermischung, die entsprechend der jeweiligen Zielzellen ausgewählt wurden, ohne Waschen zu den Proben gegeben und weiterhin für 20 min bei 4 °C inkubiert. Danach folgte zur Entfernung ungebundener Antikörper ein Waschschriff mit 2 ml FACS-Puffer und Zentrifugation für 8 min bei 1200 rpm. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur FACS-Analyse auf Eis gelagert.

Bei Anwendung biotinylierter Antikörper folgte noch ein zwanzigminütiger Inkubationsschritt bei 4 °C mit PerCP- oder APC-markiertem Streptavidin, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen ist und sehr spezifisch an Biotin bindet. Im Anschluss wurden die Zellen erneut gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und wie oben beschrieben im Durchflusszytometer analysiert.

Falls die Messung erst am nächsten Tag stattfand, wurden die Zellen in 100 µl 2% PFA in PBS (verursacht Quervernetzung von Proteinen) aufgenommen, um die Zellen zu fixieren.

### **3.2.6.2 Intrazelluläre Färbung**

Damit die extrazelluläre Färbung und die Fluoreszenz in den weiteren Arbeitsschritten erhalten blieben, wurden die auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörper mit 2% PFA bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 min fixiert und anschließend bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Um ein Eindringen von FoxP3- und ROR $\gamma$ t-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern ins Zytoplasma der Zelle zu gewährleisten, wurde die Zellmembran zunächst mit 150  $\mu$ l 0,5% Saponin/0,5% BSA in PBS für 10 min permeabilisiert. Saponin sollte bei allen Färbe- und Waschschritten der intrazellulären Färbung anwesend sein, da die Permeabilisierung der Zellwand in Abwesenheit dieses Detergenz reversibel ist. Nach erneutem Waschen mit Saponinlösung konnten die Antikörper gegen die Transkriptionsfaktoren wie FoxP3 oder ROR $\gamma$ t zu den permeabilisierten Zellen gegeben werden. Da in den meisten Fällen EGFP-positive Zellen analysiert wurden, dieses jedoch bei der Permeabilisierung mit Saponin ausläuft, wurde zu den intrazellulären Antikörpern zusätzlich ein polyklonaler Kaninchen  $\alpha$ -Maus GFP Purified Antikörper (1:1000) hinzugefügt. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 2 ml Saponinlösung gewaschen und für 45 min mit einem polyklonalen Ziege  $\alpha$ -Kaninchen Alexa488 gekoppeltem Antikörper (1:500) inkubiert. Danach folgten weitere Waschschriffe zum einen mit Saponinlösung und danach mit 0,5% BSA in PBS ohne Saponin. Anschließend wurden die Zellen in 100  $\mu$ l 0,5% BSA in PBS Puffer resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert.

Um antigenunspezifische Bindungen von den spezifischen zu unterscheiden, wurden zusätzlich Färbungen mit Antikörpern des gleichen Isotyps aber irrelevanter Spezifität durchgeführt. Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden an Stelle von anti-FoxP3 bzw. anti-ROR $\gamma$ t Antikörpern in gleicher Konzentration in der Färbung eingesetzt.

### **3.2.7 Kultivierung von Zellen**

#### **3.2.7.1 Kultur von Zellen aus mesenterialen Lymphknoten**

Die Zellen aus den mLK wurden, wie bereits im Abschnitt 3.3.5.4 beschrieben, isoliert und in RPMI-Kulturmedium resuspendiert. Da *ex vivo* isolierte T-Lymphozyten spontan keine Zytokine exprimieren, mussten die Zellen zuvor stimuliert werden. Hierfür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml in Kulturmedium aufgenommen und in einem Endvolumen von 250  $\mu$ l in einer 96-well-Platte mit flachem Boden mit 1  $\mu$ g/ml LPS bzw. jeweils 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28 Antikörpern stimuliert.

Die Kultivierung und Stimulierung lebender Zellen erfolgte 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90%. Nach der Inkubation wurden die Zellen in der 96-*well*-Platte 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert, die Überstände mit den freigesetzten Zytokinen vorsichtig abgenommen und bei -20 °C bis zur Durchführung des ELISA aufbewahrt.

### **3.2.7.2 Kultur von Zellen aus der Peritoneallavage**

$5 \times 10^5$  der aus dem Peritoneum gewonnenen Zellen wurden in 0,5 ml RPMI-Kulturmedium in einer 24-*well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit nur 10 µg/ml anti-IgM Antikörper oder mit 10 µg/ml anti-IgM und 1 µg/ml anti-CD40 Antikörpern für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90% stimuliert. Die unstimulierte Kontrolle und die aktivierten B-Zellen wurden nach der Kultur mit FACS Antikörpern gefärbt und mit Hilfe von FACS analysiert.

### **3.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

Bei einem ELISA handelt es sich um die Durchführung einer Immunreaktion an einer Festphase, wobei ein Antigen nicht nur nachgewiesen sondern auch quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit wurde zur spezifischen Quantifizierung der während der Zellstimulation freigesetzten Zytokine ein so genannter *Sandwich*-ELISA verwendet. Dabei wurde die *half area* ELISA-Mikrotiterplatte mit einem in PBS gelöstem „Fang-Antikörper“ (*capture antibody*) beschichtet. Bei diesem Schritt adsorbieren die Proteine durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen bei 4 °C über Nacht an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte. Anschließend wurde die Platte 3x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Bei dem zunächst folgenden 60 minütigem Inkubationsschritt mit 1% BSA in PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Nach 3x Waschen wurden unverdünnte Zellkulturüberstände sowie eine siebenstufige Standardreihe bekannter Konzentration in 1% BSA in PBS gelöst und mit einer Negativkontrolle in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Inkubation dauerte entweder 2 h bei RT oder wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. An der Platte fixierte Primärantikörper konnten somit ihre spezifischen Antigene binden. Danach wurden ungebundene Antigene durch sechsmaliges Waschen entfernt. Der in der Folge zugegebene biotinylierte Sekundärantikörper, auch Detektionsantikörper genannt, konnte das durch den Primärantikörper immobilisierte Protein erkennen und binden. Nach erneutem Auswaschen überschüssiger Antikörper wurde eine Streptavidin gekoppelte Meerrettich Peroxidase zugeführt und 20-30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. In dem eigentlichen Detektionsschritt setzt die Peroxidase das nach dem Waschen zugegebene Farbsubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) im Dunkeln in den blauen Farbstoff

Cyanin um. Nachdem die Auftrennung der Standardreihe gut sichtbar war, wurde durch eine drastische pH-Wert Senkung durch Hinzufügen von 2-molarer Schwefelsäure die Reaktion abgestoppt. Dies führte zum Farbumschlag nach gelb. Aus der photometrisch ermittelten Extinktion (Testfilter 450 nm, Referenzfilter 570 nm) konnte anhand der Standardkurve, nach Normalisierung gegen die mitgeführte Negativkontrolle, die Konzentration der zu bestimmenden Zytokine mittels des Gen5 Programms kalkuliert werden.

### **3.2.8.1 IgA ELISA**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Ermittlung der IgA-Spiegel im Blut und Stuhl von Mäusen der *Mouse IgA Ready-SET-Go!*<sup>®</sup> Kit von eBioscience verwendet. Die Durchführung erfolgte mit den Reagenzien und exakt nach dem Protokoll des IgA ELISA Kits, wobei die aufgetragenen Serumproben 1:1000 und die Stuhlproben 1:2 verdünnt worden sind.

## **3.2.9 Sequenzierungsanalysen von intestinalen Mikrobiota**

### **3.2.9.1 Isolierung der DNA aus dem Darminhalt**

Für die Sequenzierungsanalyse wurde die DNA aus Bakterien des Dünndarms und Colons mit dem *QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool* Kit isoliert. Zuerst wurde der Inhalt vom Dünndarm/Colon mit Hilfe einer Pinzette sorgfältig ausgedrückt und zusätzlich mit einem Skalpell in einem Wägeschälchen nach der Zugabe von 0,7 ml ASL Puffer gut zerkleinert. Weitere 0,7 ml ASL wurden beim Ausspülen des Wägeschälchens zugegeben. Nach dem Vortexen wurde die so homogenisierte Probe für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Homogenate erneut gevortext und 1 min abzentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT und 14.000 rpm. 1,2 ml des Überstands wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und nach Zugabe von einer InhibitEX Tablette (adsorbiert Komponenten, die zu DNA Degradierung führen können) 1 min inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und wiederholt zentrifugiert. In ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 15 µl Proteinase K, 200 µl Überstand und zum Schluss 200 µl AL Puffer gegeben. Nach kurzem Vortexen kommt ein 10 minütiger Inkubationsschritt bei 70 °C, bei dem die Proteine verdaut werden. Zum Lysat wurden 200 µl Ethanol (99,8%) zugegeben und die ganze Mischung wurde vorsichtig auf eine QIAamp Kolumne mit einem Sammelröhrchen pipettiert. Das Waschen ist in zwei Schritten erfolgt. Bei dem Ersten wurde für eine Minute mit 500 µl AW1 Puffer

und bei dem Zweiten mit der gleichen Menge von AW2 Puffer 3 min lang zentrifugiert. Die QIAamp Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 µl AE Puffer befüllt. Die DNA wurde nach 5 min Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation eluiert.

### 3.2.9.2 Sequenzierungsanalyse

*Next Generation Sequencing* (NGS) ist ein modernes Hochdurchsatzverfahren zur DNA-Sequenzierung, das eine exakte Quantifizierung in der Gesamtprobe erlaubt und die DNA schneller, umfangreicher und günstiger sequenzieren lässt als die Methode von Sanger. Bei der Sequenzierung mit Hilfe der Ion Torrent *Personal Genome Machine* (PGM) wird die zu sequenzierende DNA in Mikroreaktionskammern mit Polymerase auf einem Halbleiterchip immobilisiert und verschiedenen Nucleotide werden kontrolliert zu der Reaktion zugegeben. Nach dem Einbau eines komplementären Nucleotids in den neusynthetisierten DNA-Strang werden jeweils ein Pyrophosphat und ein positiv geladenes Wasserstoffion freigesetzt. Das freie Wasserstoffion führt zu einer Änderung des pH-Wertes, wobei das detektierte pH-Signal proportional zur Menge der eingebauten Nucleotide ist.

Die Sequenzierung der 16 rDNA Gene wurde von Tetsushi Mori aus der Arbeitsgruppe von H. Takeyama an der WASEDA Universität in Tokyo durchgeführt. Zur Untersuchung der intestinalen Mikrobiota wurden 16S rDNA Gene aus zuvor isolierter metagenomischer DNA mit Hilfe von PCR und den universalen Eubacteria 16S rDNA Primern: 27F (5'-AKWGTTTGATCMTGGCTCAG) und 338R (5'-CTGCWGCCWYCCGTAGRWGT) amplifiziert. Die Primer waren mit zufällig ausgewählten Ion Xpress™ kodierten Adaptersequenzen konjugiert. Die PCR Reaktion wurde basierend auf dem Protokoll für *PrimeSTAR Max DNA Polymerase* (TakaraBio, Shiga, Japan) mit 25 Zyklen und der Anlagerungstemperatur von 47°C durchgeführt. Die anschließende Vorbereitung der Proben komplementären (Life Technologies Inc., Tokyo, Japan). Die Qualität und Konzentration der Proben wurde mittels 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) ermittelt.

Bei der Analyse der Sequenzierungsergebnisse wurden die gewonnenen Daten zuerst nach dem Protokoll von Kim et al. (143) verarbeitet. Dabei wurden die Sequenzen schlechter Qualität (Durchschnittsqualität <25) eliminiert. Die Taxonomie der erhaltenen Ergebnisse wurde mit Hilfe des RDP Klassifikators angeordnet (144). Alle Sequenzen wurden bis 300 bp verkürzt und in *operational taxonomic units* (OTUs) mit 97% Identität mittels UPARSE gruppiert (145). Um die Unterschiede der Mikrobiota des Darms zwischen verschiedenen Mäusen zu erfassen wurde eine *weighted unifrac* Analyse basierend auf OTU Informationen mit Hilfe von FastUnifrac verwendet (146). Die bioinformatische Analyse der Sequenzierungsexperimente erfolgte durch Toru Maruyama, WASEDA Universität, Tokyo.

### 3.2.10 RT-PCR

#### 3.2.10.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Leber, Lunge, Haut, Dünndarm, mLK und PP wurde das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet und gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Direkt nach der Entnahme wurden die Gewebestücke in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff rasch eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Alternativ wurden die Gewebeproben mittels RNALater® (Qiagen) konserviert. Dieses Stabilisierungsreagenz durchdringt das Gewebe per Diffusion und inaktiviert die zellulären RNasen, so dass die Proben dauerhaft bei -20 °C gelagert werden können. Im ersten Schritt der RNA-Isolierung wurden 30-50 mg Gewebe in einem Gemisch aus 600 µl RLT-Puffer und 6 µl β-Mercaptoethanol in einem Kryoröhrchen mit Glasperlen mittels des Homogenisator Precelly's® 2x für 15 s bei 6.400 rpm homogenisiert. Um das lysierte Gewebe von Zellresten und -fragmenten zu befreien, folgte eine 3 minütige Zentrifugation bei maximaler Drehzahl (14.000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im 1:1 Verhältnis mit 99,8% EtOH gemischt. Das EtOH-Lysat wurde 2x hintereinander auf eine RNeasy Mini Column® aufgetragen und jeweils 15 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Durchflussvolumen wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Die im Lysat enthaltene RNA war nun an die Membran im Inneren der Säule gebunden. Anschließend wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert, um nach erneuter Zentrifugation die Kontaminationen, vor allem DNA und Proteine effektiv auszuwaschen.

Um eventuellen Verunreinigungen der RNA-Probe durch unspezifische genomische DNA entgegenzuwirken, wurde optional ein DNA-Verdau angesetzt. Hierbei wurde zuerst die in Pulverform vorhandene DNase I in 550 µl RNase-freiem Wasser vorsichtig aufgelöst. 80 µl DNase Lösung (10 µl der DNase I Stock Solution und 70 µl RDD Puffer aus dem RNeasy Mini Kit) wurden direkt auf die Silica-Gel-Membran der Säule aufgetragen und für 15 min bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1 Waschpuffer für 15 Sekunden bei 12 000 rpm zentrifugiert, das Durchflussvolumen entsorgt und das Sammelgefäß erneuert. Anschließend wurde die Säule 2x (15 s und 2 min) mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen.

Die an die Membran gebundene, aufgereinigte RNA konnte schließlich mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch 1 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert werden. Die Gesamt-RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.2.10.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Die gewonnene Menge an Gesamt-RNA konnte mittels Messung der Absorption bei 260 nm am NanoDrop Spektrophotometer erfasst werden. Da eine OD bei 260 nm von 1 dabei 40 µg/ml RNA entspricht, lässt sich die RNA-Konzentration mit einer Formel berechnen (RNA-Konzentration [µg/ml] =  $OD_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ ). Das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt und das von Nukleinsäuren bei 260 nm. Somit konnte die Reinheit der Nukleinsäuren durch den Quotienten der 260 nm und 280 nm Werte bestimmt werden, wobei dieses Verhältnis bei reinen Nukleinsäurelösungen einen Wert > 1,8 erreichen sollte. Für die Messung wurde 1 µl eluierter RNA-Lösung direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Die gemessenen Spektren, Absorptionswerte und Konzentrationen wurden anschließend mit Hilfe der NanoDrop 1000 V3.8.1 Software dargestellt und bei der cDNA-Synthese berücksichtigt.

### 3.2.10.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde 1 µg der isolierten Gesamt-RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurde die RNA-Lösung mit RNase-freiem Wasser verdünnt und zusammen mit 2 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> auf ein Ausgangsvolumen von 13 µl gebracht. Zum Schmelzen der Sekundärstruktur der RNA und für die Primerbindung wurde die verdünnte RNA für 10 min bei 70 °C im Thermocycler denaturiert. Danach wurden die Proben direkt auf Eis gestellt, um eine spontane Rückfaltung der Nukleinsäuren zu unterbinden. Die für die eigentliche cDNA-Synthese benötigten Komponenten und deren Konzentrationen sind in Tab. 6 aufgelistet.

**Tab. 6: PCR-Ansatz für die cDNA Synthese.**

	<b>für 1 Ansatz</b>
DECP-Wasser	9,4 µl
5x RT-Puffer	8,0 µl
dNTP (10mM)	4,0 µl
DTT (100 mM)	4,0 µl
RNAse Out (40U/µl)	0,8 µl
RT (200U/µl)	0,8 µl
<b>GESAMT:</b>	<b>27,0 µl</b>



Die in den Reaktionen als Enzym verwendete Reverse Transkriptase (RT) stellt funktionell eine RNA-abhängige DNA-Polymerase dar, die aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) gewonnen wird.

Das Umschreiben erfolgte für 1 Stunde bei 40 °C und wurde durch eine 5 minütige Inaktivierung der RT bei 95 °C beendet. Die somit erhaltene synthetisierte cDNA wurde bis zur RT-PCR Analyse bei -80 °C gelagert.

#### 3.2.10.4 Kontrolle der synthetisierten cDNA

Um festzustellen, ob die cDNA-Synthese erfolgreich abgelaufen ist und die Sequenzen in einer RT-PCR Reaktion weiter analysiert werden können, wurde eine RPS6 (Ribosomales Protein 6) PCR mit den Proben durchgeführt. RPS6 ist ein konstitutiv exprimiertes Gen. Über eine PCR mit spezifischen RPS6-Primern lassen sich auf Grund der Bandenstärke die DNA-Mengen vergleichen. Die PCR wurde in einem Thermocycler mit in Tab. 7 dargestelltem Protokoll durchgeführt.

**Tab. 7: Allgemeine Schritte der RPS6 PCR.**

	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
1x	5 min	95 °C
35x	60 s	95 °C
	60 s	55 °C
	60 s	72 °C
1x	10 min	72 °C

#### 3.2.10.5 RT-PCR Ablauf

Die *Real Time*-PCR (RT-PCR) basiert wie die klassische PCR Reaktion auf dem Prinzip der exponentiellen DNA Vervielfältigung. Während bei der klassischen PCR der Schritt der gelelektrophoretischen Auftrennung zur Auswertung der Produkte folgt, wird bei der RT-PCR die Entstehung des Produktes anhand von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit gemessen.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde der unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* für die Detektion des Fluoreszenzsignals genutzt. *SYBR Green* sendet erst nach erfolgter Interkalierung ein spezifisches Fluoreszenzsignal mit einer Wellenlänge von 530 nm aus, das mit Hilfe des RT-PCR Geräts CFX96™ von Biorad detektiert werden konnte. Das RT-PCR-

Gerät registriert mit einer Kamera die Intensität der durch *SYBR Green* hervorgerufenen Fluoreszenz, die mit fortschreitender Amplifikation der DNA zunimmt. Der PCR-Ansatz für die RT-PCR ist in Tab. 8 dargestellt.

**Tab. 8: PCR-Ansatz für die RT-PCR mit SYBR® Green.**

	<b>für 1 Ansatz</b>
SYBR® Green	7,5 µl
Primer fwd	0,2 µl
Primer rev	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	2,1 µl
<b>GESAMT:</b>	<b>10,0 µl</b>

Die Thermocyclerbedingungen wurden von der optimierten klassischen PCR abgeleitet und sind in Tab. 9 aufgeschrieben.

**Tab. 9: Allgemeine Schritte der RT-PCR.**

	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Inkubationstemperatur</b>
1x	15 min	95 °C
44x	20 s	95 °C
	40 s	60 °C
	60 s	72 °C

Um bei der Ergebnisauswertung der RT-PCR ausschließen zu können, dass keine unerwünschten DNA-Sequenzen während der PCR vervielfältigt worden sind, wurde am Ende des Laufs eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wurde die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam um 0,5 °C kontinuierlich von 65 °C auf 95 °C erhöht wurde. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der DNA Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird *SYBR Green* freigesetzt und eine Änderung der Fluoreszenz registriert. Somit war eine Unterscheidung doppelsträngiger DNA spezifischer PCR-Produkte mit einem höheren Schmelzpunkt von unspezifisch entstehenden Primerdimeren möglich.

Für die Normalisierung wurde als Haushaltsgen *β-Actin* unter der Annahme verwendet, dass es in den untersuchten Proben unabhängig von vorhergehenden Behandlungen in einer konstanten Menge exprimiert wird.

### 3.2.10.6 Berechnung

In den ersten RT-PCR Zyklen (ca. 3 - 15) wurde mit Hilfe der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert sog. *threshold* berechnet. Der  $C_T$  Wert gibt an, in welchem Zyklus der PCR die DNA-Menge für das jeweilige Gen oberhalb des *thresholds* detektierbar war. Durch Auswertung der in der exponentiellen Amplifikationsphase gemessenen  $C_T$ -Werte lässt sich die Startkopienzahl der untersuchten DNA-Sequenz quantifizieren. Je mehr DNA am Beginn der Reaktion vorhanden war, desto niedriger war der zu erwartende  $C_T$ -Wert. Nach der PCR Reaktion wurde der delta  $C_T$ -Wert aus der Differenz des  $C_T$ -Werts des zu testenden Transkripts und  $\beta$ -*Actin* gebildet. Weiterhin wurde die Differenz der errechneten Delta- $C_T$  Werte der unbehandelten und behandelten Probe zum delta-delta  $C_T$  Wert ermittelt. Zur Berechnung der x-fachen Induktion wurde der Delta-Delta  $C_T$  als negative Potenz zur Basis 2 verwendet. Die Auswertung erfolgte manuell über Microsoft Excel.

### 3.2.11 Histologie

#### 3.2.11.1 Fixierung von Gewebe und Anfertigung von Gefrierschnitten

Direkt nach der Entnahme wurden die Organe in 4% PFA bei RT für 3 bis 4 Stunden inkubiert. Hierdurch sollten Zellstrukturen fixiert, Mikroorganismen getötet und autolytische Prozesse unterbunden werden. Um das Gewebe zu entwässern und die Diffusion des EGFP-Moleküls aus den Zellen zu verhindern, wurden die Präparate danach in einem aufsteigenden Saccharose-Gradienten in 5% bzw. 10% Saccharose in PBS jeweils für eine Stunde bei RT und in 20% Saccharose über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Organe mit Hilfe eines Einbettmediums (Tissue Tek) luftblasenfrei in Plastikschälchen eingebettet und auf Trockeneis eingefroren.

Unter Verwendung eines Kryostats wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 7-10  $\mu$ m bei einer Verarbeitungstemperatur von etwa -18 °C hergestellt und durch elektrostatische Anziehung auf Adhäsions-Objekträger übertragen. Nach ca. 45-minütigem Lufttrocknen wurden die Präparate in eiskaltem Aceton für 10 min fixiert. Sowohl die im Einbettmedium gefrorenen Organe als auch die angefertigten Schnitte konnten bei -80 °C aufbewahrt und für histologische Färbungen verwendet werden.

### 3.2.11.2 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

Immunfluoreszenzfärbungen dienen dem Nachweis bestimmter Moleküle mit Hilfe spezifischer Antikörper. Diese Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen werden durch eine Markierung des entsprechenden Antikörpers sichtbar gemacht.

Zum Färben wurden die zuvor angefertigten Gewebeschnitte vollständig aufgetaut und mit einem wasserabweisenden Stift (ImmEdge Pen) umrahmt. Danach wurden die Präparate 5 min in PBS rehydriert, abgeklopft und in eine Feuchtkammer gelegt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Präparate zunächst mit 1% Mausserum, 1% Rattenserum und 1% FCS in PBS bzw. 1% BSA in PBS für 45-90 min bei RT blockiert. Bei Anwendung eines Biotin-gekoppelten Antikörpers wurde zusätzlich ein Biotin-Avidin-Blocking kit verwendet. Zuerst wurde das Gewebe mit 4 Tropfen Biotin-Lösung pro 1 ml 1% FCS in PBS für 15 min zur Blockierung benetzt. Anschließend wurde nach dem gleichen Ablauf mit der Avidin-Lösung verfahren.

Im Anschluss an jeden Inkubationsschritt erfolgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte für je 5 Minuten mit PBS. Der jeweilige Primärantikörper (Tab. 3) wurde in 1% FCS in PBS bzw. BSA in PBS in der Regel 1:100 verdünnt und 100 µl Lösung auf jeden Schnitt gegeben. Die Inkubation in der Feuchtkammer dauerte entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Der adäquate Sekundärantikörper, meistens anti-Kaninchen Alexa 488 (Ziege) oder anti-Ratte Alexa 594 (Esel) wurde entsprechend verdünnt (Tab. 4). Es wurden ebenfalls 100 µl der Antikörperlösung auf jeden Schnitt pipettiert und für weitere 2 h inkubiert.

Gleichzeitig wurde eine Kontrollfärbung mitgeführt, bei der entweder nur der Sekundärantikörper aufgetragen oder ein Primärantikörper durch einen unspezifischen Antikörper des gleichen Isotyps ersetzt wurde.

Schließlich wurden die Schnitte mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wird von Zellen sehr rasch aufgenommen und färbt somit mit hoher Spezifität die Zellkerne blau. Die Schnitte wurden mit 0,2 mg/ml DAPI in PBS für 10 min gegengefärbt und dann mit 30 µl Mowiol pro Schnitt beschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Alternativ konnten die Präparate mit einem aushärtenden DAPI-haltigen Einbettmedium (1 Tropfen pro Schnitt) eingedeckelt werden. Schließlich wurden die Objektträger zum Trocknen des Einbettmediums über Nacht bei 4 °C waagrecht gelagert. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 betrachtet und aufgenommen.

### 3.2.12 Statistik

Die Auswertung und das Erstellen von Diagrammen wurden unter Zuhilfenahme des Programms Prism 6<sup>®</sup> von GraphPad durchgeführt.

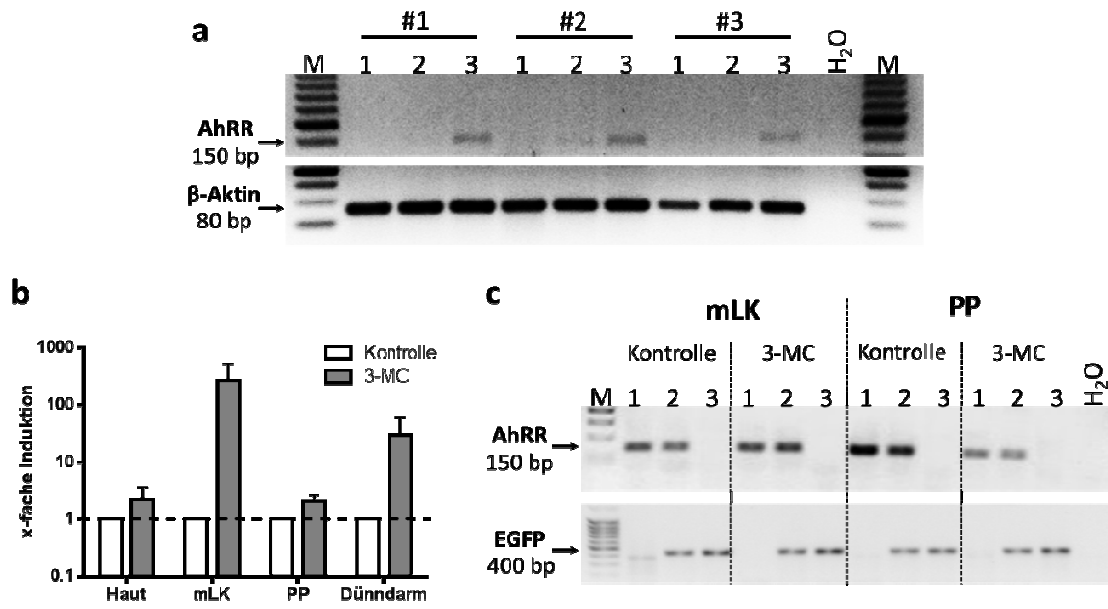
Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) oder als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Zur Bewertung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurde ein Student t-Test zur Berechnung der Signifikanz durchgeführt. Signifikante Unterschiede in den Ergebnissen wurden in den Grafiken mit dem Symbol \* dargestellt. Hierbei wurden verschiedene Signifikanzniveaus unterschieden: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## Ergebnisse

### 4.1 Expressionsanalyse des endogenen und des transgenen AhRR locus

Die in unserer Arbeitsgruppe generierten AhRR/EGFP Mäuse prägen grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein* - EGFP) unter der Kontrolle des *ahrr*-Promotors aus, so dass alle AhRR-positiven Zellen nach Anregung mit blauem Licht grün fluoreszieren. Zur Generierung dieser knock-in Mäusen wurde eine EGFP-Kassette in das zweite Exon des *ahrr*-Lokus integriert. Gleichzeitig wurde das dritte Exon deletiert, so dass die Expression einer verkürzten Form des AhRR verhindert wird (M. Korkowski, H. Weighardt und I. Förster; unveröffentlichte Daten). Mit Hilfe dieser Mauslinie kann die Anzahl und die Lokalisation von AhRR-positiven Zellen *in vivo* bestimmt werden. Außerdem ermöglicht die Analyse AhRR-defizienter Mäuse, Rückschlüsse auf die Funktion des AhRR zu ziehen. Vorexperimente unserer Arbeitsgruppe an AhRR/EGFP Mäusen zeigten, dass der AhRR hauptsächlich in Immunzellen, wie DC und Makrophagen in Haut, Dünndarm, PP und mLK exprimiert ist (H. Weighardt, O. Brandstätter und I. Förster; unveröffentlichte Daten). Um der Frage nachzugehen, ob die EGFP-Reporterexpression mit der Expression des endogenen *ahrr* korreliert, wurden Leber, Lunge und mLK aus unbehandelten WT C57BL/6J Mäusen entnommen und die daraus isolierte mRNA mittels RT-PCR analysiert. Wie in Abb. 7a ersichtlich, erscheint eine 150 Basenpaare große Bande bei Proben aus mLK in allen drei analysierten WT Mäusen. Die mRNA aus Leber und Lunge wies hingegen keine AhRR-Expression auf.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die endogene *ahrr* Expression durch AhR-Liganden induzierbar ist. Dafür wurden C57BL/6J Mäuse peroral mit 3-MC, einem starken, exogenen AhR-Ligand, behandelt. Um die Ausprägung der *ahrr* Expression nach 16 Stunden Belastung mit dem Xenobiotikum ermitteln zu können, wurden RT-PCR Analysen von Proben aus verschiedenen Organen durchgeführt. Die aus mLK isolierten Zellen zeigten mit etwa 250-facher Induktion den höchsten *ahrr* Spiegel nach der Behandlung mit 3-MC, gefolgt von Proben aus dem Dünndarm (Abb. 7b). Die AhRR-Expression in der Haut und in PP war nur leicht induzierbar. Zur weiteren Kontrolle wurden die amplifizierten PCR-Produkte des endogenen *ahrr* und des transgenen *egfp* gelelektrophoretisch dargestellt (Abb. 7c). Die Expression des endogenen *ahrr* konnte mittels RT-PCR in mLK und PP von naiven und mit 3-MC behandelten WT Mäusen, jedoch nicht in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen nachgewiesen werden, wobei die *egfp* Expression wie erwartet nur in AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>- Mäusen festgestellt wurde.



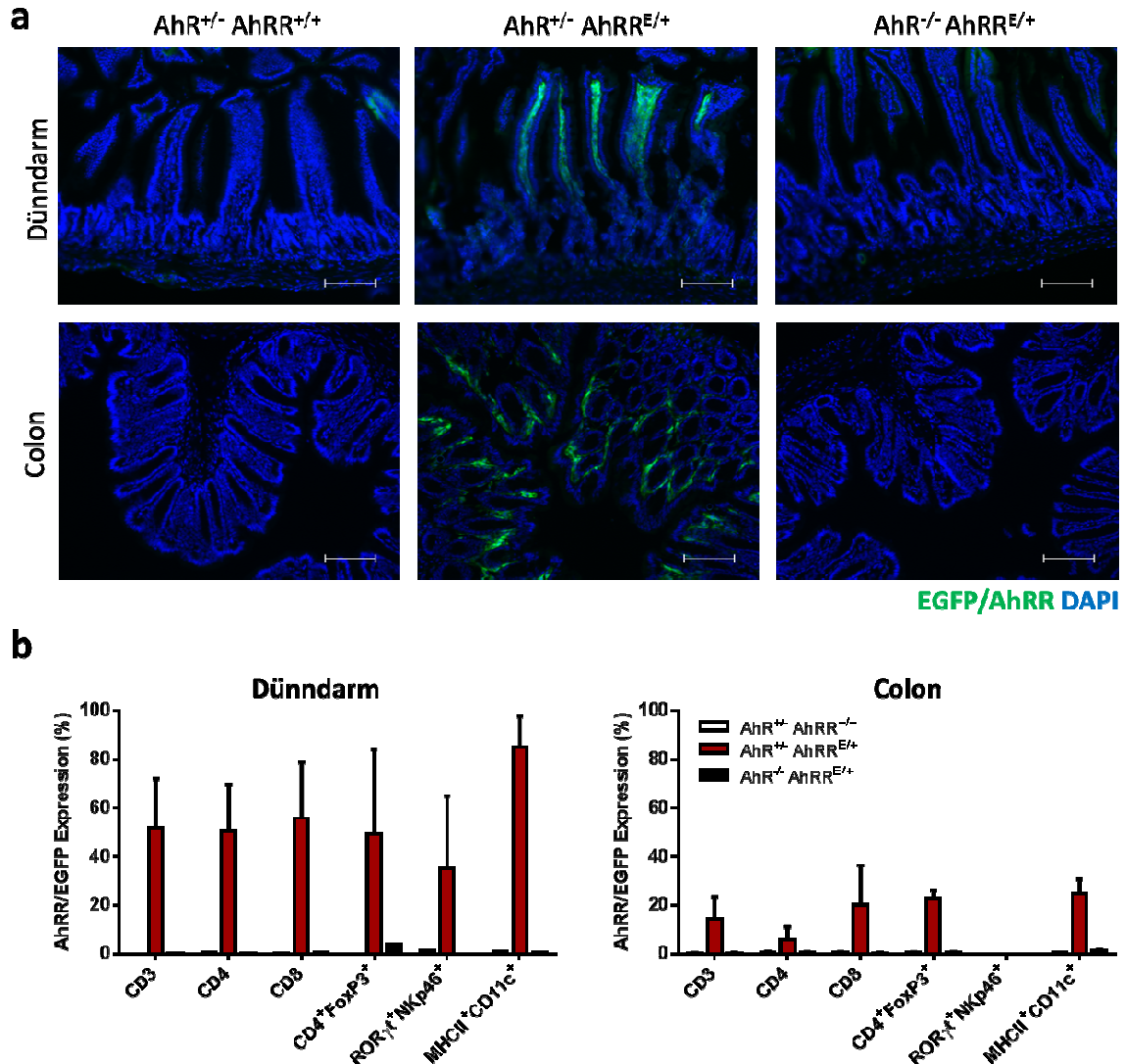
**Abb. 7: Expressionsanalyse des endogenen *ahrr*.** a) Expressionsanalyse der endogenen *ahrr* mRNA in Leber (1), Lunge (2) und mLK (3) von 3 unabhängigen WT Mäusen mittels RT-PCR (M): 100-Basenpaarmarker. b) Analyse der induzierten *ahrr* Expression in verschiedenen Organen von WT Mäusen nach 3-MC-Behandlung. Mittelwert  $\pm$  SEM. c) Repräsentative Expressionsanalyse des endogenen *ahrr* und transgenen *egfp* in mLK und PP von je einer WT- (1), AhRR<sup>E/E-</sup> (2) und AhRR<sup>E/E+</sup> (3)- Maus mittels RT-PCR.

Zusammenfassend wurde bei den RT-PCR Analysen eine konstitutive *ahrr* Expression in mLK detektiert, wobei Leber und Lunge unerwarteterweise AhRR negativ zu sein schienen. Die Aktivierung des AhR durch perorale Gabe von 3-MC führte zu einer relativ starken Aufregulation der AhRR-Expression in mLK und Dünndarm. Die Ergebnisse zur Expression des endogenen *ahrr* stimmen somit im Wesentlichen mit der beobachteten EGFP-Expression in den AhRR/EGFP-Reportermäusen überein.

#### 4.2 Abhängigkeit der konstitutiven AhRR-Expression von der Anwesenheit des AhR

Um die Abhängigkeit der konstitutiven AhRR-Expression von der Präsenz des AhR nachzuweisen, wurden AhR<sup>-/-</sup> mit AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen gekreuzt. Da AhR<sup>+/-</sup>-Mäuse sich wie WT Mäuse verhalten, wurden in diesen Experimenten die AhR<sup>+/-</sup>AhRR<sup>+/-</sup>-Mäuse als Kontrollen benutzt (76). Aus den Doppelknockout-Mäusen und entsprechenden Kontrollmäusen wurden Dünndarm, Colon, PP, mLK als auch die Haut und Ohren für histologische Untersuchungen der EGFP-Expression entnommen. Zusätzlich erfolgten FACS Analysen der aus Dünndarm und Colon, sowie PP und mLK isolierten Zellen.

Die mikroskopischen Analysen der Organe der  $AhR^{+/-}AhRR^{E/+}$ -Mäuse zeigen, dass grün fluoreszierende Zellen in der LP des Dünndarms und des Colons lokalisiert sind (Abb. 8a).



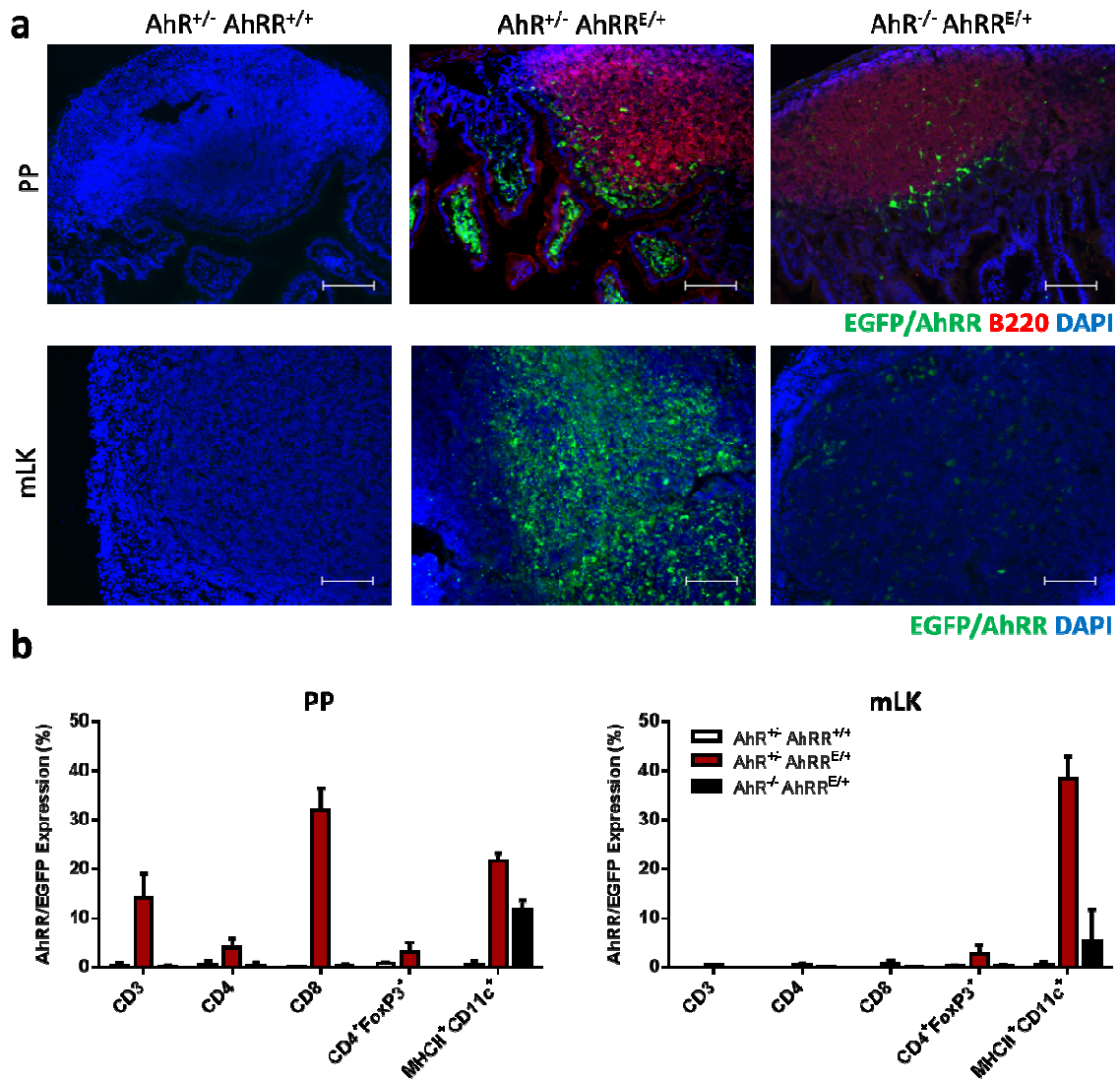
**Abb. 8: AhR-Abhängigkeit der AhRR-Expression im Dünndarm und Colon.** a) Repräsentative histologische Bilder der Analyse der EGFP-Expression im Dünndarm und Colon einer  $AhR^{+/-}AhRR^{+/+}$ ,  $AhR^{+/-}AhRR^{E/+}$  und  $AhR^{-/-}AhRR^{E/+}$ -Maus (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200  $\mu$ m). b) Dargestellt sind die Frequenzen der AhRR/EGFP-exprimierenden Zellen in Dünndarm und Colon (n=2 Mäuse pro Gruppe).

Im Gegensatz dazu zeigten die histologischen Präparate des Dünndarms und des Colons der  $AhR^{-/-}AhRR^{E/+}$ -Mäuse kaum EGFP<sup>+</sup> Zellen. Dies deutet daraufhin, dass die AhRR-Expression in Dünndarm und Colon größtenteils AhR-abhängig ist. Die histologischen Beobachtungen konnten mittels FACS Analyse der aus Dünndarm und Colon isolierten und mit Antikörpern gegen T-Zellen, DC und ILC



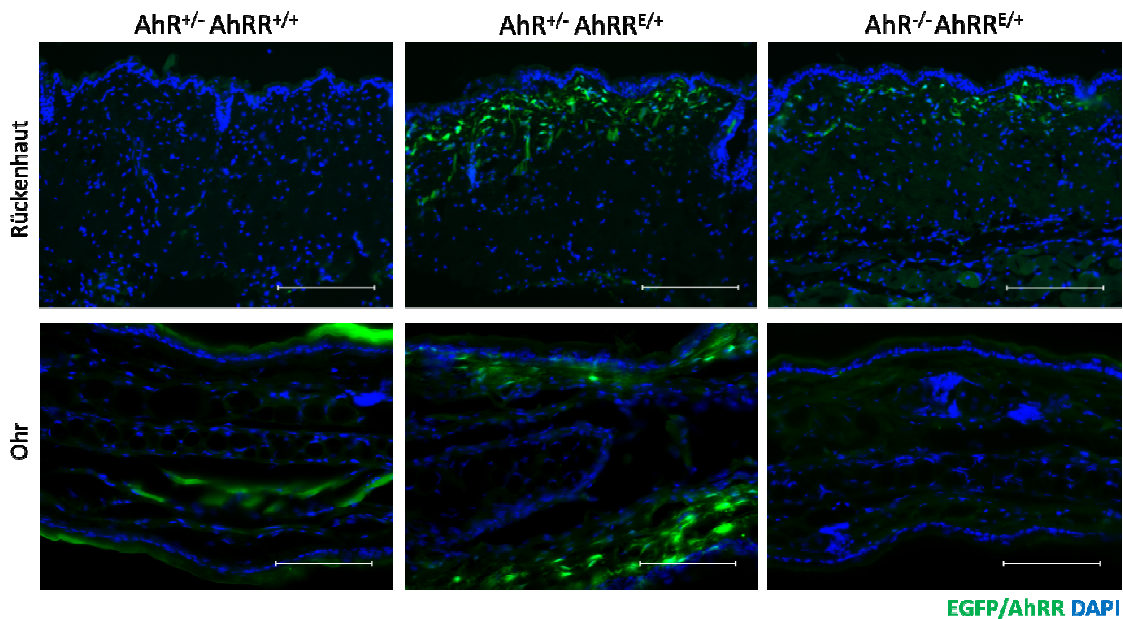
gefärbten Zellen quantitativ belegt werden (Abb. 8b). Etwa die Hälfte der hier untersuchten T-Zellpopulationen und fast alle MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC der AhR<sup>+/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse prägten den AhRR im Dünndarm aus, wohingegen keine Zellen aus AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäusen AhRR positiv waren. Während im Colon 10-20% der T-Zellen und ca. 25% der MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC den AhRR exprimierten, konnten in AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäusen ebenfalls keine AhRR/EGFP Zellen nachgewiesen werden.

In den PP der AhR<sup>+/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse waren die EGFP-positiven Zellen vermehrt in der subepithelialen Dom-Region und in der medullären Region der mLK zu identifizieren (Abb. 9a). Die PP wurden zusätzlich mit anti-B220 Antikörpern gefärbt. Es konnten jedoch keine AhRR-positiven B-Zellen detektiert werden. Interessanterweise konnten auch in den AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäusen grün fluoreszierende Zellen in den PP und mLK erfasst werden. Der prozentuale Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen war jedoch in Abwesenheit des AhR deutlich reduziert. Mittels FACS Analyse konnten die Zelltypen, die den AhRR unabhängig vom AhR ausprägten, identifiziert werden. Von allen untersuchten Zellpopulationen konnten in PP und mLK der AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse nur MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC als AhRR positiv identifiziert werden (Abb. 9b). Die prozentualen Anteile der AhRR<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC der AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse waren in den PP um die Hälfte und in den mLK um das 4-fache im Vergleich zu den Zellen der AhR<sup>+/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse reduziert.



**Abb. 9: Partielle Abhängigkeit der AhRR-Expression in PP und mLK von der Anwesenheit des AhR.** a) Repräsentative histologische Bilder der Analyse der EGFP-Expression in mLK und PP einer AhR<sup>+/-</sup> AhRR<sup>+/+</sup>-, AhR<sup>+/-</sup> AhRR<sup>E/+</sup>- und AhR<sup>-/-</sup> AhRR<sup>E/+</sup>-Maus (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200 µm). b) Dargestellt sind die Frequenzen der AhRR/EGFP-exprimierenden Zellen in PP und mLK (n=2-3 Mäuse pro Gruppe).

Da auch in der Haut eine starke AhRR-Expression nachgewiesen worden ist (H. Weighardt, unveröffentlichte Daten), wurde dieses Barriereorgan in die histologischen Untersuchungen mit eingeschlossen. Aus diesen Analysen ergab sich, dass die  $AhR^{-/-}AhRR^{E/+}$ -Mäuse ebenfalls grün fluoreszierende Zellen in der Dermis der Rückenhaut aufwiesen, obwohl sie nicht so zahlreich erschienen wie bei den  $AhR^{+/-}AhRR^{E/+}$ -Mäusen (Abb. 10). Im Gegensatz dazu enthielt die Haut der Ohren der  $AhR^{-/-}AhRR^{E/+}$ -Mäuse keine EGFP-positiven Zellen, was für die vollständige Abhängigkeit der AhRR-Transkription von der Aktivierung des AhR in dieser Lokalisation spricht.



**Abb. 10: AhR-Abhängigkeit der AhRR-Expression in der Rückenhaut und am Ohr.** Dargestellt sind repräsentative Bilder von der Analyse der EGFP-Expression in der Rückenhaut (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 400  $\mu$ m) und den Ohren (Vergrößerung 400x; Maßstabsbalken 100  $\mu$ m) einer  $AhR^{+/-}AhRR^{+/+}$ -,  $AhR^{+/-}AhRR^{E/+}$ - und  $AhR^{-/-}AhRR^{E/+}$ -Maus.

In diesen Experimenten konnte zum ersten Mal belegt werden, dass in Dünndarm und Colon die AhRR-Expression von der Expression des AhR vollkommen abhängig ist. In der Haut, den PP und mLK steuert der AhR die Ausprägung des AhRR nur partiell. In diesen Organen könnte eine Expression des AhRR über andere Signalwege, etwa über NF- $\kappa$ B induziert werden.

## 4.3 Einfluss von AhR-Liganden auf die AhRR-Expression im intestinalen Immunsystem

### 4.3.1 Behandlung von AhRR Mäusen mit AhR-Liganden

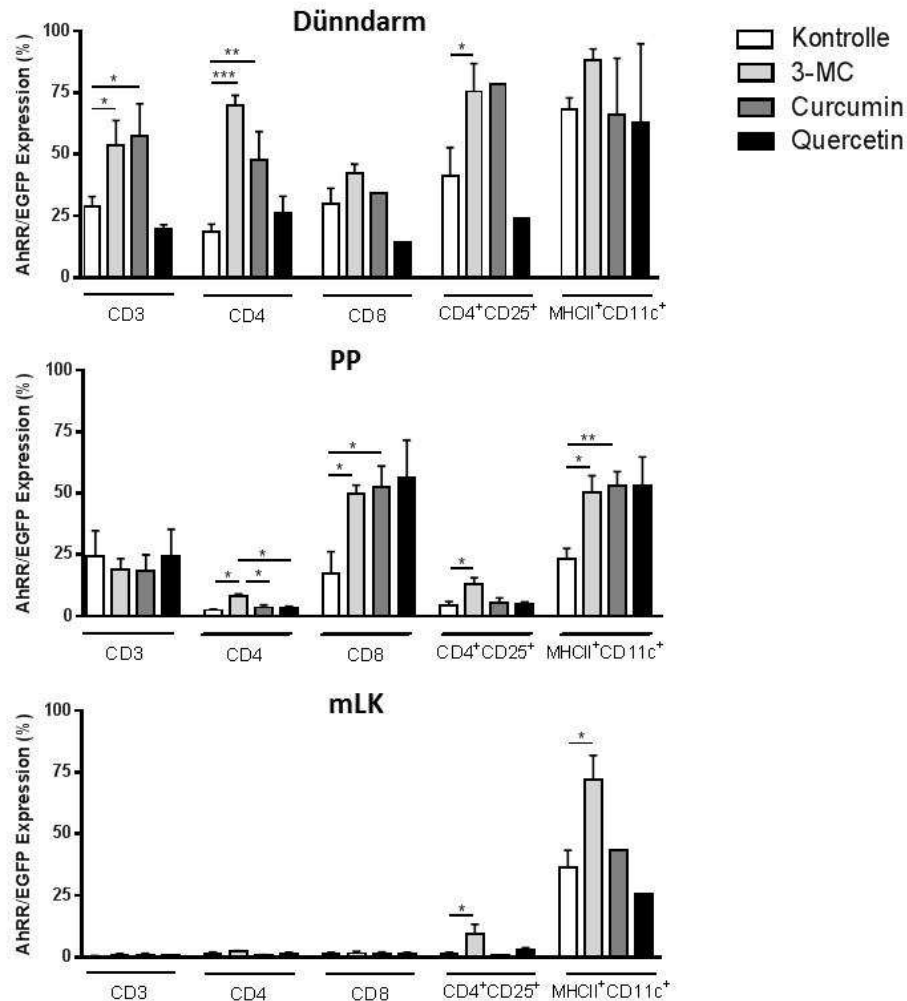
Es ist bekannt, dass in der Nahrung viele AhR-Liganden vorkommen. Um den Einfluss von AhR-Liganden aus der Nahrung auf die AhRR-Expression zu ermitteln, wurden die AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse mit drei verschiedenen AhR-Liganden gefüttert. Als klassischer und sehr potenter AhR-Ligand wurde genauso wie bei den RT-PCR Analysen 3-MC verwendet. Curcumin und Quercetin wurden als Beispiel von natürlich in der Nahrung vorkommenden Liganden ausgesucht. Alle drei benutzten Substanzen sind hydrophob, weshalb sie in DMSO gelöst und mit Olivenöl verdünnt den Versuchsmäusen peroral verabreicht wurden. Die Kontrolltiere bekamen nur eine DMSO/Olivenöl Mischung. Nach 16 Stunden wurden Dünndarm, PP und mLK aus den behandelten Mäusen gewonnen, Zellen isoliert und mit den entsprechenden Antikörpern für die FACS Messung gefärbt. Es wurden CD3<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aktivierte Zellen als auch MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC bezüglich der AhRR-Expression anhand der prozentualen Anteile der EGFP-positiven Zellen untersucht.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach Belastung mit 3-MC die AhRR-Expression in allen analysierten Lymphozytenpopulationen und in DC der LP des Dünndarms im Vergleich zu entsprechenden Zellen aus den nur mit DMSO/Olivenöl behandelten Mäusen erhöht war, wobei sich der Unterschied bei den CD4<sup>+</sup>-Zellen als stark signifikant erwiesen hat (Abb. 11). Die Aufregulation des AhRR war in der LP nach Gabe von Curcumin vergleichbar mit den Effekten von 3-MC. Im Gegensatz dazu zeigte Quercetin eine leicht suppressive Wirkung auf die AhRR-Expression in fast allen untersuchten Zellpopulationen der LP. Nur in CD4<sup>+</sup>-Zellen waren die Frequenzen an AhRR-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen der Kontrollmäuse geringfügig erhöht.

Die PP zeigten eine stark erhöhte AhRR-Expression in den CD8<sup>+</sup>-Zellen und MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC, die unabhängig von der Art des peroral verabreichten Liganden war. Im Fall der CD3<sup>+</sup>-Zellen war keine Induktion der AhRR-Expression zu sehen und die Frequenzen der AhRR-positiven CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen waren nur nach Belastung mit 3-MC signifikant erhöht.

In den mLK exprimierten nur MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC den AhRR konstitutiv, wobei Curcumin die Prozentanteile der AhRR-positiven MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC kaum änderte und Quercetin eine leichte Reduktion der EGFP-positiven Zellen bewirkte. Die 16-stündige Behandlung von AhRR<sup>E/+</sup>-Mäusen mit

verschiedenen Liganden führte in den mLK nur im Fall von 3-MC zu einer signifikanten Erhöhung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und DC, die AhRR aufregulierten.



**Abb. 11: AhRR/EGFP-Expression in den Zellen des GALT nach peroraler Applikation von verschiedenen AhR-Liganden.** AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse wurden mit 3-MC (10 mg pro kg Körpergewicht), Curcumin und Quercetin (250 mg pro kg Körpergewicht) in DMSO/Olivenöl für 16 Stunden behandelt. Den Kontrollmäusen wurde nur eine DMSO/Olivenöl Mischung verabreicht. Die aus Dünndarm, PP und mLK isolierten Zellen wurden mit Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. n=3-7 Kontrollmäuse, Mäuse nach 3-MC Behandlung, PP nach Curcumin und Quercetin Behandlung. n=2: LP (CD3, CD4, MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) – Curcumin, Quercetin; mLK (CD3, CD4, CD8, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) Curcumin, Quercetin; PP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Curcumin, Quercetin. n=1: LP (CD8, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) Curcumin, Quercetin; mLK MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Curcumin, Quercetin. Mittelwert ± SEM; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Interessanterweise lässt sich eine graduelle Verteilung der AhRR-positiven Zellen von der LP im Vergleich zu mLK erkennen. In der LP prägten alle analysierten Zellpopulationen den AhRR konstitutiv

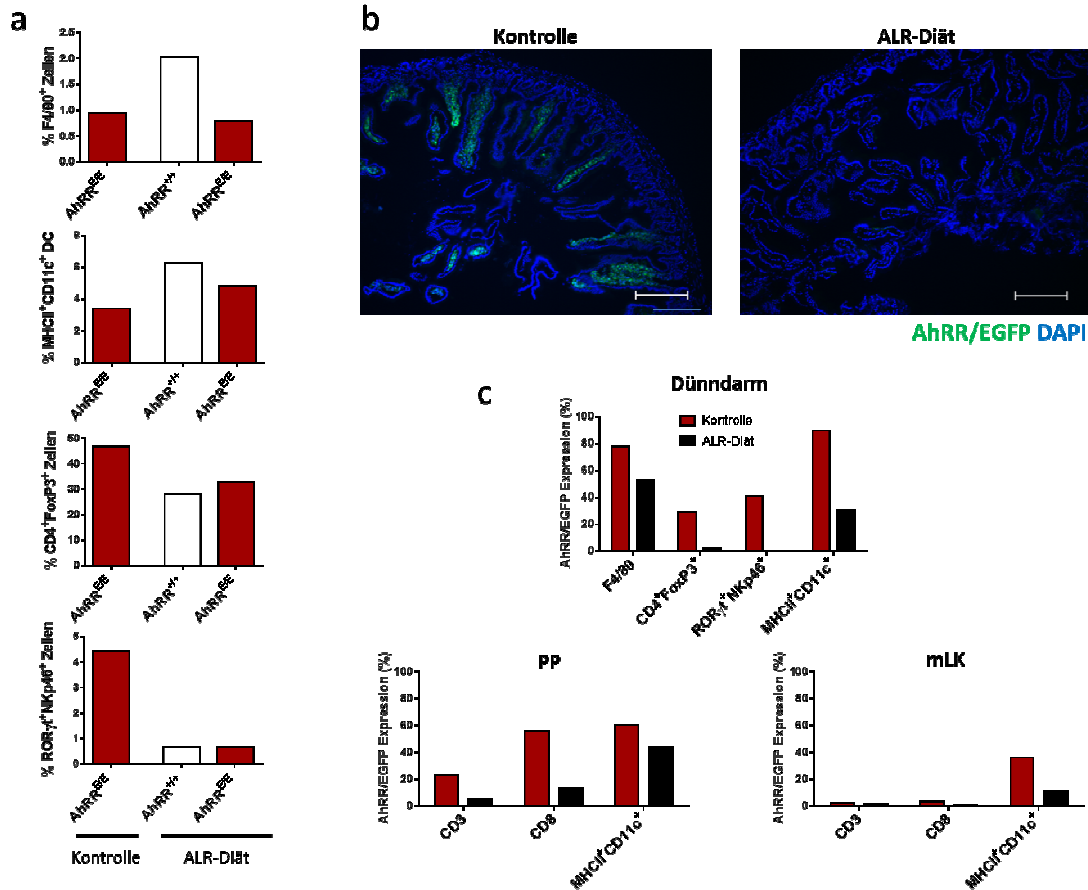
aus, wobei 3-MC als auch Curcumin die Frequenzen der AhRR-positiven Zellen deutlich erhöhen konnten. In den PP war die AhRR-Expression im Wesentlichen auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC und in den mLK nur auf MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC begrenzt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse daraufhin, dass die Expression des AhRR in dem darmassoziierten Immunsystem sowohl von exogenen- wie auch von natürlichen AhR-Liganden abhängig ist.

#### 4.3.2 Behandlung der AhRR Mäuse mit AhR-Liganden reduziertem Futter

Li et al. konnten zeigen, dass die Fütterung von C57BL/6 Mäusen mit einer AhR-Liganden-reduzierten (ALR)-Diät im Vergleich zur Standarddiät die *cyp1a1* Expression im Ileum signifikant reduziert. Weiterhin zeigten Mäuse, die ALR-Diät erhielten, im Gegensatz zu normal gefütterten Mäusen eine signifikante Reduktion der Frequenzen von sowohl TCRγδ<sup>+</sup>- als auch TCRαβ<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>-IEL im Dünndarm (115).

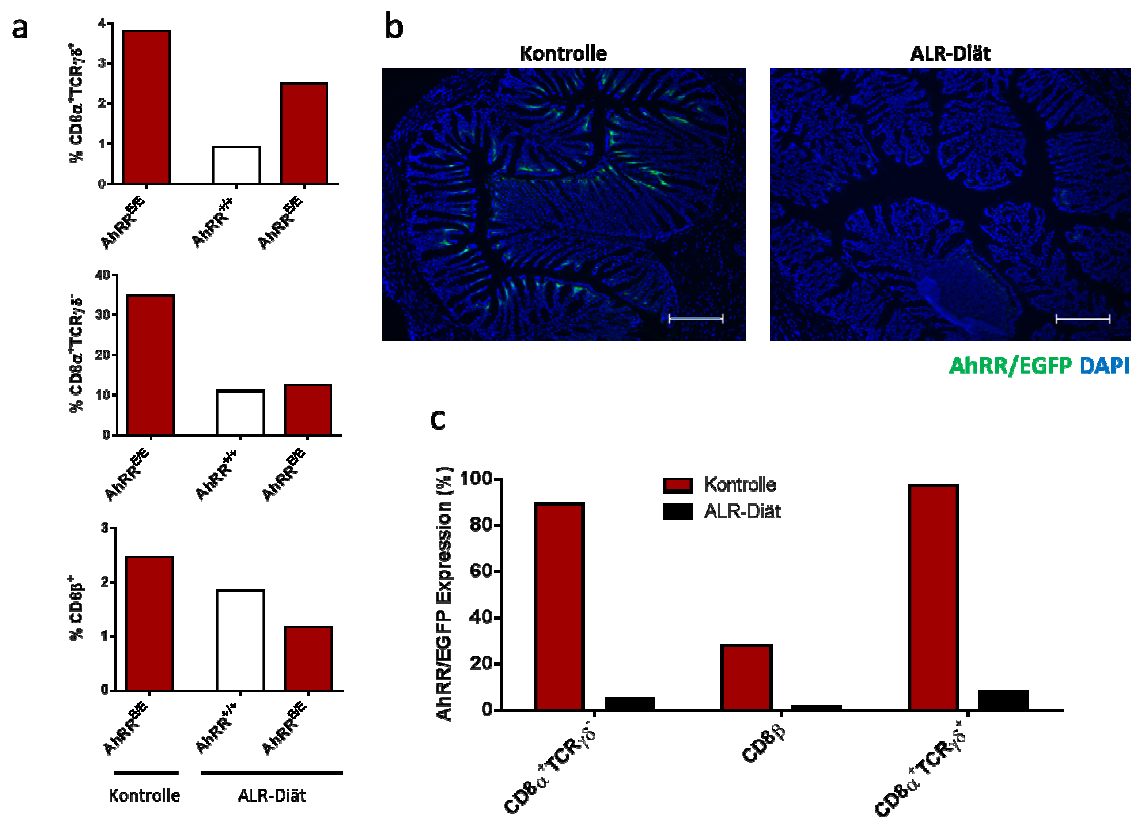
Um die Beobachtung, dass die AhRR-Expression von aufgenommener Nahrung beeinflusst werden kann, weiter aufklären zu können, wurde den AhRR<sup>E/E</sup>-Versuchsmäusen eine ALR-Diät über 12 Wochen verabreicht. Vergleichbar zu den im Abschnitt 4.3.1. beschriebenen Experimenten wurden auch hier die prozentualen Anteile der Immunzellen in LP, PP und mLK als auch die AhRR-Expression mittels FACS und Fluoreszenzmikroskop erfasst. Der Versuch konnte allerdings wegen Kontamination des Futters nur einmal durchgeführt werden. Die ALR-Diät führte in diesem Fall zu einer zweifachen Erhöhung der Prozentanteile der F4/80<sup>+</sup>-Makrophagen und MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC in der AhRR<sup>+/+</sup>-Maus aber nicht in der AhRR<sup>E/E</sup>-Maus (Abb. 12a). Des Weiteren zeigten sowohl die AhRR<sup>+/+</sup>- als auch AhRR<sup>E/E</sup>-Maus niedrigere Prozentanteile der CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Treg und drastisch reduzierte Prozentanteile der RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-ILC gegenüber der mit Standardfutter gefütterten AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmaus. Im Dünndarm der AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmaus konnten histologisch grün fluoreszierende Zellen in der ganzen LP detektiert werden (Abb. 12b). Im Gegensatz dazu zeigte die AhRR<sup>E/E</sup>-Maus, die die ALR-Diät bekommen hatte, nur sehr wenige EGFP-positive Zellen in der LP.



**Abb. 12: Einfluss der ALR-Diät auf die Frequenz von Immunzellen im Dünndarm und auf die AhRR-Expression im darmassoziierten Immunsystem.** a) Prozentanteile verschiedener Zellpopulationen im Dünndarm einer AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmaus und der mit ALR-Diät gefütterten AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Maus. b) Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Dünndarms der AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmaus und der mit ALR-Diät gefütterten AhRR<sup>E/E</sup>-Maus (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200 μm). c) Prozentanteile der AhRR/EGFP-positiven Zellen in der LP des Dünndarms, in den PP und mLK der AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmaus und der mit ALR-Diät gefütterten AhRR<sup>E/E</sup>-Maus.

Die Fütterung der AhRR<sup>E/E</sup>-Maus mit der ALR-Diät bewirkte eine starke Reduktion der prozentualen Anteile der AhRR-positiven F4/80<sup>+</sup>-Makrophagen und MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC in der LP (Abb. 12c). Interessanterweise zeigten die FoxP3<sup>+</sup>-Zellen und RORγ<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-ILC, die aus dem Dünndarm dieser Maus isoliert wurden, keine AhRR-Ausprägung mehr. In den PP konnte mittels FACS Messung ebenso eine Verminderung der AhRR-Expression in CD3<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC der AhRR<sup>E/E</sup>-Maus, die mit der ALR-Diät gefütterter worden war, im Vergleich zur normal gefütterten AhRR<sup>E/E</sup>-Maus festgestellt werden. In den mLK führte die ALR-Diät ebenfalls zu einer Reduktion der prozentualen Anteile an AhRR-positiven MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC.

Parallel dazu wurden auch IEL aus dem Colon der Versuchsmäuse isoliert und mittels FACS-Analyse genauer untersucht. Hierbei unterscheidet man  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ ,  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^-$  sowie  $CD8\beta^+$ -exprimierende IEL-Subpopulationen. Die prozentualen Anteile aller untersuchten IEL-Subpopulationen waren in der mit ALR-Diät gefütterten  $AhRR^{+/+}$ - als auch der  $AhRR^{E/E}$ -Maus im Vergleich zu den Werten des  $AhRR^{E/E}$ -Kontrolltiers reduziert (Abb. 13a). Histologisch konnten im Colon der  $AhRR^{E/E}$ -Kontrollmaus EGFP-positive Zellen vor allem zwischen den Epithelzellen als auch in der direkt darunter liegender Schicht identifiziert werden (Abb. 13b). Das Colon der mit ALR-Futter gefütterten  $AhRR^{E/E}$ -Maus wies im Gegensatz dazu keine grün fluoreszierenden Zellen auf.



**Abb. 13: Einfluss der ALR-Diät auf die Prozentanteile der IEL und auf die AhRR-Expression in Colon.** a) Prozentanteile der IEL im Colon der  $AhRR^{E/E}$ -Kontrollmaus und der mit ALR-Diät gefütterten  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Maus. b) Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Colons der  $AhRR^{E/E}$ -Kontrollmaus und der mit ALR-Diät gefütterten  $AhRR^{E/E}$ -Maus (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200  $\mu$ m). c) Prozentanteile der AhRR/EGFP-positiven IEL der  $AhRR^{E/E}$ -Kontrollmaus der mit ALR-Diät gefütterten  $AhRR^{E/E}$ -Maus.

Die FACS Analyse der IEL bestätigt die stark reduzierte EGFP-Expression im Colon der  $AhRR^{E/E}$ -Maus, die eine verminderte Menge an AhR-Liganden mit der Nahrung aufgenommen hatte. In der  $AhRR^{E/E}$ -



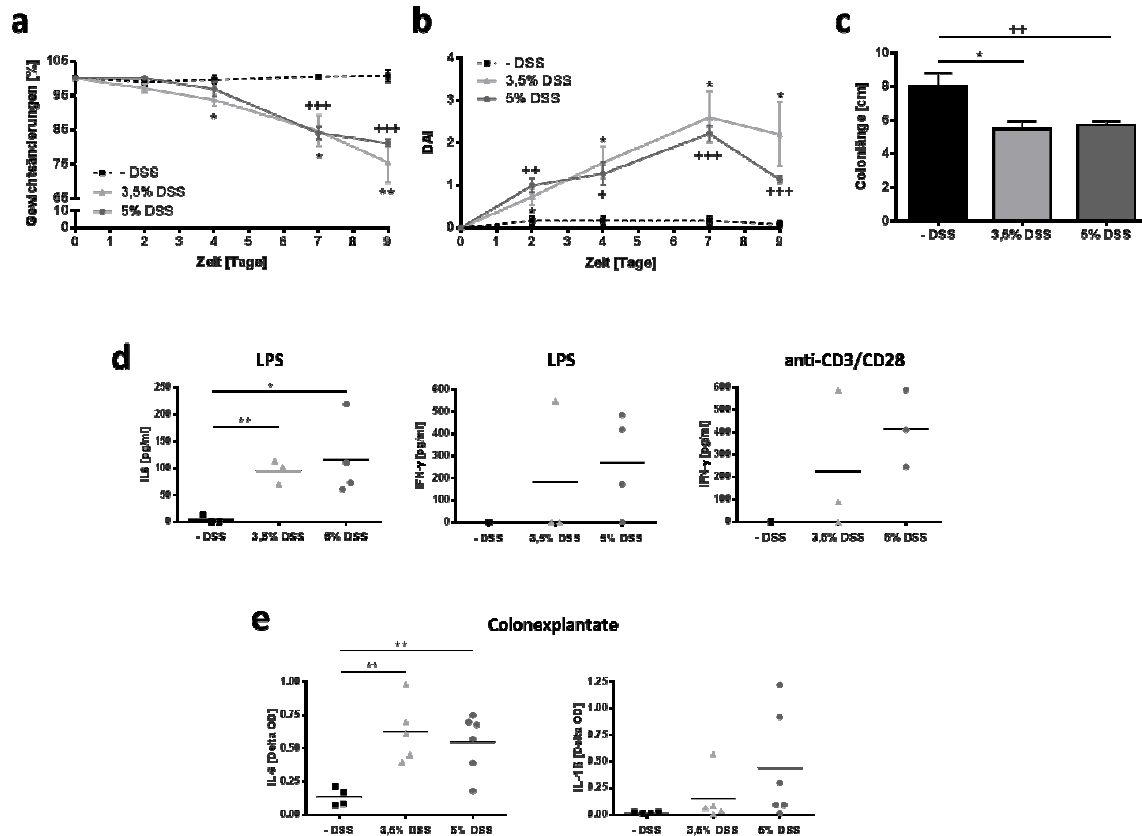
Kontrollmaus exprimierten fast alle  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ - sowie  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^-$ - und nur etwa 30% der  $CD8\beta^+$ -Zellen konstitutiv den AhRR. Die ALR-Diät führte zur drastischen Abnahme der Prozentanteile der AhRR/EGFP-positiven IEL Subpopulationen (Abb. 13c).

Die Befunde der Experimente mit der ALR-Diät deuten darauf hin, dass die *ahrr* Transkription in Treg und ILC in der LP des Dünndarms als auch in den IEL des Colons vollständig von der Aktivierung des AhR durch Nahrungsbestandteile abhängt. Noch stärker als in den AhR-defizienten Mäusen zeigte sich jedoch eine residuale AhRR-Expression in Makrophagen und DC der LP des Dünndarms und der PP.

#### 4.4 Rolle des AhRR bei der DSS-induzierten Colitis

##### 4.4.1 Etablierung des DSS-induzierten Colitis Modells

Um die Rolle des AhRR im darmassoziierten Immunsystem weiterführend zu untersuchen, wurde ein Mausmodell für CED gewählt. Zahlreiche Publikationen weisen seit kurzer Zeit auf eine Bedeutung des AhR in Entzündungsreaktionen der Darmmukosa hin (114, 115, 147). Zuerst wurden in Vorarbeiten die Dosis von DSS und die Dauer der Behandlung an C57BL/6 Mäusen optimiert. Die Versuchstiere wurden entweder mit 3,5% oder 5% DSS im Trinkwasser für 7 Tage behandelt, gefolgt von 2 DSS-freien Tagen. Während des gesamten Behandlungsverlaufes wurden alle zwei Tage klinische Parameter zur Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere bestimmt. Hierzu zählten die Bestimmung des Körpergewichts, die Beurteilung der Stuhlkonsistenz sowie ein Haemocult®-Test. Bereits nach 4 Tagen wurde in beiden behandelten Gruppen eine leichte Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe registriert, wobei die Gewichtsabnahme der Tiere, die der niedrigeren DSS Konzentration ausgesetzt waren, statistische Signifikanz erreicht hat (Abb. 14a).



**Abb. 14: Effekte verschiedener DSS Konzentrationen auf den Verlauf der Colitis in C57BL/6 Mäusen.** a) Gewichtsveränderung nach Behandlung mit 3,5%- und 5% DSS. Die Gewichtsveränderung ist angegeben in % bezogen auf das ursprüngliche Gewicht der Mäuse. Mittelwert  $\pm$  SEM. b) Disease Activity Index (DAI). Darin sind die Parameter Gewichtsveränderung, Stuhlkonsistenz und rektale Blutungen zusammengefasst. Mittelwert  $\pm$  SEM. c) Colonlänge. Mittelwert  $\pm$  SD. d) Zytokinproduktion von kultivierten Lymphknotenzellen nach Restimulation mit LPS bzw. anti-CD3/CD28. e) Zytokinproduktion von kultivierten *ex vivo* Colonexplantaten. n=4-6 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. \* 3,5% DSS vs. unbehandelt; + 5% DSS vs. unbehandelt.

Der Gewichtsverlust setzte sich in beiden DSS exponierten Gruppen bis zum Tag 9 fort und erreichte am Tag 7 und 9 bei der Behandlung mit 5% DSS hohe statistische Signifikanz gegenüber den unbehandelten Mäusen. Die Tiere, die der niedrigen DSS-Konzentration ausgesetzt waren, zeigten relativ große Gewichtsschwankungen.

Mit DSS-behandelte Tiere zeigten bereits nach 1-2 Tagen erste klinische Symptome, die sich in der Regel in einem weichen Stuhl und okkultem Blut im Stuhl manifestiert hatten. Später trat, gleichzeitig zum erheblichen Gewichtsverlust, starke Diarrhoe auf (Abb. 14b). Diese Krankheitszeichen wurden durch den DAI quantifiziert (siehe Abschnitt 3.2.3.2). Ein weiterer Parameter, der den Schweregrad der Colitis beschreibt, aber nicht im DAI erfasst ist, ist die Colonlänge. Die mit DSS-behandelten Tiere

zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant verkürztes Colon (Abb. 14c), wobei keine Unterschiede zwischen den zwei untersuchten DSS Dosen registriert wurden.

Die Entzündungsreaktion bei Colitis ulcerosa geht mit einem erheblichen Anstieg proinflammatorischer Zytokine, unter anderem IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  einher. Um die im DSS-Modell produzierten Zytokine untersuchen zu können, wurden aus mLK isolierte Zellen für 48 Stunden entweder mit LPS oder mit anti-CD3/CD28 *in vitro* restimuliert. Zusätzlich wurden Colonstücke für 6 Stunden kultiviert. Die Bestimmung der Zytokinkonzentration in Überständen erfolgte mittels ELISA. Die Menge der drei gemessenen Zytokine in den Überständen aus mLK und Colonexplantaten stiegen unabhängig von den verwendeten Stimuli nach der DSS-Behandlung an (Abb. 14d, e). Dabei war der IL-6 Spiegel nach Colitis-Induktion signifikant höher als bei den unbehandelten Kontrollen. Es zeigte sich jedoch kein großer Unterschied zwischen den beiden untersuchten DSS Konzentrationen.

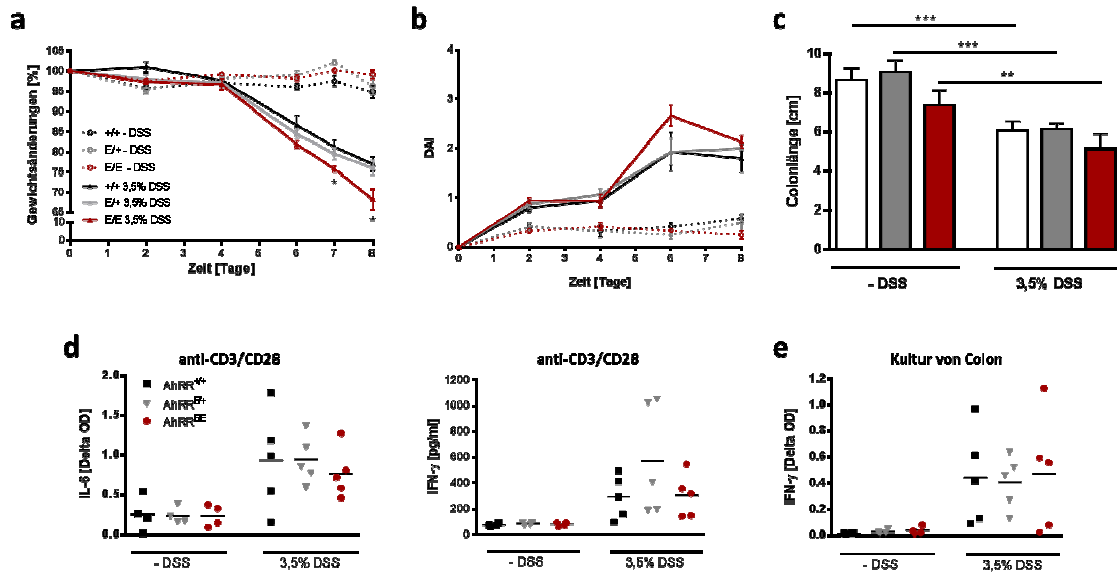
Abschließend konnte festgestellt werden, dass es keine gravierenden Unterschiede im Gewichtsverlust, DAI, der Colonlänge und der Produktion proinflammatorischer Zytokine zwischen einer DSS-Induktion durch 3,5% oder durch 5% DSS gab. Die folgenden Experimente wurden bis auf eines mit einer Konzentration von 5% DSS durchgeführt. Da die Tiere am Tag 9 des Versuchs teilweise über 20% des Ausgangsgewichts verloren haben, wurde in den weiteren Experimenten die DSS freie Periode um 1 bis 2 Tage gekürzt.

#### 4.4.2 Untersuchung der Funktion des AhRR bei DSS-induzierter Colitis

##### 4.4.2.1 Induktion der Colitis mit 3,5% DSS

Um den Einfluss des AhRR auf die Ausbildung einer DSS-induzierten entzündlichen Darmerkrankung zu ermitteln, wurden AhRR<sup>+/-</sup>, AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Wurfgeschwister für 7 Tage zunächst mit 3,5% DSS und danach 1 Tag mit Wasser behandelt. Ähnlich wie in dem Testexperiment wurden Gewichtsveränderungen, die Krankheitssymptome (DAI) und die Colonlänge der Versuchstiere untersucht und ausgewertet. Aus Abb. 15a ist ersichtlich, dass AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen stärker abgenommen hatten, wobei sich am Tag 7 sowie am Versuchsende (Tag 8) die Gewichtsunterschiede als signifikant erwiesen haben. AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse haben sich hingegen ähnlich, wie AhRR<sup>+/+</sup>-Mäuse verhalten.

Bei der Auswertung des DAI erreichten die meisten DSS-behandelten Tiere am Tag 8 jedoch lediglich etwa  $2 \pm 0,3$  von gesamt 4 Punkten und zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen (Abb. 15b).



**Abb. 15:** Verlauf der Colitis in  $AhRR^{+/+}$ ,  $AhRR^{E/+}$  und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen nach der Behandlung mit 3,5% DSS. a) Gewichtsänderungen. Mittelwert  $\pm$  SEM. b) Disease Activity Index (DAI). Mittelwert  $\pm$  SEM. c) Colonlänge. Mittelwert  $\pm$  SD. d) Zytokinproduktion von kultivierten Lymphknotenzellen nach Restimulation mit anti-CD3/CD28. e) Zytokinproduktion von kultivierten *ex vivo* Colonexplantaten. n=4-5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

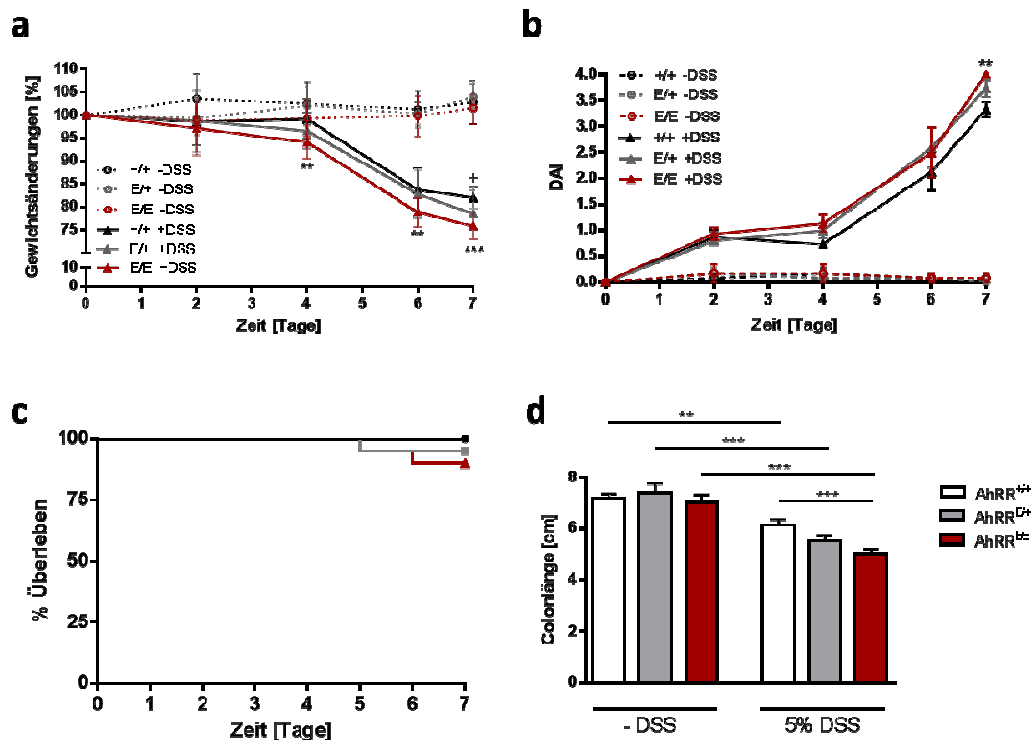
Alle dem DSS ausgesetzten Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine signifikant reduzierte Colonlänge auf, es konnte aber nur ein geringer Unterschied zwischen  $AhRR^{+/+}$ ,  $AhRR^{E/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen festgestellt werden (Abb. 15c). Nach der Colitis-Induktion waren die proinflammatorischen Zytokine in den Colon- und mLK Kulturen deutlich erhöht im Vergleich zu naiven Mäusen, wobei die IL-6- und IFN- $\gamma$ -Spiegel aller DSS-behandelten Gruppen vergleichbar waren (Abb. 15 d, e).

Insgesamt führte die Anwendung von 3,5% DSS zwar zur stärkeren Gewichtsabnahme der  $AhRR^{E/E}$ -Versuchsmäuse im Verhältnis zu den  $AhRR^{+/+}$ -Tieren, alle anderen untersuchten Parameter der entzündlichen Reaktion des Darmes waren jedoch in den drei analysierten Gruppen vergleichbar. Da aber der DAI Score relativ niedrig war, wurde beschlossen, in weiteren Experimenten eine Konzentration von 5% DSS im Trinkwasser zu verwenden.

#### 4.4.2.2 Induktion der Colitis mit 5% DSS

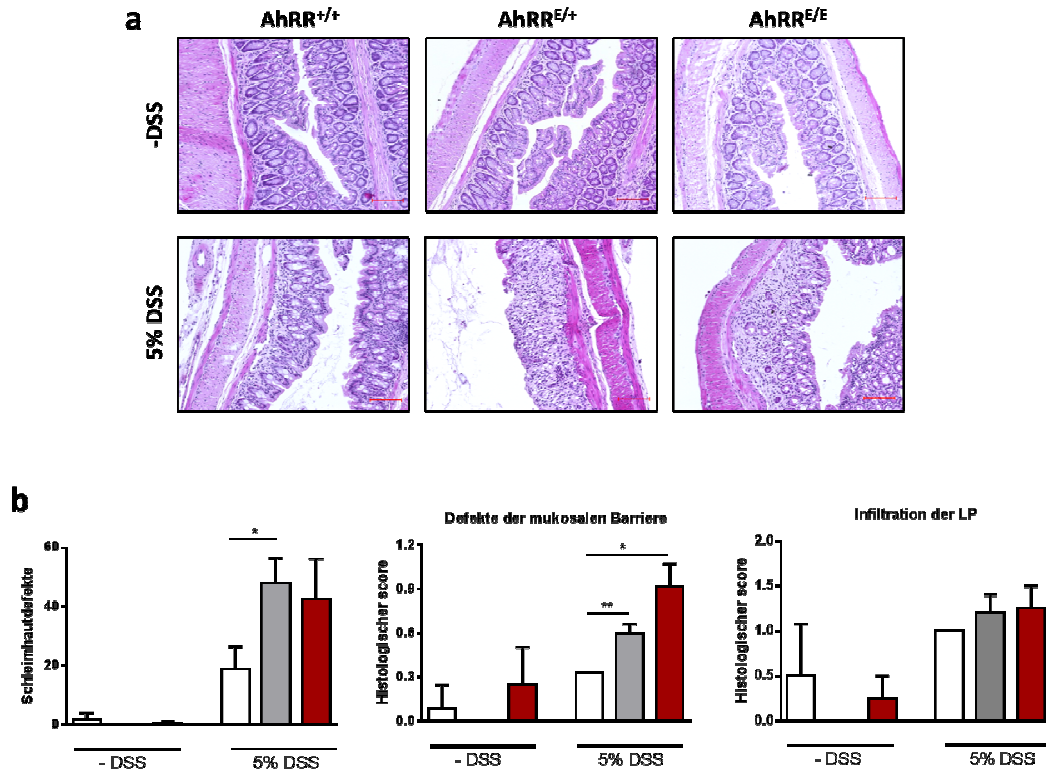
Nach Exposition der Tiere mit 5% DSS entwickelten die  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse stark ausgeprägte Symptome einer Colitis mit einem Gewichtsverlust von über 20% des Ausgangsgewichts am Tag 7 und erreichten

die höchste Punktzahl des DAI Score (Abb. 16 a,b). Beide Parameter zeigten am Tag 7 des Experiments stark signifikante Unterschiede zwischen den  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen. Insgesamt verstarben 2  $AhRR^{E/E}$ - (12.5%, n = 16) und 1  $AhRR^{E/+}$ -Tier (6,25%, n = 16) der DSS-Gruppe vor Erreichen des Versuchsendes (Abb. 16c). Das Colon der  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse war ebenfalls signifikant verkürzt im Vergleich zu dem der  $AhRR^{+/+}$ -Mäuse. Dies lässt darauf schließen, dass das Ausmaß der Entzündung bei den  $AhRR$ -defizienten Versuchstieren erheblicher war als bei den WT-Kontrollmäusen (Abb. 16d).



**Abb. 16: Verstärkte Colitissymptome in  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen nach 7 Tagen Behandlung mit 5% DSS.** a) Gewichtsveränderungen. Mittelwert  $\pm$  SEM). b) Disease Activity Index (DAI). Mittelwert  $\pm$  SEM. c) Überlebenskurve. d) Colonlänge. Mittelwert  $\pm$  SD. n=9-16 Mäuse pro Gruppe in 3 unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

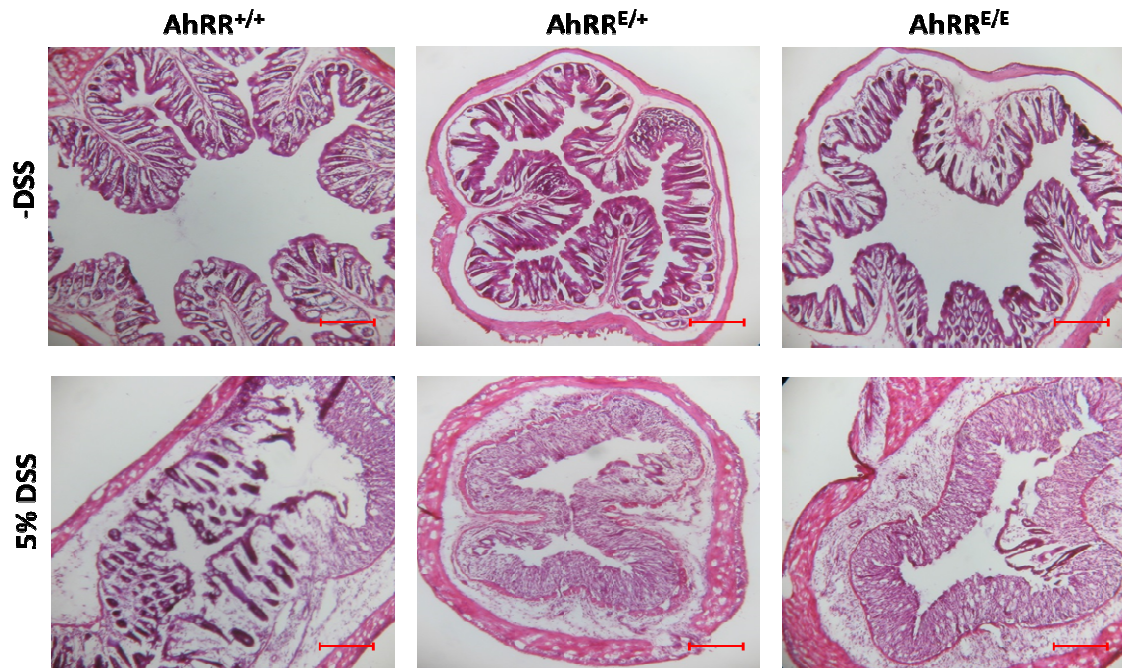
Die histologische Analyse der Colonproben erfolgte im Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durch eine erfahrene Pathologin, Frau Dr. von Smolinski. Sie beinhaltete folgende Kriterien: Untersuchung von Schleimhautdefekten, Defekten der mukosalen Barriere und Zellinfiltration in die LP. Der daraus berechnete Score stellt ein Maß für den Schweregrad der Colitis dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad der histopathologischen Läsionen in den  $AhRR^{E/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen erhöht war (Abb. 18b).



**Abb. 17: Histopathologische Untersuchungen des Colons nach 7 Tagen Behandlung mit 5% DSS.** a) Repräsentative Bilder des HE-gefärbten distalen Colons sind für jeden Genotypen gezeigt (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200  $\mu$ m). b) Pathologische Beurteilung der histologischen Präparate. Schleimhautdefekte, Defekte der mukosalen Barriere und Zellinfiltration in die LP wurden untersucht. n=4-5 Mäuse pro Gruppe. Mittelwert  $\pm$  SD. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

In einem Experiment wurde zusätzlich eine Behandlung der Mäuse mit 5% DSS für 7 Tage mit einem darauffolgenden DSS-freien Tag durchgeführt. Die Analyse der Mäuse, die einen zusätzlichen Tag Wasser ohne DSS getrunken haben, führte zu weitgehend ähnlichen Ergebnissen wie bei dem 7 Tage dauernden Experiment. Die AhRR<sup>E/E</sup>-Gruppe hatte nach dem Auslösen der Colitis signifikant mehr an Gewicht verloren, zeigte einen erhöhten DAI Score und eine signifikant reduzierte Colonlänge im Vergleich zur AhRR<sup>+/+</sup>-Gruppe (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung dieses Modells hat sich aber als ungeeignet erwiesen, weil die AhRR<sup>E/E</sup>-Gruppe am Versuchsende über 30% des Anfangsgewichts verloren hatte, was zu einer zu starken Belastung der Tiere führte.

Die histologische Untersuchung der Colonpräparate der DSS-behandelten Mäuse aus diesem Experiment zeigte eine deutliche Veränderung in der Morphologie des Epithels (Abb. 18). Im Colon aller DSS-behandelten Gruppen konnte eine Abflachung des Epithels und der darin enthaltenen Becherzellen, die entleert erschienen, beobachtet werden.

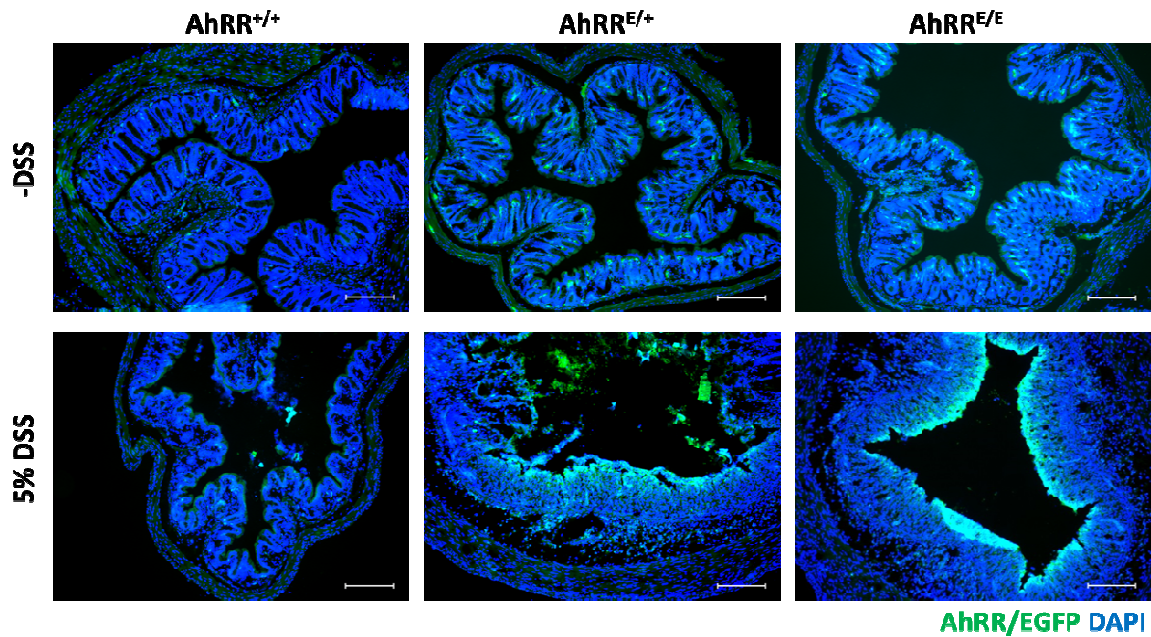


**Abb. 18: Histopathologie der Colons von AhRR<sup>+/+</sup>-, AhRR<sup>E/+</sup> und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen nach 8 Tagen DSS-Behandlung.** Repräsentative Bilder des H&E-gefärbten distalen Colons sind für jeden Genotyp gezeigt (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200 µm).

In den Versuchsgruppen der AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse waren die Krypten sichtbar verkürzt und erreichten mit ihrer Basis nicht mehr die Lamina *muscularis mucosae*. Es war ein starkes Zellinfiltrat vor allem in der Mukosa und Submukosa der AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Gruppe als auch eine Verdickung der Darmwand zu sehen. Im Colon von DSS-behandelten AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen existierten Abschnitte mit starker Entzündungsaktivität in direkter Nachbarschaft zu Abschnitten, die histologisch nahezu unverändert schienen. Außerdem waren die lokal auftretenden Infiltrate bei den Tieren geringer im Vergleich zu AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen. Die H&E-gefärbten Colonschnitte der Tiere aller Kontrollgruppen zeigten eine normale Morphologie der Colonwand, dabei wurden keine Veränderungen der Kryptenmorphologie beobachtet und es fanden sich auch keine Zeichen einer Entzündungsaktivität.

Des Weiteren wurden die Colonpräparate mit DAPI gegengefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bei den AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmäusen waren EGFP-exprimierende Zellen zwischen den Epithelzellen und in der LP zu detektieren (Abb. 19). DSS führte zur Zerstörung der Epithelbarriere, was zur Folge hatte, dass die EGFP Fluoreszenz in der Zone, die direkt ans Darmlumen angrenzt, zu sehen war. Die AhRR/EGFP-Expression war in DSS-behandelten AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Tieren deutlich stärker ausgeprägt als bei unbehandelten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen,

auch waren die grün fluoreszierenden Zellen in der ganzen Darmmukosa und im entzündlichen Infiltrat zu detektieren.



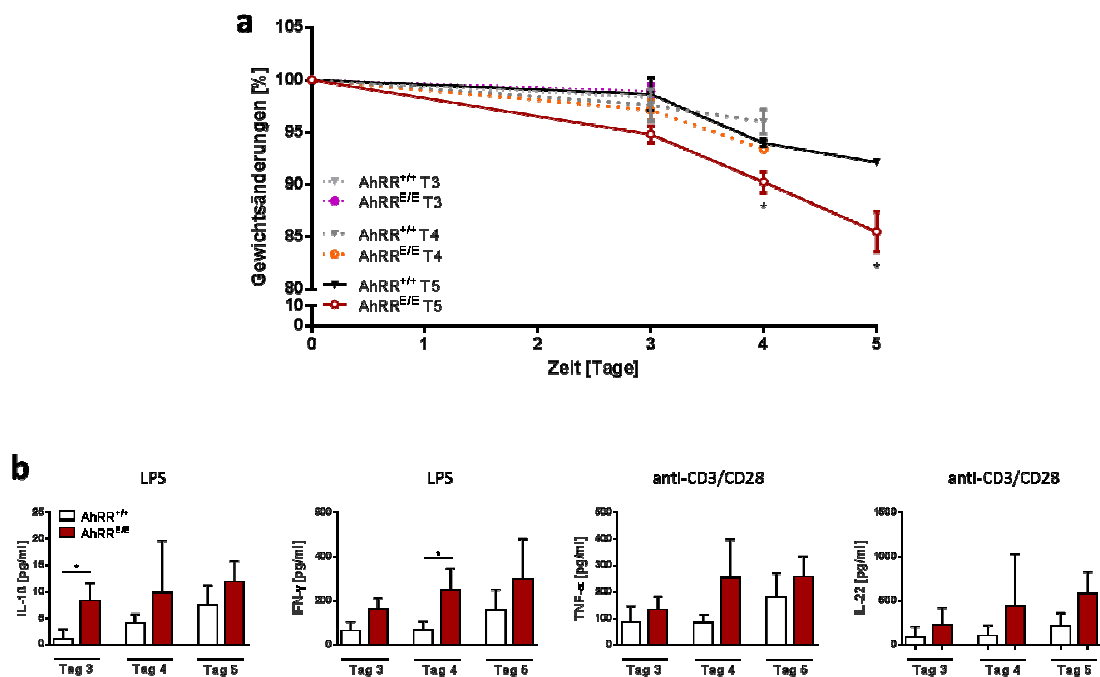
**Abb. 19: Representative Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Colons der AhRR<sup>+/+</sup>-, AhRR<sup>E/+</sup> und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse nach 8 Tagen DSS-Behandlung.** Alle Präparate sind mit DAPI gefärbt; die AhRR/EGFP-positiven Zellen sind als grün fluoreszierende Zellen zu erkennen (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 200 µm).

Als Fazit aller Untersuchungen lässt sich festhalten, dass AhRR-defiziente Mäuse stärkere Anzeichen einer Entzündung im Colon im Vergleich zu den AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen aufzeigten. Die vollständige Abwesenheit des *ahrr* in homozygoten AhRR<sup>E/E</sup>-Tieren äußert sich in massiv verdickter Darmmukosa, Kryptenabszessen, Becherzellverlust und Zellinfiltration der LP. Auch in heterozygoten AhRR<sup>E/+</sup>-Mäusen konnte ebenfalls eine stärkere Pathologie als in WT-Kontrolltieren nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf einen Gendosisseffekt zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Zellen, die nach DSS-Induktion in die Darmmukosa eingewandert sind, den AhRR exprimieren. Darüber hinaus lassen die ermittelten Gewichtsverluste, DAI Score und Colonlänge vermuten, dass der AhRR eine wichtige Rolle bei entzündlichen Darmerkrankungen spielt.



#### 4.4.2.3 Kinetik der Produktion proinflammatorischer Zytokine im Frühstadium der Colitis

Ziel des folgenden Experiments war die Ermittlung des Verlaufs der entzündlichen Erkrankung im Frühstadium anhand der Analyse der Gewichtsänderungen und des Zytokinprofils in den mLK. Dafür wurden jeweils 3 AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse 3, 4 und 5 Tage mit DSS-behandelt und die mLK entnommen. Bereits am dritten Tag des Experiments waren erste Gewichtsunterschiede zwischen den beiden analysierten Gruppen zu verzeichnen, wobei die AhRR<sup>E/E</sup>-Versuchstiere mehr Gewicht verloren als die AhRR<sup>+/+</sup>-Mäuse (Abb. 20a). Die Unterschiede im Gewicht waren im Laufe des Versuchs noch deutlicher geworden und erreichten am Tag 4 und 5 statistische Signifikanz.



**Abb. 20:** Kinetik der Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Lymphknotenzellen in den AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen nach 3, 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung. a) Gewichtsveränderungen der in diesem Experiment analysierten Mäuse. Mittelwert  $\pm$  SEM. b) Zytokinproduktion von kultivierten Lymphknotenzellen nach Restimulation mit LPS bzw. anti-CD3/CD28. n=3 Mäuse pro Gruppe. Mittelwert  $\pm$  SD. \*p<0,05.

mLK Zellen wurden 48 Stunden mit LPS oder anti-CD3/CD28 restimuliert und die Zytokinproduktion mittels ELISA analysiert. Wie aus Abb. 20b ersichtlich, stiegen die Zytokinspiegel im Laufe der DSS-Behandlung an, wobei die AhRR<sup>E/E</sup>-Zellen stärker auf LPS- bzw. anti-CD3/CD28-Restimulation

reagierten als die AhRR<sup>+/+</sup>-Zellen. Bereits am Tag 3 des Experiments setzten Zellen der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse nach LPS-Stimulation signifikant mehr IL-1 $\beta$  und am Tag 4 mehr IFN- $\gamma$  frei im Vergleich zu den Zellen der AhRR<sup>+/+</sup>-Mäuse.

Diese Daten zeigten, dass AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse schon in dem frühen Krankheitsstadium mehr an Gewicht verloren und mehr Zytokine produzierten als die AhRR<sup>+/+</sup>-Mäuse.

#### **4.5 Untersuchung der Rolle des AhRR bei der Aufrechterhaltung der Epithelbarriere des Colons**

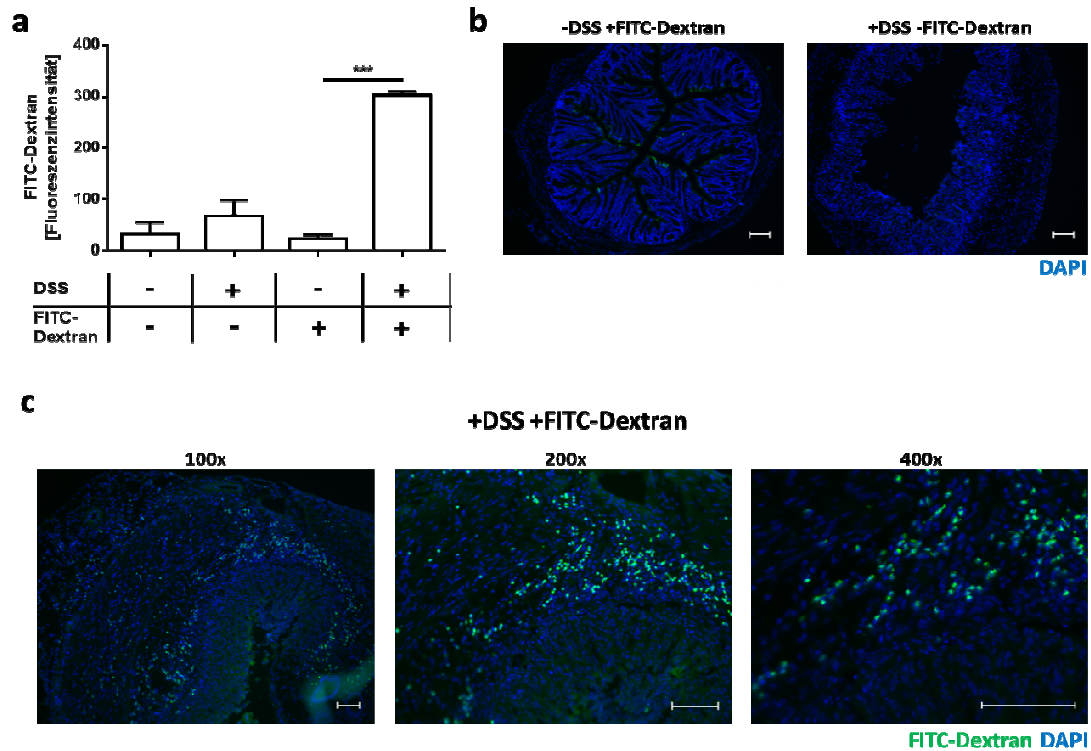
Da die DSS-Behandlung und die Entzündungsreaktionen bei Colitis die Permeabilität des Epithels verändern, wurde in weiteren Versuchen untersucht, ob es in den AhRR-defizienten Mäusen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der intestinalen Barriere kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Funktionalität der Epithelbarriere als auch der durch IgA-Antikörper vermittelte Schutz gegen die eindringenden Mikroorganismen genauer analysiert.

##### **4.5.1 Analyse der zellulären Permeabilitätsbarriere**

Die zelluläre Permeabilitätsbarriere besteht aus dem einreihigen Epithel der Mukosa, in dem die benachbarten Zellen jeweils über *tight junctions* miteinander verbunden sind (148). Eine erhöhte intestinale Permeabilität kann mit verschiedenen Markersubstanzen gemessen werden, welche vom Organismus nicht bzw. kaum verstoffwechselt werden. In den folgenden Versuchen wurde hochmolekulares Dextran, das mit FITC gekoppelt war, verwendet. Die Menge an FITC-Dextran, die nach oraler Applikation im Blut der Mäuse nachgewiesen werden konnte, war proportional zur Transportrate aus dem Darmlumen ins Blutplasma und somit ein Maß für die Permeabilität.

In Vorversuchen zur Etablierung der Methode wurden C57BL/6 WT Mäuse 7 Tage mit 5% DSS-behandelt. Anschließend wurde FITC-Dextran oral appliziert und nach 4 Stunden wurde die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran im Serum mit Hilfe eines Plattenphotometers gemessen. Zusätzlich wurden aus den Colonstücken histologische Präparate angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Wie aus Abb. 21a ersichtlich, konnte das Durchdringen des FITC-Dextran in das Gewebe und dessen Detektion im Serum nur nach Schädigung des Colonepithels durch DSS nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzintensität des FITC-Dextran im Serum war nach Colitisinduktion signifikant erhöht im Vergleich zu naiven Mäusen. Die histologischen Analysen der Colonpräparate bestätigten, dass FITC-Dextran eine intakte Darmbarriere nicht passieren konnte

(Abb. 21b). Nach der DSS-Behandlung konnten FITC-positive Zellen, vor allem in der Submukosa, in der sich Zellen des entzündlichen Infiltrats befinden, nachgewiesen werden (Abb. 21 c). Dies könnten Makrophagen sein, die eine hohe phagozytische Kapazität besitzen.

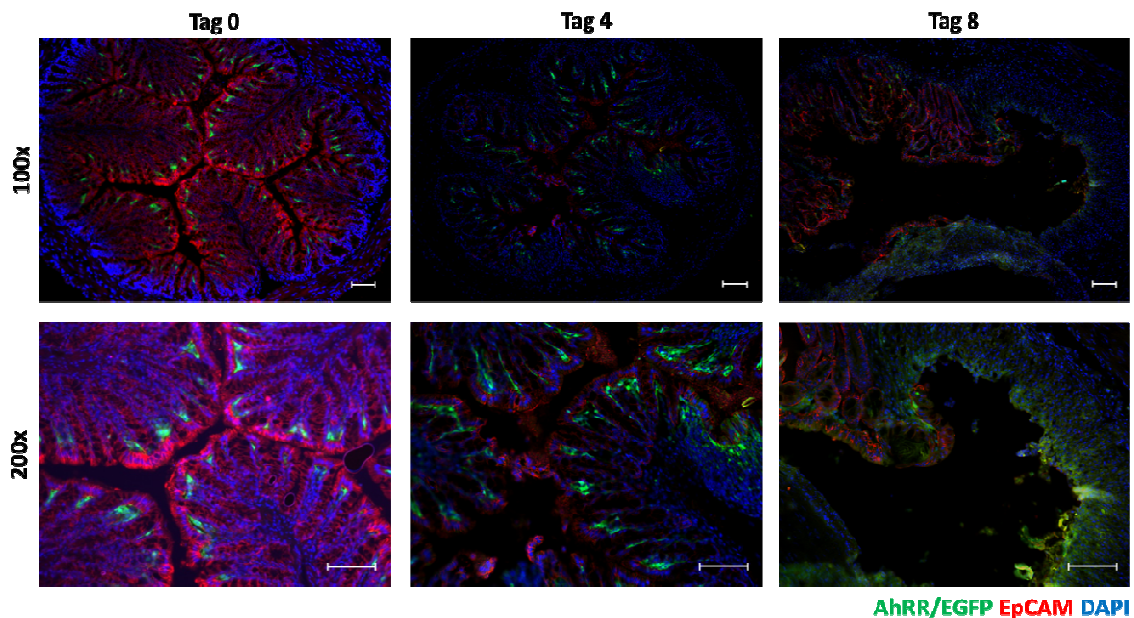


**Abb. 21: FITC-Dextran Assay zu Überprüfung der Permeabilität des Colons.** a) Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran im Serum.  $n=2-3$  C57BL/6 WT-Mäuse pro Gruppe. Mittelwert  $\pm$  SD. b) Repräsentative histologische Colonpräparate einer Maus, der 600 mg pro kg Körpergewicht FITC-Dextran peroral appliziert worden ist und einer Maus die 7 Tage mit DSS behandelt wurde (Vergrößerung 100x; Maßstabsbalken 100  $\mu$ m). c) Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Colons einer Maus, der am siebten Tag der DSS-Behandlung FITC-Dextran verabreicht worden ist. Dargestellt sind verschiedene Vergrößerungen des Colons (Vergrößerung 100x, 200x und 400x, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m).

Aus diesen Vorexperimenten lässt sich ableiten, dass die Applikation von FITC-Dextran zur Analyse der Durchlässigkeit des Darms gut geeignet ist und für die weiteren Untersuchungen der AhRR<sup>E/E</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet werden kann.

Um einen Eindruck zu erlangen, wie stark die Darmbarriere an verschiedenen Tagen nach Colitis-Induktion zerstört ist, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten aus Colongewebe mit anti-EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) Antikörpern durchgeführt. Das

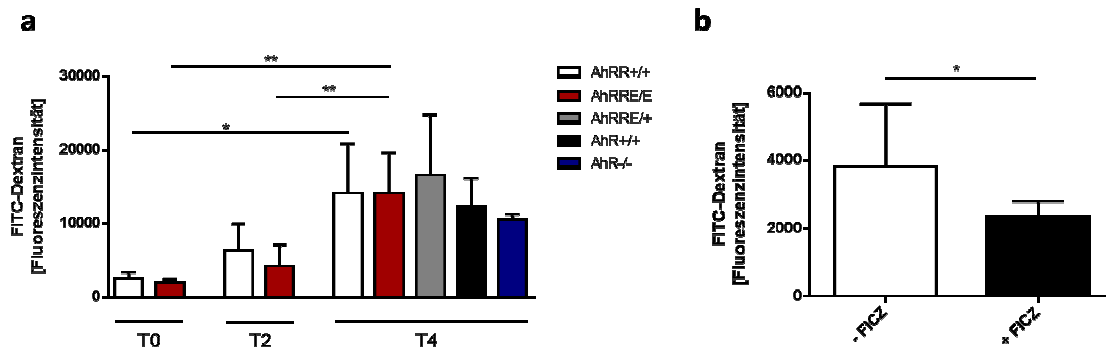
epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM ist ein Glykoprotein, das auf der basolateralen Membran epithelialer Zellen lokalisiert ist. Während in naiven Mäusen eine sehr starke EpCAM-Expression detektiert werden konnte, war die EpCAM-Expression 4 Tage nach Colitis-Induktion bereits deutlich schwächer (Abb. 22). Am Tag 8, als die Barriere schon massiv geschädigt war, konnte EpCAM nicht mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 22:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EpCAM gefärbten Colonpräparate der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse, die entweder 4 oder 8 Tage mit 5% DSS bzw. unbehandelt waren. (Vergrößerung 100x und 200x; Maßstabsbalken 100 µm). n=3-4 Mäuse pro Gruppe.

Da am Tag 4 nach Colitisinduktion die Darmbarriere bereits deutlich beeinträchtigt war und zu diesem Zeitpunkt die ersten Unterschiede in der Gewichtsveränderung zwischen AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>- Mäusen sichtbar waren, wurden die meisten Experimente zur Durchlässigkeit des Darms zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Wie aus Abb. 23a ersichtlich, war die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran im Serum am Tag 4 der Colitis bei allen analysierten Mauslinien vergleichbar. Um zu überprüfen, ob womöglich bereits bei naiven Mäusen oder im früheren Stadium der Colitis Barrieredefekte vorhanden waren, wurde FITC-Dextran auch unbehandelten Mäusen und Mäusen, die nur 2 Tage mit DSS behandelt wurden, appliziert. An beiden Zeitpunkten konnten ebenfalls keine Unterschiede in der FITC-Fluoreszenz zwischen AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Versuchstieren ermittelt werden. Die Durchlässigkeit der intraepithelialen Barriere stieg jedoch mit der Dauer der DSS-Exposition signifikant an.

Da FICZ einer der stärksten AhR-Liganden ist, sollte in weiteren Experimenten überprüft werden, ob dieser natürlich vorkommende Ligand in der Lage ist, die Durchlässigkeit des Darmepithels zu vermindern. Dafür wurden C57BL/6 Mäuse 16 Stunden vor der Applikation von FITC-Dextran peroral mit FICZ gefüttert. Die Untersuchung der Seren dieser Mäuse ergab, dass nach der FICZ-Behandlung weniger FITC-Dextran über die intraepitheliale Barriere ins Blut gelangt war und zeigt damit, dass eine starke AhR-Aktivierung die Darmbarriere in naiven Mäusen schützen kann (Abb. 23b).



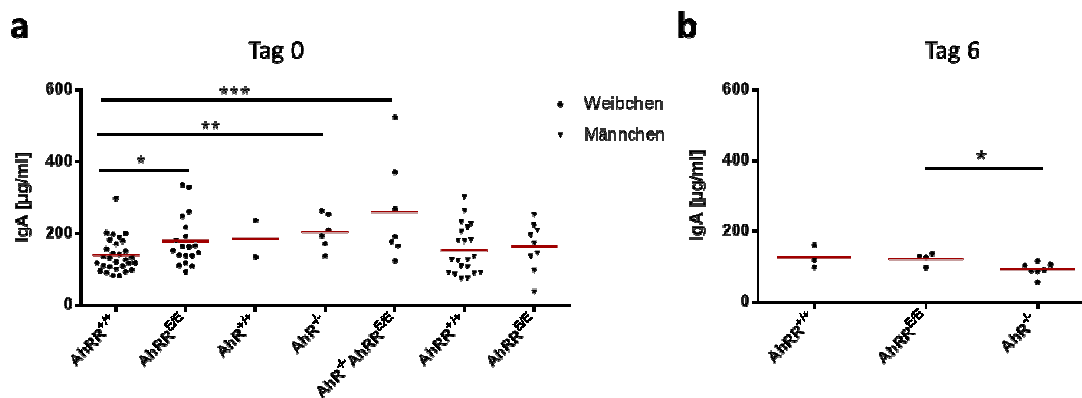
**Abb. 23: Untersuchungen zur Permeabilität des Darms anhand der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran im Serum.** a) FITC-Dextran im Serum der AhRR<sup>E/E</sup>-, AhRR<sup>E/+</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse als auch in entsprechenden WT Wurfgeschwistern am Tag 0, 2 und 4 der DSS-Behandlung. n=3 Mäuse jeweils am T0 und T2, AhR<sup>+/+</sup>- als auch AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse am Tag 4; n=5 AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse am Tag 4; n=13 jeweils AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse am Tag 4. Mittelwert ± SD. b) FITC-Dextran im Serum der mit FICZ gefütterten C57BL/6-Mäuse im Vergleich zu unbehandelten C57BL/6 Kontrollmäusen. n=7-8 Mäuse pro Gruppe. Mittelwert ± SD. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Als Fazit der Experimente zur Permeabilität der Darmschleimhaut lässt sich festhalten, dass die Überempfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Versuchsmäuse gegenüber der DSS-Behandlung sehr wahrscheinlich nicht durch eine beeinträchtigte Durchlässigkeit der Darmbarriere bei den Tieren verursacht ist.

#### 4.5.2 Untersuchung des extrinsischen Anteils der Permeabilitätsbarriere

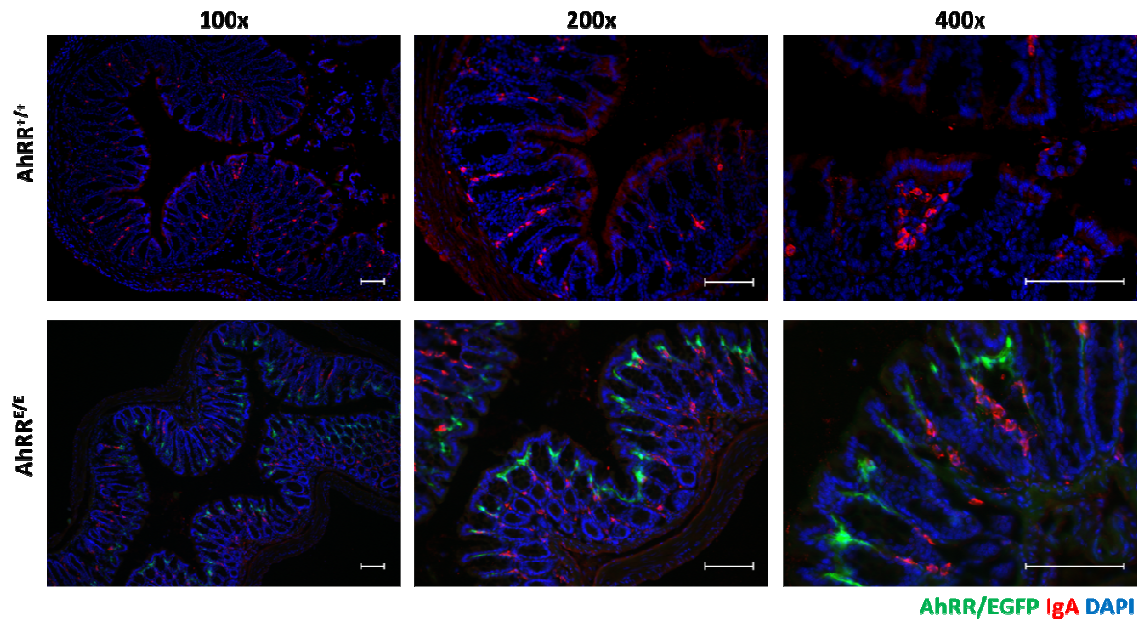
Der extrinsische Anteil der Permeabilitätsbarriere besteht hauptsächlich aus Mukus und Immunglobulinen. Vor allem das sekretorische IgA wird bei Entzündungen verstärkt ins Darmlumen freigesetzt und trägt zur Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere gegen die intestinalen Mikrobiota bei. IgA verhindert nicht nur das Eindringen von Pathogenen, sondern neutralisiert auch Toxine, sowie pathogene Mikroorganismen (149). Da in den vorherigen Experimenten kein Einfluss des AhRR auf die Permeabilität des Darmepithels nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst untersucht, ob die verstärkte Empfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber einer DSS-Behandlung

möglicherweise an einem veränderten IgA-Spiegel im Blut oder Stuhl liegt. Im folgenden Schritt wurden IgA-Titer im Serum von gesunden und an Colitis erkrankten  $AhRR^{E/E}$ - als auch  $AhR^{-/-}$ - Tieren, sowie WT-Kontrolltieren mittels ELISA verglichen. Naive, weibliche  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse besaßen signifikant mehr IgA als  $AhRR^{+/+}$ -Mäuse. Die Seren der  $AhR^{-/-}$ - und  $AhR^{-/-}AhRR^{E/E}$ -Mäuse zeichneten sich durch eine noch etwas höhere IgA-Konzentration aus. 2  $AhR^{+/+}$ -Mäuse zeigten ebenfalls höhere IgA-Spiegel im Vergleich zu  $AhRR^{+/+}$ -Mäusen, wobei dieser Ergebnis zukünftig mit einer größeren Versuchsgruppe der  $AhR^{-/-}$ -Tiere verifiziert werden muss. Männliche  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Tiere zeigten dagegen keine Unterschiede in der IgA-Menge im Blut. Am Tag 6 nach Colitis-Induktion waren die IgA-Titer insgesamt niedriger als die bei naiven Mäusen (Abb. 24b). Interessanterweise wiesen  $AhR^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen einen signifikant verringerten IgA-Spiegel auf.



**Abb. 24:** IgA Konzentrationen im Blut der  $AhRR^{E/E}$ -,  $AhR^{-/-}$ -,  $AhR^{-/-}AhRR^{E/E}$ - und WT-Mäuse am: a) Tag 0 und b) 6 Tage nach Colitis-Induktion mit DSS. (n=2-30 Mäuse pro Gruppe).

Die im Blut zirkulierenden Plasmablasten wandern durch den Organismus und gelangen schließlich zielgerecht in die LP des Dünndarms und des Colons. In der LP untergehen die Plasmablasten terminale Differenzierung und werden als reife  $IgA^+$  Plasmazellen bezeichnet. Um zunächst zu ermitteln, ob Unterschiede in der Anzahl der IgA-sezernierenden Zellen in der LP des Colons zwischen  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen bestehen, und ob diese Zellen den AhRR exprimieren, wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt. Wie in Abb. 25 dargestellt, sind die IgA-sezernierenden Zellen in der LP des Colons homogen verteilt.



**Abb. 25:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der anti-IgA gefärbten Colonschnitte aus  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen.  $n=3$ . (Vergrößerung 100x, 200x und 400x; Maßstabsbalken 100  $\mu$ m).

Es ließen sich jedoch keine offensichtlichen Unterschiede in der Anzahl der IgA-positiven Zellen zwischen  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen feststellen. Es wird aber deutlich, dass die  $IgA^+$  Plasmazellen nicht EGFP-positiv sind und somit den AhRR nicht exprimieren.

Sekretorisches IgA (sIgA) dient als ein Biomarker des Darm-assoziierten Immunsystems. Während erhöhte Stuhl-Konzentrationen von sIgA auf verstärkte Abwehrreaktionen hinweisen, weisen verminderte Werte auf eine unzureichende Produktion oder vermehrten Verbrauch hin, wie dies beispielweise bei Darminfektionen nachzuweisen ist. Es gibt außerdem Belege dafür, dass TCDD in der Muttermilch zu einer Störung der mukosalen Immunität führt. Dies kann die IgA-Spiegel im Stuhl der Jungtiere reduzieren (150). Daher wurde in einem weiteren Versuch ermittelt, ob die IgA-Konzentrationen im Stuhl bei naiven  $AhRR^{E/E-}$ ,  $AhR^{-/-}$  als auch den entsprechenden WT-Kontrollmäusen verändert sind. Dafür wurde die Menge des in den Stuhl ausgeschütteten IgA mittels ELISA erfasst. Abb. 28 zeigt, dass weibliche  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse signifikant reduzierte IgA-Konzentrationen im Stuhl im Vergleich zu  $AhRR^{+/+}$ -Mäusen aufweisen (Abb. 26). Männliche  $AhRR^{+/+}$ - und  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse weisen nur leichte Unterschiede in der Menge des sIgA auf. Die in die Analyse miteinbezogenen  $AhR^{-/-}AhRR^{E/E}$ -Mäuse wiesen einen vergleichbaren IgA-Spiegel wie die  $AhRR^{+/+}$ -Mäuse auf.

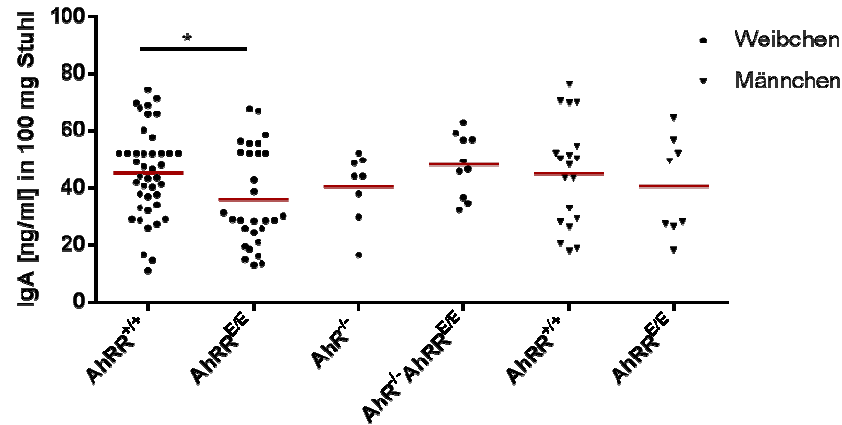


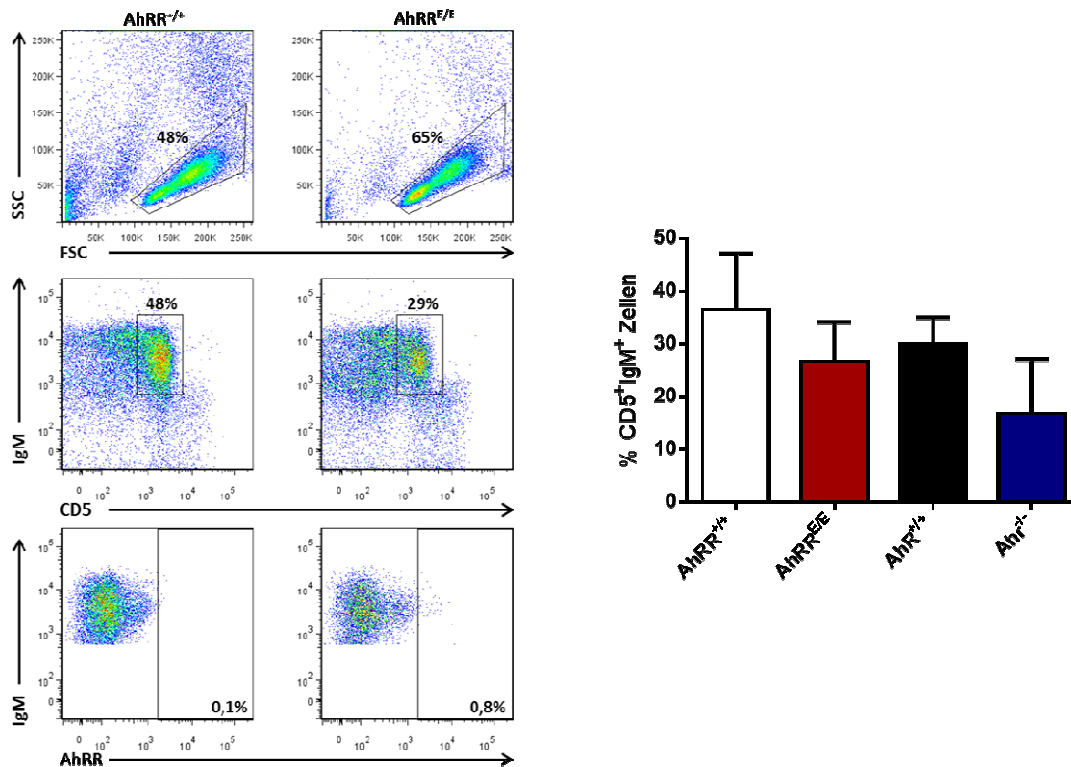
Abb. 26: IgA-Konzentrationen in Stuhlproben verschiedener Knockout- und WT-Mäuse.

Weiterhin belegen einige Studien, dass bis zu 50% der IgA-Plasmazellen in der LP von B1-Zellen der Bauchhöhle sowie B-Zellen der marginalen Zone der Milz abstammen (151, 152). Die B1-Zellen, die IgA-Antikörper sezernieren, entwickeln sich in Abhängigkeit von IL-5 aus Progenitorzellen der Bauchhöhle, wobei für ihre Entwicklung als auch für ihre Einwanderung in den Darm die Stimulation durch kommensale Bakterien eine wichtige Rolle spielt (153). Die Differenzierung der Plasmazellen aus peritonealen B1-Zellen in Antwort auf Polysaccharide der Darmbakterien geschieht unabhängig von T-Zellen (154). B1-Zellen sezernieren relativ große Mengen an IgM und exprimieren im Gegensatz zu B2-Zellen den Oberflächenmarker CD5, der u.a. auch auf T-Zellen zu finden ist.

Da bei  $AhRR^{E/E}$ -Mäusen eine verminderte IgA-Konzentration im Stuhl nachgewiesen worden ist, wurde weiterhin untersucht, ob es Unterschiede in den prozentualen Anteilen der B1-Zellen zwischen den  $AhRR^{E/E}$ -,  $AhR^{-/-}$ -Mäusen und den entsprechenden WT-Geschwistermäusen gibt. Dazu wurden Peritonealexsudatzellen durch Ausspülen aus der Bauchhöhle gewonnen und mit anti-CD5 und anti-IgM Antikörpern gefärbt.

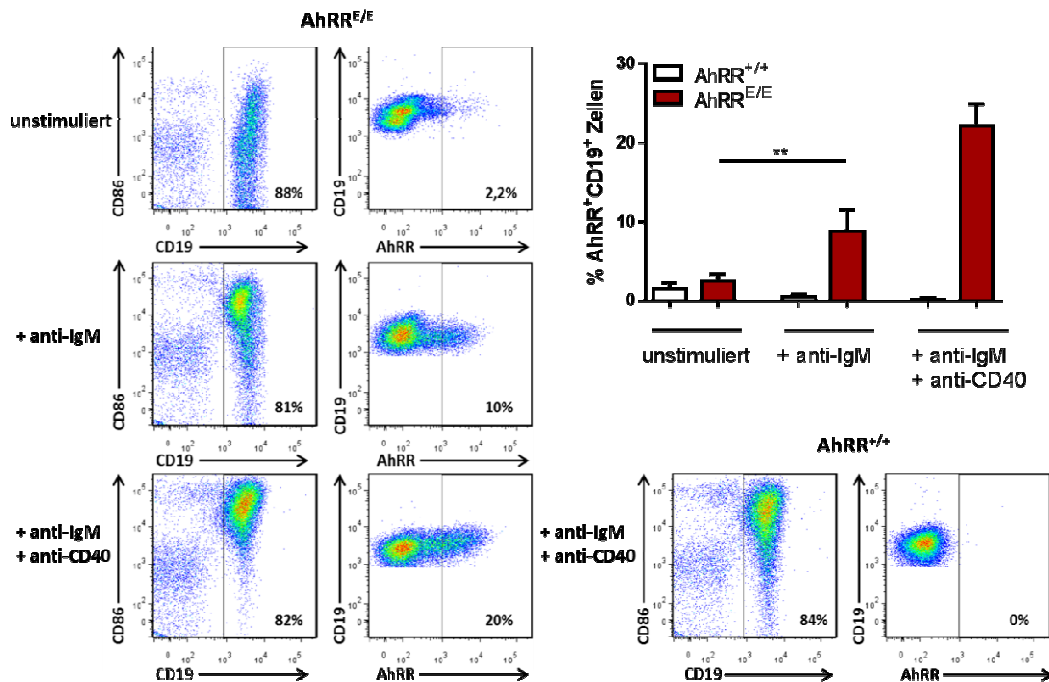
Interessanterweise waren bei  $AhRR^{E/E}$ - und  $AhR^{-/-}$ -Mäusen ca. 10% weniger  $CD5^+IgM^+$  B1-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen zu detektieren (Abb. 27). Außerdem ist zu vermerken, dass im naiven Zustand die B1-Zellen den AhRR nicht exprimierten.





**Abb. 27: FACS-Analyse von peritonealen B1-Zellen aus AhRR<sup>E/E</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie entsprechenden WT-Wurfgeschwistern.** Die FACS Diagramme auf der linken Seite zeigen beispielhaft die Gating-Strategie, nach der die CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>-Zellen aus dem Peritoneum untersucht wurden. Rechts sind die Prozentanteile der peritonealen CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>-Zellen zusammengestellt. n=2 AhR<sup>+/-</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse; n=7 AhRR<sup>+/-</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse. Mittelwert ± SD.

Um zu untersuchen, ob aktivierte B-Zellen den AhRR exprimieren, wurden peritoneale Zellen mit anti-IgM bzw. mit anti-IgM und anti-CD40 für 48 Stunden stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen CD19 und CD86 gefärbt. Anti-CD40 wurde benutzt, um die Stimulation der B-Zellen durch aktivierte CD40L<sup>+</sup> T-Helferzellen während der adaptiven Immunantwort zu imitieren. Abb. 28 zeigt, dass etwa 10% der mit anti-IgM aktivierten CD19<sup>+</sup>-Zellen den AhRR exprimierten und die Kostimulation mit anti-CD40 den prozentualen Anteil der AhRR<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>-Zellen um das Zweifache erhöhte.



**Abb. 28:** FACS-Analyse der peritonealen B-Zellen aus AhRR<sup>E/E</sup>- und AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen nach *in vitro* Stimulation mit anti-IgM oder anti-IgM und anti-CD40 Antikörpern. Die FACS-Diagramme zeigen beispielhaft die Gating-Strategie, nach der die B-Zellen untersucht wurden. Rechts sind die Prozentanteile der AhRR<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulation dargestellt. n=2 AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse mit anti-IgM/anti-CD40 stimuliert, n=4 Mäuse AhRR<sup>+/+</sup>-Mäuse unstimuliert und mit anti-IgM stimuliert; n=5 AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse unstimuliert und mit anti IgM stimuliert. Mittelwert  $\pm$  SD. \*\*p<0,01.

Zusammenfassend kann man aus diesen Experimenten schließen, dass die Abwesenheit des AhRR zu erhöhtem IgA-Titer im Serum und gleichzeitig zu reduziertem IgA-Spiegel im Stuhl führt. Ausgehend von diesen Daten lässt sich vermuten, dass der AhRR eine Rolle bei der Differenzierung von IgA<sup>+</sup>-Plasmazellen und bei der Migration der B1-Zellen in die LP spielen könnte.

#### 4.5.3 Analyse der Zellpopulationen des intestinalen Immunsystems in naiven und DSS-behandelten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen

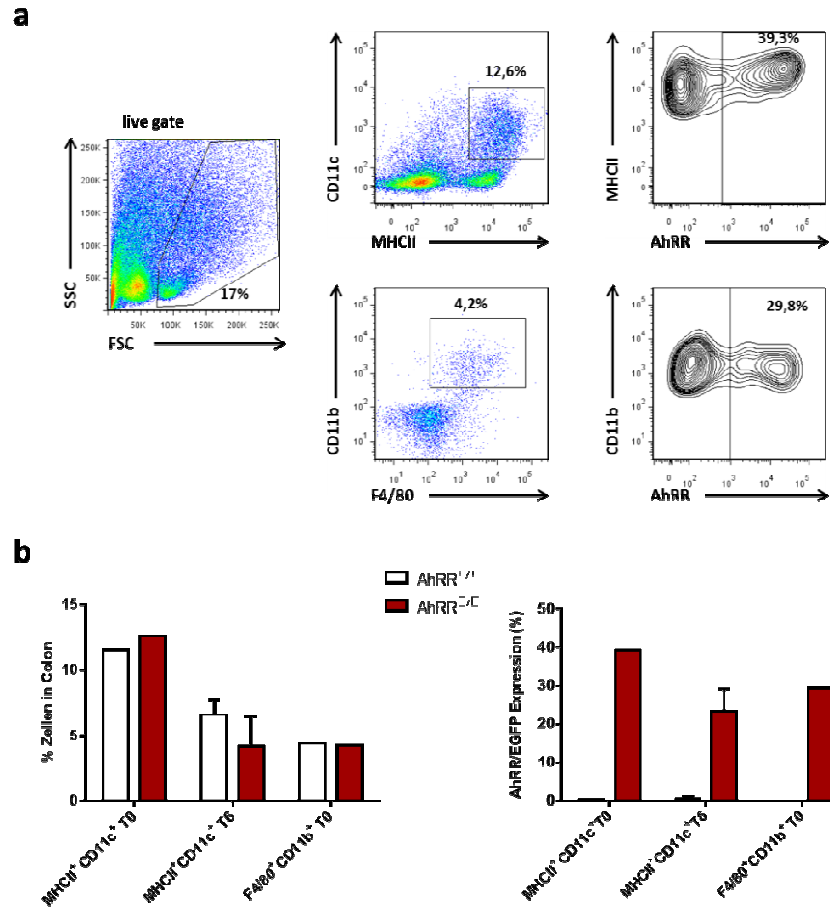
Da die vorangegangenen Experimente zeigten, dass die AhRR-Defizienz zur Überempfindlichkeit von Mäusen gegenüber DSS-Behandlung beiträgt, wurde in weiteren Versuchen die Frequenz myeloider Zellen, T-Zellen, IEL und ILC in den naiven- und Colitis-induzierten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen ermittelt.

#### 4.5.3.1 Myeloide Zellen

DC und Makrophagen nehmen eine wichtige Rolle an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität ein. Durch ihre Mustererkennungsrezeptoren sind sie in der Lage, mikrobielle Bestandteile zu erkennen und dadurch die Ausrichtung einer adaptiven Immunantwort zu beeinflussen. Daneben können diese Zellen auch direkt anti-mikrobielle Effektormoleküle produzieren. Aus diesem Grund können myeloide Zellen auch auf die Ausbildung von entzündlichen Darmerkrankungen Einfluss nehmen. Außerdem ist bekannt, dass DC von TCDD-behandelten Mäusen verstärkte stimulatorische Fähigkeiten gegenüber T-Zellen aufweisen. Dies äußert sich in einer erhöhten Expression von vor allem MHCII und CD40 (155, 156).

Die in Abb. 31 dargestellten durchflusszytometrischen Analysen veranschaulichen, dass im naiven Zustand sowohl AhRR<sup>+/-</sup>- als auch AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse etwa 12% MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC im Colon aufweisen, während nach Colitis-Induktion der prozentuale Anteil auf ca. 7% bei den AhRR<sup>+/-</sup>- und 5% bei den AhRR<sup>E/E</sup>-Tieren reduziert war (Abb. 29 a,b). Weiterhin war der Prozentanteil der AhRR-exprimierenden MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC nach der DSS Verabreichung von 40% auf 25% vermindert.

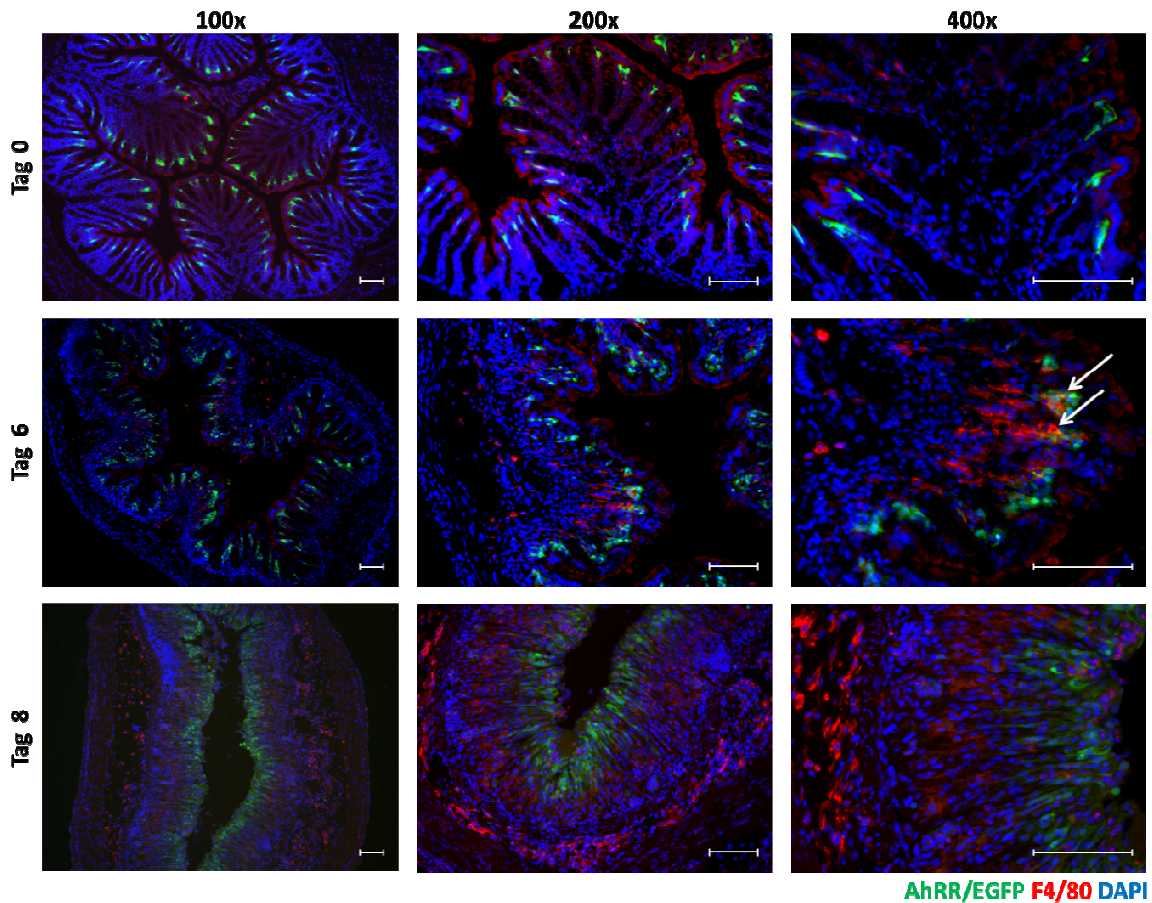
Die Defizienz des AhRR hatte keinen Einfluss auf die Frequenz der Makrophagen, da sowohl AhRR<sup>+/-</sup>- als auch AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse ca. 5% CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellen im Colon aufwiesen, von denen etwa 30% den AhRR exprimierten.



**Abb. 29:** FACS-Analyse der MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC und F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Makrophagen im Colon von AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>+/E</sup>-Mäusen. a) Die FACS Diagramme zeigen die Gating-Strategie, nach der die MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> und F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen untersucht wurden am Beispiel der unbehandelten Mäuse (T0). b) Prozentanteile der MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC und F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen als auch die Anteile der AhRR/EGFP-positiven Zellen innerhalb von diesen Subpopulationen. n=1 Maus T0 MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC und F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-Zellen; n=4 Mäuse T6 MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC. Mittelwert  $\pm$  SD.

Um genauere Aussagen treffen zu können, ob AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>+/E</sup>-Mäuse nach der Induktion von Colitis tatsächlich weniger MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC im Colon enthalten, müssen noch weitere Experimente gemacht werden. Ebenso müssen in der Zukunft die Prozentanteile der Makrophagen nach 6 Tagen DSS-Behandlung erfasst werden.

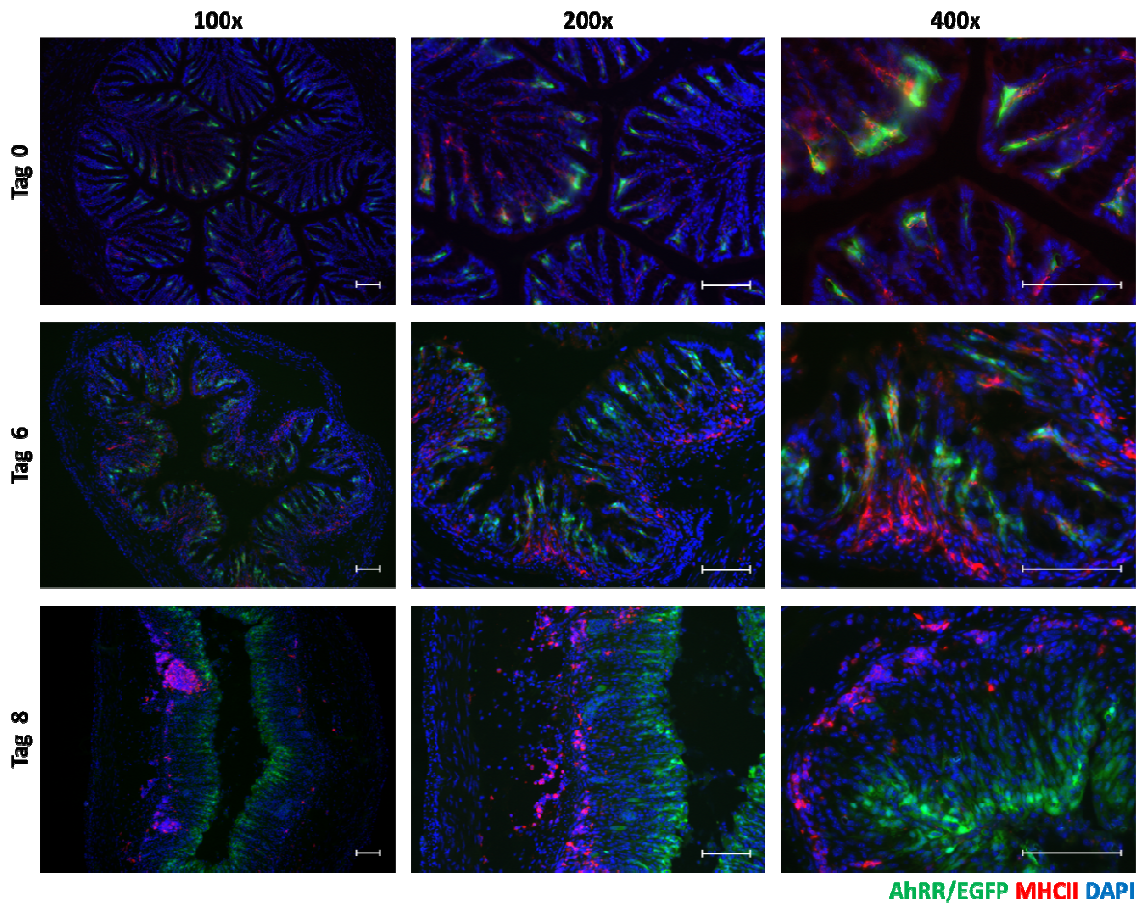
Um einen näheren Eindruck zu gewinnen, wie sich die Anzahl und die Lokalisierung der Makrophagen während des Verlaufs der Colitis verändert, wurden in Colonpräparaten aus AhRR<sup>+/E</sup>-Mäusen am T0, T6 und T8 der DSS-Behandlung F4/80<sup>+</sup>-Zellen immunhistologisch gefärbt. Bei unbehandelten Mäusen waren nur vereinzelte F4/80<sup>+</sup>-Zellen zu sehen, die den AhRR nicht exprimierten (Abb. 30)



**Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der anti-F4/80 gefärbten Colonschnitte der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse am Tag 0 als auch Tag 6 und Tag 8 nach der Colitis-Induktion.** Dargestellt sind verschiedene Vergrößerungen eines Colonabschnitts. Tag 0- n=3 in einem Experiment; T6- n=4 in einem Experiment; T8- n=2 in zwei Experimenten. (Vergrößerung 100x, 200x und 400x; Maßstabsbalken 100 µm).

Am Tag 6 nach Colitis-Induktion konnte eine massive Einwanderung von Makrophagen beobachtet werden. Zusätzlich fällt auf, dass sich die Makrophagen hauptsächlich in der Nähe der ans Darmlumen grenzenden Gewebeschichten befanden. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung konnten auch einige AhRR<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellen detektiert werden. Die Makrophagen waren am Tag 8 nach Colitis-Induktion immer noch zahlreich im Colon vorhanden, befanden sich nun aber eher in der Submucosa. Interessanterweise konnten am T8 aber keine AhRR<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellen detektiert werden.

Im Gegensatz zu F4/80 prägten im Colon naiver Mäuse viele Zellen MHCII aus, manche waren gleichzeitig auch AhRR-positiv (Abb. 31). Bei den MHCII-positiven Zellen handelt es sich wahrscheinlich hauptsächlich um DC, da sie kein F4/80 ausdragen.



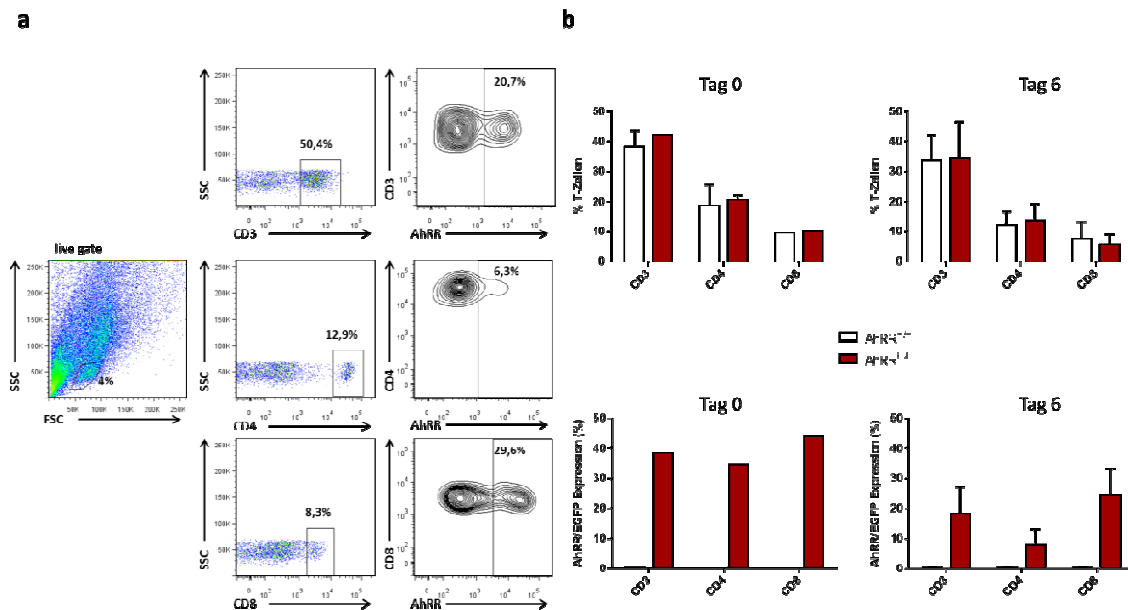
**Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der anti-MHCII gefärbten Colonschnitte der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse am Tag 0 als auch Tag 6 und Tag 8 nach Colitis-Induktion.** Dargestellt sind verschiedene Vergrößerungen eines Colonabschnitts. Tag 0 - n=3 in einem Experiment; T6 – n=4 in einem Experiment; T8 n=2 in zwei Experimenten. (Vergrößerung 100x, 200x und 400x; Maßstabsbalken 100 µm).

Am Tag 6 der Colitis konnte eine starke Infiltration von APC in die LP festgestellt werden, während sich die MHCII<sup>+</sup>-Zellen nach 8 Tagen DSS-Behandlung ähnlich wie die Makrophagen in der Submukosa lokalisierten. Am Tag 8 jedoch zeigten die APC in der Submucosa keine AhRR-Expression.

#### 4.5.3.2 T-Lymphozyten

An der Pathologie von CED ist auch eine verstärkte T-Zell Immunantwort gegenüber eigenen und fremden Antigenen aus dem Darmlumen beteiligt. Die gesteigerte T-Zellaktivierung bei mukosalen Entzündungen geht mit einer antigenspezifischen Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen einher. Da in der Literatur den CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Krankheitsentstehung zugeschrieben wird (157), wurden zunächst T-Zellpopulationen im Colon naiver und DSS-behandelter AhRR<sup>+/-</sup> und

AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse untersucht. Die Gating-Strategie zur Analyse der prozentualen Anteile der T-Zellen im Colon und deren AhRR-Expression ist in Abb. 32a dargestellt.



**Abb. 32: FACS-Analyse der T-Zellen im Colon von AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen am Tag 0 und 6 Tage nach Colitis-Induktion.** a) Die FACS Diagramme zeigen die Gating-Strategie, nach der die T-Zellen untersucht wurden am Beispiel der AhRR<sup>E/E</sup> Mäuse an Tag 6 der DSS-Behandlung. b) Prozentanteile der verschiedenen T-Zellpopulationen (CD3-, CD4-, CD8-positiven Zellen), sowie Prozentanteile der AhRR-positiven T-Zellen. n=1 AhRR<sup>+/+</sup>- und 1 AhRR<sup>E/E</sup>-Maus an T0 % CD8; T0 AhRR/EGFP-Expression in CD3-, CD4-, CD8-Zellen. n=2 AhRR<sup>+/+</sup>- und 2 AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse an T0 % CD3- und CD4-Zellen. n=5-9 Mäuse an Tag 6 der DSS-Behandlung. Mittelwert  $\pm$  SD.

Die FACS-Analysen zeigten, dass es keine Unterschiede in den Prozentanteilen der verschiedenen T-Zellpopulationen zwischen AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen gab, und dass die Induktion der Entzündung im Colon die Verhältnisse nicht veränderte (Abb. 32b). Es zeigte sich außerdem, dass sowohl am Tag 0 als auch am Tag 6 nach der DSS-Behandlung etwa 30% bis 40% aller CD3<sup>+</sup>-, 10% bis 20% aller CD4<sup>+</sup>- und etwa 10% aller CD8<sup>+</sup>-Zellen den AhRR exprimierten. Interessanterweise verringerte sich die Frequenz von AhRR<sup>+</sup>-Zellen nach der DSS Gabe um etwa die Hälfte.

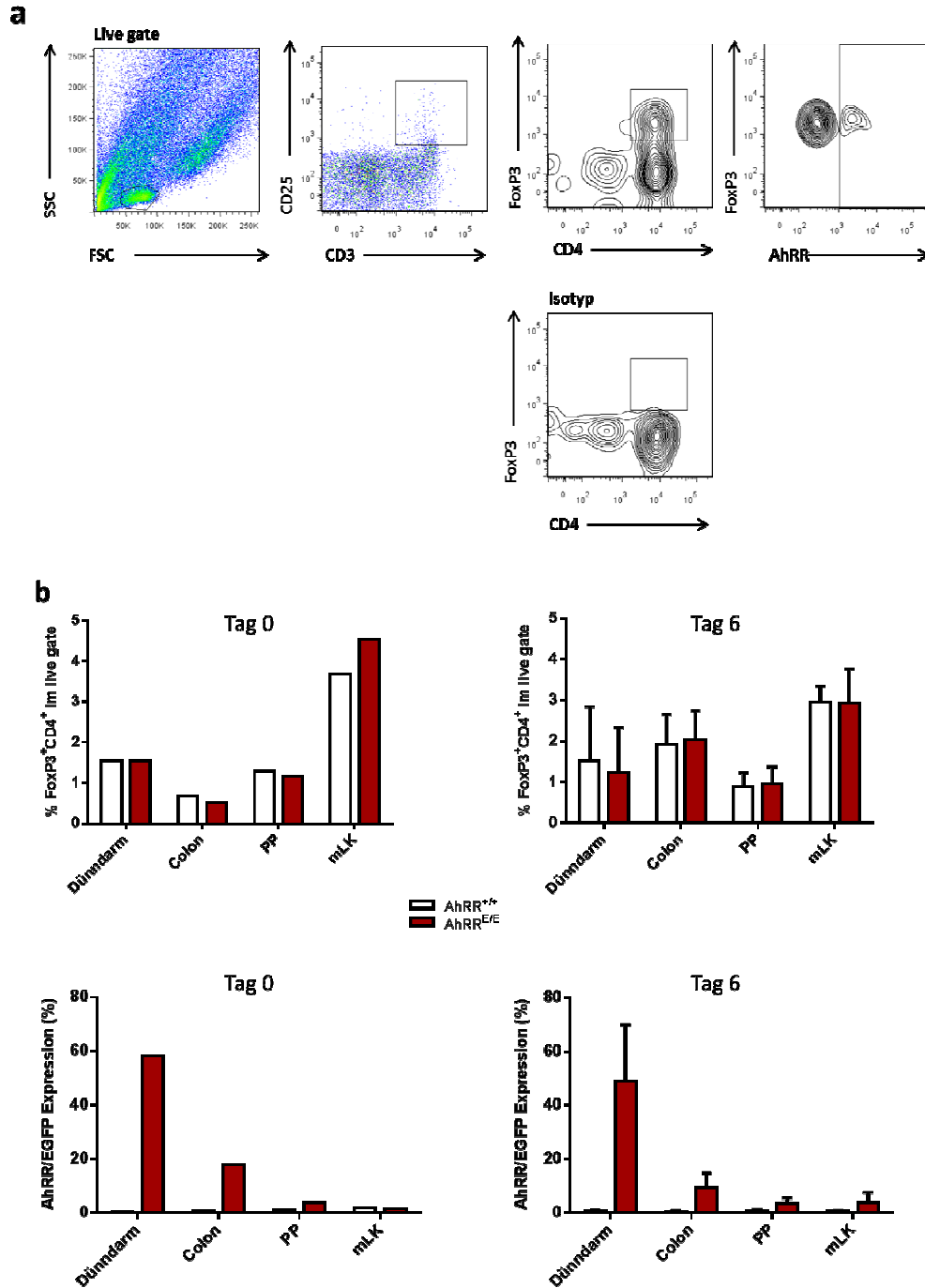
Als Fazit lässt sich festhalten, dass die Abwesenheit des AhRR weder in naiven Mäusen noch nach der Induktion von Colitis einen Einfluss auf die Frequenzen der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Colon hat.

#### 4.5.3.3 Regulatorische T-Zellen

Im gesunden Darm werden ununterbrochen Immunantworten gegen mukosale Antigene ausgelöst, die durch regulatorische Mechanismen, unter anderem auch durch regulatorische T-Zellen, die antiinflammatorische Zytokine, etwa TGF- $\beta$  und IL-10 bilden, kontrolliert werden. Ein Fehler bei der Kontrolle kann zu Toleranzverlust und CED führen. Um den prozentualen Anteil der CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg in gesunden und an Colitis erkrankten Mäusen zu bestimmen, wurden Zellen aus dem Dünndarm, dem Colon, den PP und den mLK isoliert, mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD25 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden zuerst die CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen selektioniert und aus dieser Population wurden dann die CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Zellen analysiert (Abb. 33a). Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es keine Unterschiede in den prozentualen Anteilen der Treg in allen analysierten Organen zwischen den AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen gab (Abb. 33b). Dies galt sowohl für unbehandelte als auch für DSS-behandelte Mäuse. Die Analyse der AhRR/EGFP-positiven Zellen zeigte, dass der höchste Anteil an AhRR<sup>+</sup>-Treg im Dünndarm zu finden war, wobei in naiven und DSS-behandelten Mäusen der prozentuale Anteil jeweils ca. 60% betrug. Im Colon jedoch exprimierten nur etwa 20% aller CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Zellen den AhRR konstitutiv. In den PP und mLK machten die Prozentanteile der AhRR-positiven CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Zellen nicht mehr 5% aller Treg aus.

Da es keine Unterschiede in den prozentualen Anteilen der CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>-Zellen zwischen AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen gab, kann man zusammenfassend feststellen, dass in der Abwesenheit des AhRR die Entwicklung von Treg nicht beeinträchtigt zu sein scheint und die verstärkte Empfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber einer DSS-Colitis wahrscheinlich nicht durch veränderte Treg-Anteile verursacht war. Auffallend war außerdem die starke Expression des AhRR in den Treg des Dünndarms, die aber im gleichen Zelltyp des Colons, der PP und mLK graduell verringert war. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es dennoch funktionelle Unterschiede zwischen WT- und AhRR-defizienten Treg gibt, was zukünftig noch näher untersucht werden sollte.

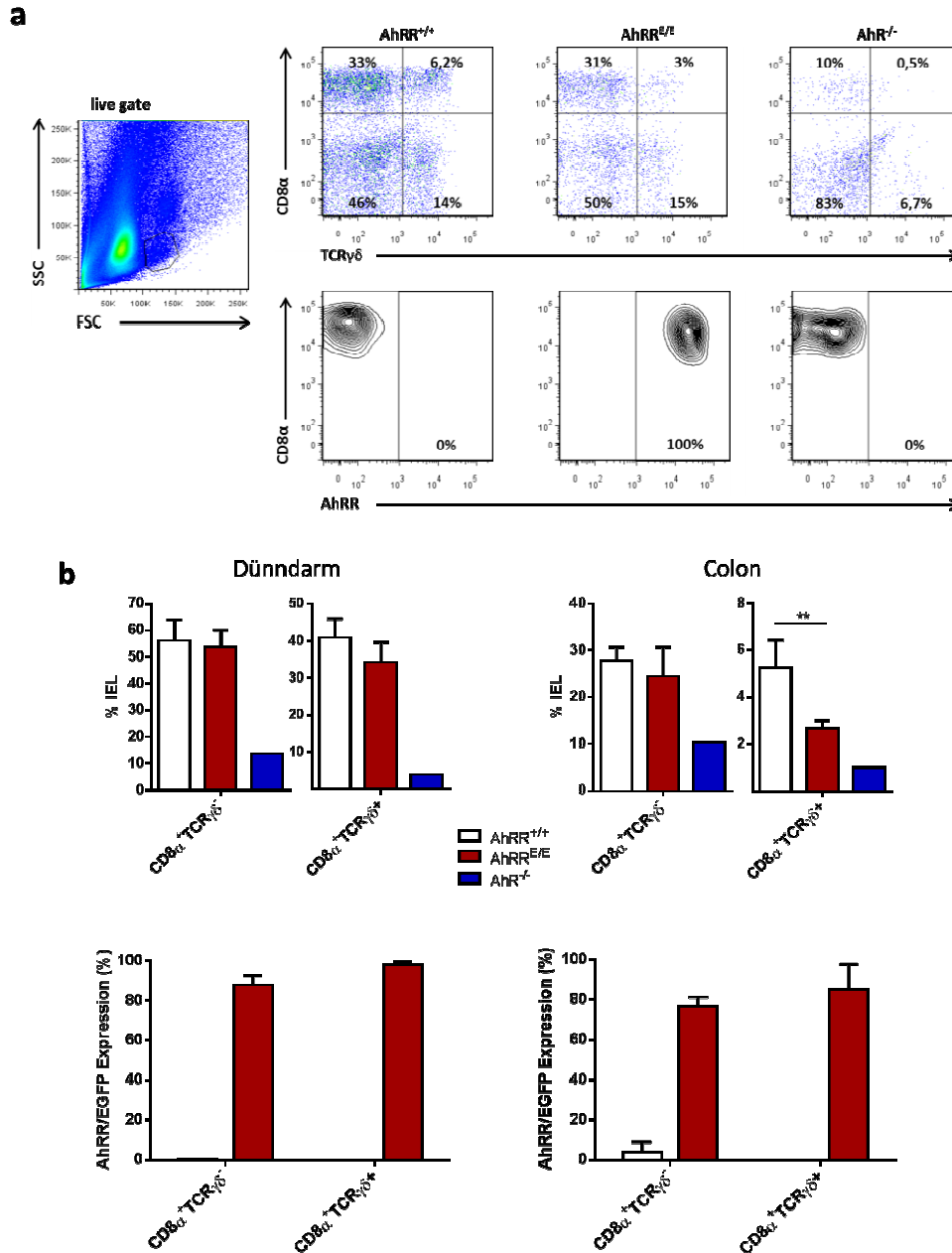




**Abb. 33** **Abb. 34:** FACS-Analyse der Treg im Dünndarm, Colon, PP und mLK von AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen am Tag 0 und Tag 6 nach Colitis-Induktion. a) Die FACS Diagramme zeigen die Gating-Strategie, nach der die Frequenz der Treg untersucht wurde am Beispiel des Dünndarms einer AhRR<sup>E/E</sup>-Maus an T6 der DSS-Behandlung. b) Dargestellt sind prozentuale Anteile der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen bezogen auf CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen sowie Prozentanteile der AhRR/EGFP-positiven FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen. n=1 Maus an T0. n=4-7 Mäuse an T6 der DSS-Behandlung. Mittelwert  $\pm$  SD.

#### 4.5.3.4 Intraepitheliale Lymphozyten

IEL dienen als Verteidigungslinie gegen die in die Mukosa eindringenden Mikroorganismen. Es ist bekannt, dass IEL in der Lage sind, die Integrität des Epithels nach physischen oder entzündlichen Schädigungen wieder herzustellen (158). Bereits mehrere Studien konnten schwere Gewebeschädigungen nach Induktion von Colitis in  $\text{TCR}\gamma\delta^{-/-}$ -Mäusen nachweisen, was auf eine protektive Rolle dieser Zellpopulation in intestinalen Entzündungen hinweist (159–161). Außerdem zeigten Li et al., dass das Fehlen des AhR oder die Abwesenheit von AhR-Liganden im Futter die Expansion der IEL beeinträchtigt, wodurch eine erhöhte Anfälligkeit der epithelialen Barriere gegenüber Schädigungen besteht (115). Abb. 35a zeigt eine beispielhafte FACS Analyse von  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^-$ - und  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen aus dem Colon naiver Mäuse, wobei die untere Reihe von Diagrammen die AhRR/EGFP-Expression in der  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellpopulation darstellt. Im Dünndarm waren die prozentualen Anteile der  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^-$ - und  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen in  $\text{AhRR}^{+/+}$ - und  $\text{AhRR}^{E/E}$ -Mäusen ähnlich (Abb. 35b). Erwartungsgemäß bestätigen die ermittelten Daten, dass die IEL im Dünndarm der  $\text{AhR}^{-/-}$ -Mäuse dezimiert waren (115). Interessanterweise waren im Colon der  $\text{AhRR}^{E/E}$ -Mäuse die  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ -Zellen, nicht aber die  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^-$ -Population im Vergleich zu den IEL der  $\text{AhRR}^{+/+}$ -Mäuse ebenfalls signifikant reduziert. Die  $\text{AhR}^{-/-}$ -Mäuse verfügten im Colon nur über ein Drittel der  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^-$ -Zellen und drastisch verminderte Prozentanteile der  $\text{CD8}\alpha^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ -IEL im Verhältnis zu WT Mäusen.



**Abb. 35:** FACS-Analyse der intraepithelialen Lymphozyten im Dünndarm und im Colon von naiven AhRR<sup>E/E</sup>-, AhR<sup>-/-</sup> und AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen. a) Die FACS Diagramme zeigen die Gating-Strategie, nach der die IEL untersucht wurden, am Beispiel des Colons. Die untere Reihe zeigt die AhRR/EGFP-Expression der CD8α<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup>-IEL. b) Prozentanteile der verschiedenen IEL (oben) und der AhRR/EGFP<sup>+</sup> IEL (unten). n=1 AhR<sup>-/-</sup>-Maus. n=4-5 AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse. Mittelwert ± SD.

Da der AhR bekanntermaßen eine Rolle bei der Expansion der IEL spielt (115), war es von besonderem Interesse, die Expression des AhRR in dieser Zellpopulation zu analysieren. Sowohl im

Dünndarm als auch im Colon exprimierten etwa 80% der  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^-$ - und  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ -IEL den AhRR konstitutiv, was für eine starke Aktivität des AhR in diesen Zellen spricht.

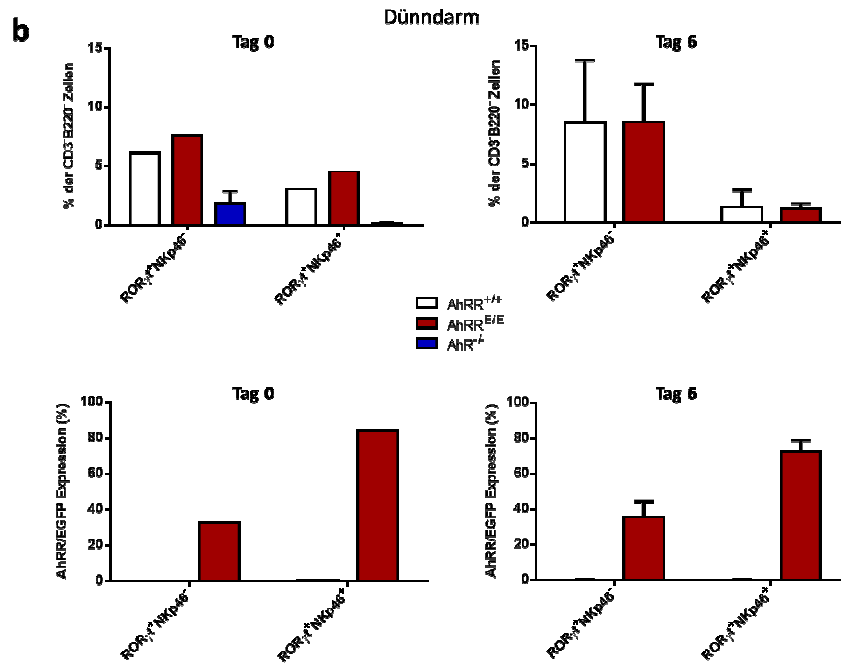
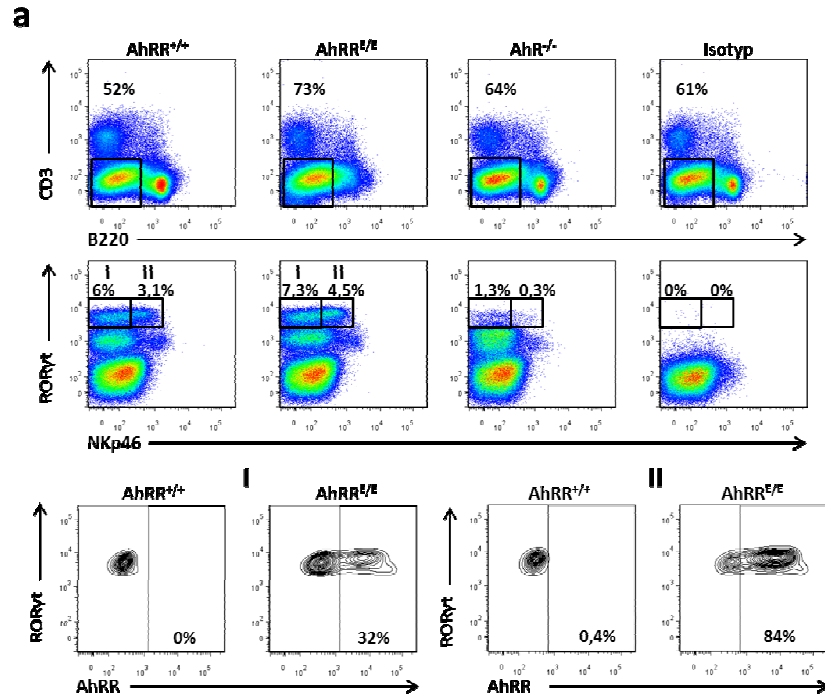
Während  $AhR^{-/-}$ -Mäuse deutlich weniger  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^-$ - und  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ -IEL in Dünndarm und Colon besitzen, zeigen  $AhRR^{E/E}$ -Mäuse nur im Colon eine signifikant verminderte Frequenz an  $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ -IEL. Dies könnte zur verstärkten Sensibilität der AhR- und AhRR-defizienten Mäuse gegenüber der DSS-induzierten Colitis beitragen.

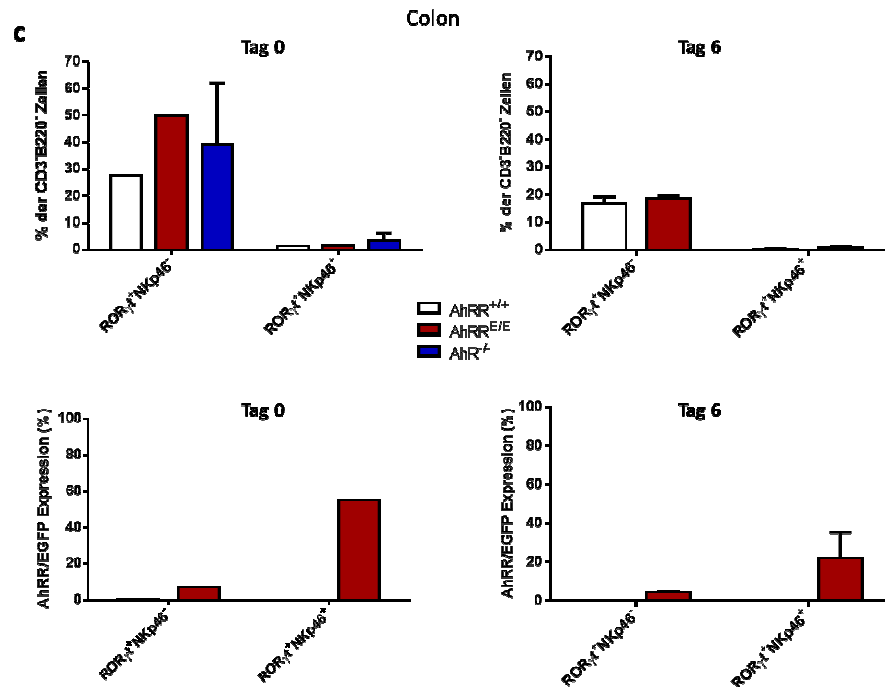
#### 4.5.3.5 Innate Lymphoid Cells

Im Unterschied zu den Zellen des adaptiven Immunsystems, die nach antigenspezifischer Stimulation zunächst klonal expandieren müssen, um eine effiziente Immunantwort zu erzielen, antworten die ILC rasch auf eine Infektion durch Pathogene und leiten unverzüglich eine Immunabwehr ein. Der AhR spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Entwicklung und Aufrechterhaltung als auch der Funktion der intestinalen  $ROR\gamma^+$ -ILC. Ohne den AhR sind die ILC nicht in der Lage, proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-17 oder IL-22 zu bilden (162). IL-22 regt vor allem die Reparatur der Darmschleimhaut an und steuert die Expression von antimikrobiellen Peptiden (129, 130). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-22 eine protektive Wirkung bei DSS-induzierter Colitis hat (131).

Es existieren zahlreiche Isolationsprotokolle, die diverse Strategien zur Ablösung der Epithelzellen, wie z.B. mechanische oder enzymatische Verfahren oder den Einsatz von Chelatbildnern, wie EDTA beinhalten. Außerdem kann die Anwendung von verschiedenen Collagenasetypen zum Gewebeverdau zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Goodyear et. al konnten zeigen, dass verschiedene Collagenasen unterschiedliche Effekte auf Zellmarker haben. Manche Collagenasen können  $CD8\alpha$ ,  $CD138$  und  $B220$  von der Zelloberfläche abbauen und verursachen gleichzeitig eine stärkere Expression von unter anderem  $CD3$ ,  $CD5$ ,  $CD11b$ ,  $CD11c$  (132).

Für die Isolation der ILC wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Collagenasen, Collagenase Typ VIII (Sigma-Aldrich) und Collagenase D (Roche), verwendet und die isolierten Zellpopulationen mittels FACS verglichen. Der Wechsel der Collagenase war notwendig, da die Collagenase VIII für einen längeren Zeitraum nicht vom Hersteller geliefert werden konnte. Da es sich bei den ILC um sogenannte *lineage negative* Zellen handelt, also Zellen, die keine Marker für reife Zellpopulationen, wie etwa für T- und B-Zellen exprimieren, wurden vorab die  $CD3^-$  und  $B220^-$  Zellpopulationen durch *Gating* ausgeschlossen (Abb. 36a).



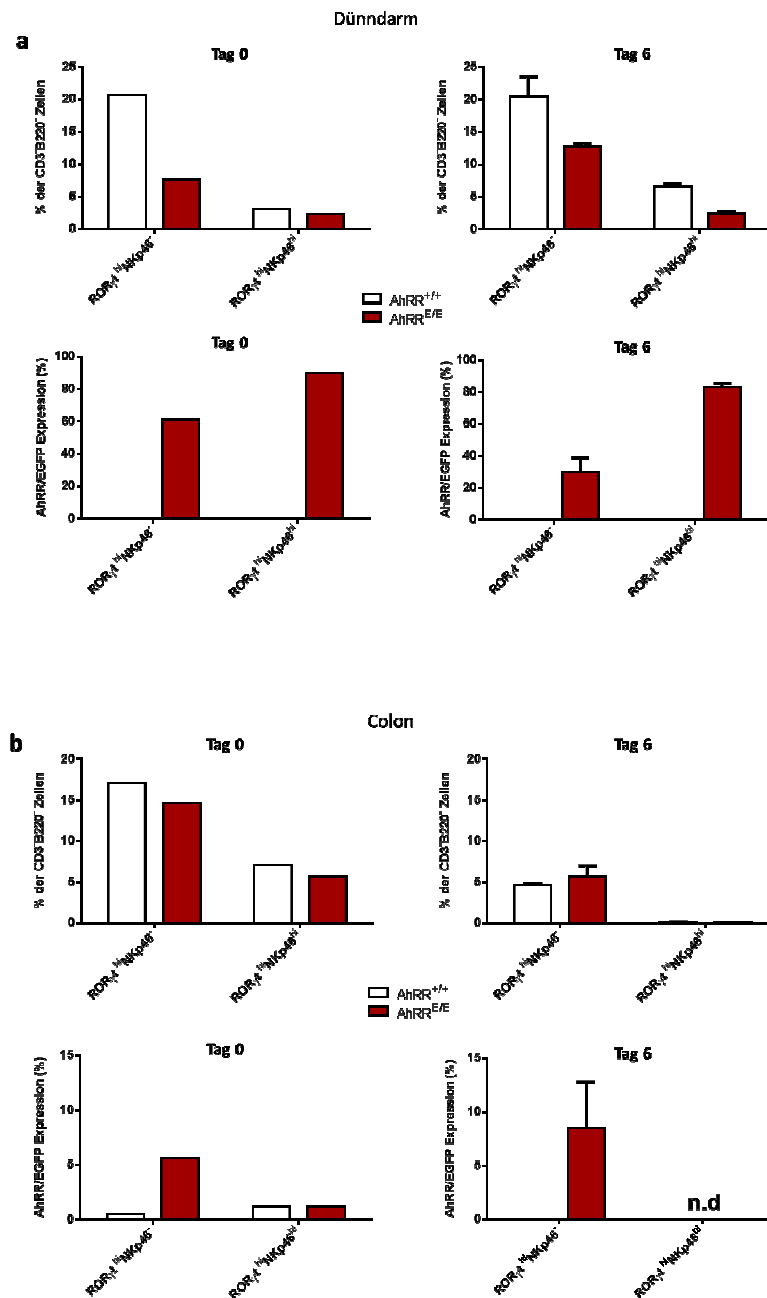


**Abb. 36: FACS-Analyse der Innate lymphoid cells im Dünndarm und im Colon der AhRR<sup>+/+</sup>, AhRR<sup>E/E</sup>- und AhR<sup>-/-</sup> Mäuse am Tag 0 und Tag 6 nach Colitis-Induktion.** Die Zellisolation erfolgte mit Collagenase VIII. a) Die FACS Diagramme zeigen die Gating-Strategie am Beispiel der Zellen aus Dünndarm am Tag 0. CD3<sup>-</sup> und B220<sup>-</sup> Zellen wurden auf ihre Expression von NKp46, RORγt und AhRR untersucht. Prozentuale Anteile der RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> (I)- und RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> (II)-ILC als auch der AhRR<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>-Zellen im Dünndarm b) und im Colon c). Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit konnten die AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse am T6 nach DSS-Behandlung nicht analysiert werden. n=1 AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>- Maus an T0. n=2 AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse an T0; n=2 AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse an T6. Mittelwert ± SD.

Eine Subpopulation der RORγt<sup>+</sup>-ILC exprimiert den NK-Zellmarker, NKp46 (133, 134). Diese RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen produzieren nur IL-22 im Gegensatz zu den LTi Zellen, die IL-17 und IL-22 sezernieren. In den folgenden Experimenten wurden die RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> und RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Populationen im Dünndarm und im Colon der naiven AhRR<sup>E/E</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse als auch der DSS-behandelten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse im Vergleich zu WT Tieren untersucht. Die prozentualen Anteile der RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> und RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen waren in den naiven AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen im Gegensatz zu den AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen im Dünndarm, nicht aber im Colon stark reduziert (Abb. 36b,c). Unbehandelte AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse zeigten leicht erhöhte Prozentanteile der RORγt<sup>+</sup>ILC in beiden Organen. Nach 6 Tagen DSS-Behandlung veränderte sich der Frequenz der Zellen in den einzelnen ILC Subpopulationen im Dünndarm und im Colon der AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse nur unwesentlich.

Deutlich andere Ergebnisse lieferte der Verdau mit Collagenase D. Die isolierten Zellen wurden genauso gefärbt und analysiert wie nach dem Verdau mit Collagenase VIII. Die Frequenzen der RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> und RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellpopulationen waren im Dünndarm der unbehandelten

AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen als auch nach DSS-Exposition im Vergleich zu den AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen reduziert (Abb. 37a).



**Abb. 37: FACS-Analyse der *Innate lymphoid cells* in Dünndarm und Colon von AhRR<sup>+/+</sup> und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen am Tag 0 und Tag 6 nach Colitis-Induktion.** Die Zellisolation erfolgte mit Collagenase D. Prozentuale Anteile der RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> und RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-ILC als auch der AhRR<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>-Zellen im a) Dünndarm und b) Colon. n=1 Maus an T0. n=2 Mäuse an T6. Mittelwert ± SD.

Der Verdau mit Collagenase D führte verglichen mit Collagenase VIII zu höheren prozentualen Anteilen der RORyt<sup>+</sup>ILC (ca. 20% der CD3<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>-Zellen) in den AhRR<sup>+/-</sup>-Mäusen, wobei die Frequenz der RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen in beiden Verdaumethoden ähnlich war. Im Colon naiver AhRR<sup>E/E</sup>-Tiere zeigte sich nach dem Einsatz von Collagenase D nur eine leichte Reduktion der RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> und RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu AhRR<sup>+/-</sup>-Tieren. Nach Colitis-Induktion ließen sich im Colon keine Unterschiede in den Prozentanteilen zwischen den beiden Mauslinien feststellen (Abb. 37b). In die Experimente mit Collagenase D konnten aufgrund mangelnder Verfügbarkeit keine AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse mit eingeschlossen werden. Aus diesem Grund konnte hier kein Vergleich zu den mit Collagenase VIII verdauten Organproben gezogen werden.

Ähnlich zu den zuvor analysierten IEL exprimierte auch ein Großteil der RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen den AhRR konstitutiv. Im Dünndarm waren unabhängig davon, ob naive oder DSS-behandelte Mäuse verglichen wurden, oder von dem verwendeten Verdauprotokoll, etwa 80% der RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen AhRR-positiv (Abb. 36b und Abb. 37a). Weiterhin zeigte die Analyse des Colons, dass nach Isolation mit Collagenase VIII etwa 60% der ILC am Tag 0 den AhRR exprimierten (Abb. 36c und Abb. 37b). Die Behandlung von Mäusen mit DSS reduzierte den Anteil der AhRR-positiven RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen um die Hälfte. Im Gegensatz dazu waren die AhRR<sup>+</sup> RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen im Colon nach dem Einsatz von Collagenase D kaum detektierbar, und der prozentuale Anteil der AhRR<sup>+</sup>RORyt<sup>+</sup>-ILC betrug ähnlich wie beim Collagenase VIII-Verdau und unabhängig von der Colitis-Induktion etwa 5-10%.

Zusammenfassend bestätigen die ermittelten Daten, dass der AhR eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der ILC im Dünndarm, aber nicht im Colon spielt. Interessanterweise exprimierten im Darm hauptsächlich die RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen den AhRR. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Art der benutzten Collagenase die prozentualen Anteile der isolierten ILC stark beeinflussen kann.

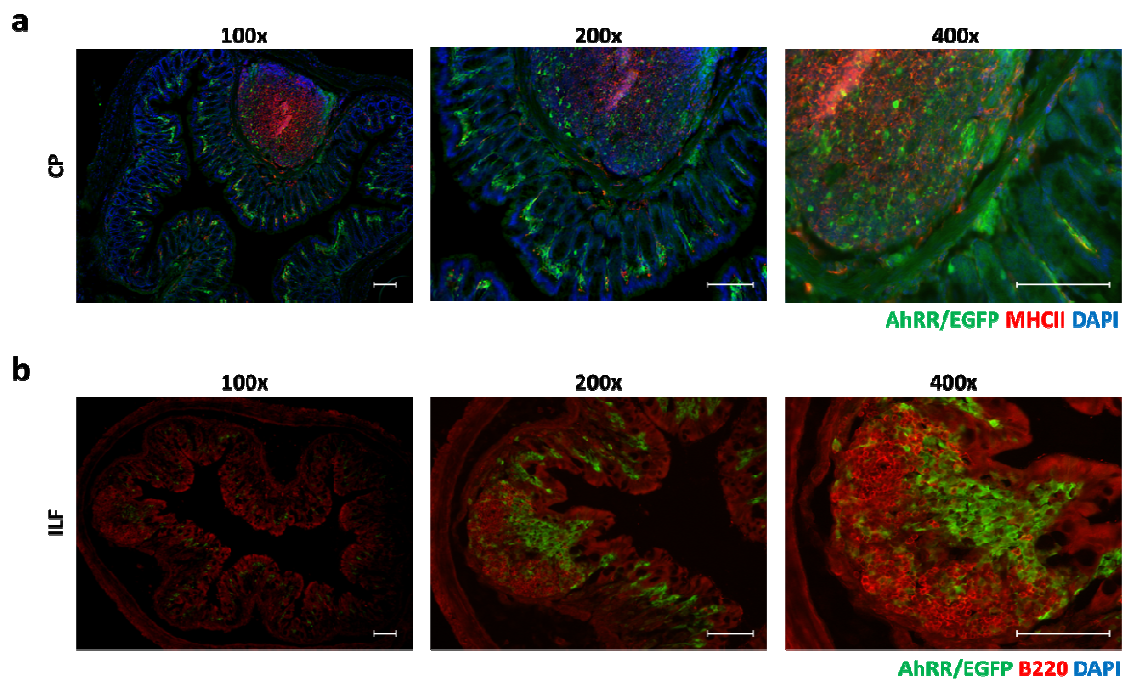
#### 4.5.4 Cryptopatches und ILF

Die RORyt<sup>+</sup>ILC sind hauptsächlich in der intestinalen LP zu finden, wo sie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Cryptopatches und ILF spielen. Signale der Mikrobiota sind in der Lage, die Konversion von Cryptopatches zu ILF durch die Akkumulation von T-Zellen, B-Zellen und DC zu unterstützen. Die Entstehung von ILF beeinflusst die Generierung von IgA-produzierenden Plasmazellen, die wiederum für die Beseitigung von Pathogenen sorgen (135).

Histologische Analysen der mit Antikörpern gegen MHCII oder B220 gefärbten Colonpräparate von mit DSS-behandelten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen erlaubten die Identifizierung von Cryptopatches und ILF. Die Strukturen zeigten Unterschiede in der Lokalisierung, Größe als auch Zellzusammensetzung (Abb. 38a). Die Cryptopatches waren als fassförmige Zellaggregate zwischen der LP und der intestinalen



Wand in der Submukosa präsent und konnten durch eine lokale Anhäufung von MHCII<sup>+</sup>-Zellen, wahrscheinlich DC, identifiziert werden. In den Cryptopatches waren die AhRR/EGFP-positiven Zellen als auch die MHCII<sup>+</sup>-Zellen zahlreich und homogen verteilt. Die relativ großen Strukturen in Form einer Kuppel mit dichten Zellansammlungen in der mukosalen Region wurden als ILF identifiziert (Abb. 38b). In den ILF konnte eine große Anzahl AhRR/EGFP-exprimierender Zellen in an das Darmlumen angrenzenden Arealen nachgewiesen werden. Weiter abluminal konnten jedoch nur vereinzelte grün fluoreszierende Zellen zwischen den B220<sup>+</sup>-Zellen detektiert werden.



**Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Colons einer AhRR<sup>E/E</sup>-Maus.** a) Dargestellt ist ein Cryptopatch in verschiedenen Vergrößerungen. Die Kryoschnitte wurden mit anti-MHCII Antikörper gefärbt. b) Dargestellt ist ein isolierter Lymphfollikel in verschiedenen Vergrößerungen. Die Kryoschnitte wurden in diesem Fall mit anti-B220 Antikörpern gefärbt. (Vergrößerung 100x, 200x und 400x; Maßstabsbalken 100 µm).

#### 4.5.5 Sequenzierungsanalyse des intestinalen Mikrobioms

Die intestinalen Mikrobiota spielen eine wichtige Rolle bei der Initiation und dem Verlauf von CED im Menschen (136). Dabei wird die Immunpathologie von einer luminalen Akkumulation von *Escherichia coli* und *Bacteroides* spp. in entzündeten Darmbezirken begleitet (102, 137).

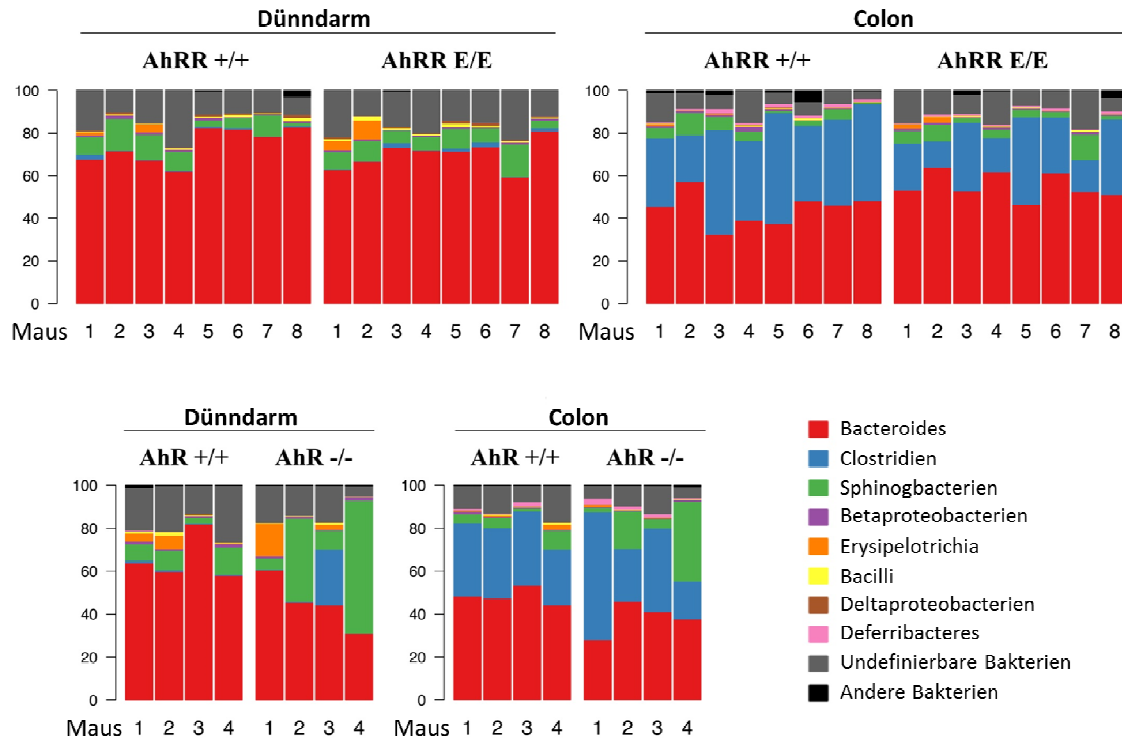
Ziel der folgenden Experimente war die Ermittlung der Zusammensetzung der Mikrobiota im Dünndarm und im Colon der AhR<sup>-/-</sup> und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse im Vergleich zu WT-Kontrolltieren. Da mehr

als 90% der Mikrobiota obligate Anaerobier sind, die sich nicht kultivieren lassen, wurde in Kooperation mit der Waseda Universität in Tokyo (Prof. H. Takeyama) eine Sequenzierungsanalyse des Mikrobioms mittels NGS von PCR-Amplifikaten der bakteriellen 16s rDNA durchgeführt. Um einen Eindruck zu erlangen, ob es zwischen den Mäusen Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung im Dünndarm und im Colon gibt, wurden DNA Proben von 8 AhRR<sup>+/+</sup>- und 8 AhRR<sup>E/E</sup> als auch jeweils 4 AhR<sup>+/+</sup>- und AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen.

Die Zusammensetzung des Mikrobioms schien im Dünndarm der AhR<sup>+/+</sup>-, AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse ähnlich zu sein (Abb. 39). Dabei machte die Gattung *Bacteroides* etwa 60-80% aller Kommensalen aus und dominierte zahlenmäßig im Dünndarm. Die zweitgrößte Gruppe mit 10-15% der Darmbakterien stellten die *Sphingobacterien* dar. Es fällt auf, dass sich die vier AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse durch starke Diversität der bakteriellen Populationen im Dünndarm auszeichneten. Der prozentuale Anteil der Gattung *Bacteroides* lag hier zwischen 20 und 60% und der der *Sphingobacterien* zwischen 10 und 60% aller identifizierten Bakterien. Bei der AhR<sup>-/-</sup>-Maus mit Nummer 3 wurden außerdem erhebliche Mengen von grampositiven *Clostridien* detektiert.

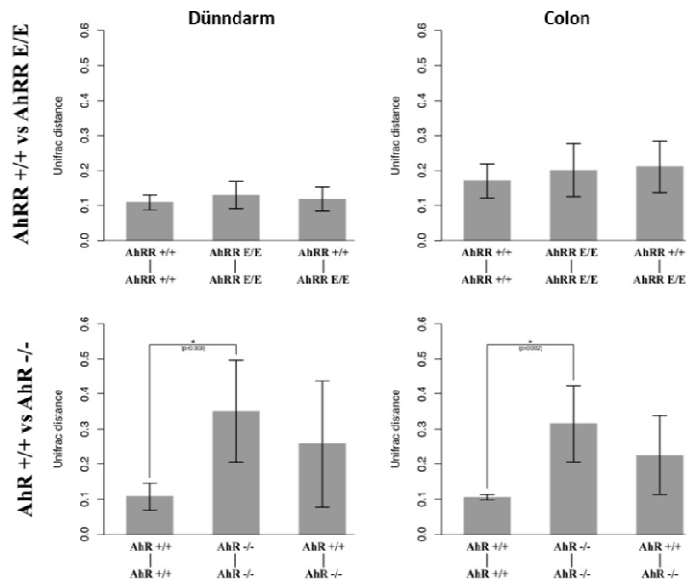
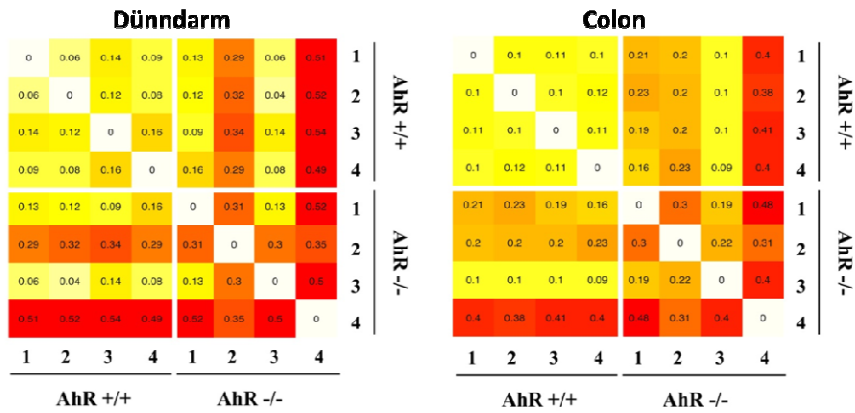
Auf der Basis der Auswertung der bakteriellen Besiedlung des Colons lassen sich leichte Unterschiede zwischen AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen ableiten. Zu beobachten ist, dass AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse insgesamt mehr *Bacteroides* und weniger *Sphingobacterien* im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Tieren aufweisen.

Bei der Analyse der bakteriellen Komposition im Colon der AhR<sup>-/-</sup>- und AhR<sup>+/+</sup>-Mäuse zeigten sich ähnlich wie im Dünndarm erhebliche Unterschiede in der prozentualen Anteilen der *Bacteroides* und *Clostridien*.



**Abb. 39: Untersuchungsergebnisse der Sequenzierungsanalyse der bakteriellen 16s rDNA aus dem Dünndarm- und Coloninhalt der  $AhRR^{E/E}$ ,  $AhR^{-/-}$  und entsprechender WT-Wurfgeschwister (n=4-8 Mäuse pro Gruppe). Die Sequenzierung wurde von Dr. Tetsushi Mori und die bioinformatische Auswertung von Toru Maruyama durchgeführt.**

Weiterhin wurde bei dem durch die Sequenzierung gewonnenen Datensatz eine statistische Analyse durchgeführt, die die phylogenetische Information zu den einzelnen OTU (*operational taxonomic unit*) mit einbezieht (UniFrac-Analyse). Mittels UniFrac konnte bestimmt werden, wie stark sich die Artenspektren tatsächlich unterscheiden, und ob die bakteriellen Gemeinschaften der verschiedenen Mäuse, sowohl bezogen auf die An- und Abwesenheit von Bakterienspecies, als auch auf die phylogenetische Herkunft der Bakterien unterschiedlich waren. Diese Ergebnisse unterstützten die Beobachtung, dass sich die  $AhR^{-/-}$  Mäuse durch hohe Variabilität der bakteriellen Komposition auszeichnen (Abb. 40).



**Abb. 40: UniFrac** basierte Clusteranalyse der Verteilung der unterschiedlichen bakteriellen Gemeinschaften in AhR<sup>-/-</sup>, AhRR<sup>E/E</sup>- und den entsprechenden WT-Mäusen. Die UniFrac Analyse wurde von Toru Maruyama an der Waseda Universität in Tokyo durchgeführt.

## Diskussion

Der AhR gilt seit langem als ein biologischer Sensor, der Chemikalien der Umwelt erkennt und Signale in den Kern vermittelt. Ursprünglich wurde er wegen der Vermittlung der Toxizität von Dioxin bekannt. Als Transkriptionsfaktor überträgt er so Informationen aus der Umgebung auf die DNA und reguliert dabei die Transkription bestimmter Gene. Zu den am besten erforschten Zielgenen des AhR gehören in erster Linie fremdstoffmetabolisierende Enzyme, die Liganden des AhR verstoffwechseln können.

Es ist aber auch bekannt, dass der AhR nicht nur als Sensor für Umweltchemikalien eine gravierende Rolle spielt, sondern auch wichtige Aufgaben bei Zellwachstum, -tod und -migration hat. Außerdem hat der AhR wichtige Funktionen im Immunsystem. Die transkriptionelle Aktivität des AhR wird über verschiedene Faktoren gesteuert, unter anderem über den AhRR, der über einen negativen Rückkopplungsmechanismus als ein Regulator des AhR-Signalwegs fungiert. In Rahmen dieser Dissertation wurde die konstitutive und durch AhR-Liganden induzierte AhRR-Expression als auch die Rolle des AhRR in der Immunregulation untersucht. Da vor allem Darm und Haut den AhRR stark exprimieren und an keiner Stelle des Immunsystems die unmittelbare Umwelt so viel Einfluss auf die Immunabwehr hat wie im Darm, wurde ein besonderer Fokus dieser Arbeit auf die Analyse der Zellen des darmassoziierten Immunsystems gelegt.

Um die Ausprägung des AhRR ermitteln zu können, wurden in unserer Gruppe AhRR/EGFP Knock-in Mäuse generiert, in denen die kodierende Region des AhRR durch eine EGFP-Kassette ersetzt wurde. Vorexperimente zeigten bereits, dass fast alle DC in der LP des Dünndarms den AhRR ausprägen, wobei die Prozentanteile der AhRR-exprimierenden Zellen in Organen wie PP und mLK, die weiter entfernt vom Darmlumen liegen, im Vergleich zu Zellen der LP reduziert war. AhRR-positive T-Zellen konnten im Dünndarm und PP, aber nicht in den mLK identifiziert werden. Aus Analysen von AhR<sup>-/-</sup> AhRR<sup>E/E</sup>-Doppelknockout-Mäusen hat sich ergeben, dass die AhRR-Expression im Dünndarm und Colon vollständig, in den PP und mLK jedoch nur partiell von einer AhR-Aktivierung abhängt. Außerdem konnte durch Füttern der Tiere mit Curcumin und Quercetin, als auch der Verwendung von ALR-Futter gezeigt werden, dass Nahrungsbestandteile eine besonders wichtige Rolle bei der Ausprägung der AhRR-Expression spielen.

Zweiter Schwerpunkt der Arbeit war die Ermittlung der Funktion des AhRR im darmassoziierten Immunsystem. Bereits mehrere tierexperimentelle Studien wiesen auf eine Bedeutung des AhR bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm hin. Beispielsweise zeigten AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse eine stärkere intestinale Entzündungsreaktion als WT-Mäuse im Mausmodell der DSS-induzierten Colitis.

Da der AhRR als negativer Regulator des AhR gilt, wurde erwartet, dass AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber einer DSS-Behandlung geschützt sind. Die hier ermittelten Daten zeigten jedoch eindeutig, dass auch das Fehlen des AhRR zur Überempfindlichkeit der Mäuse gegenüber einer DSS-induzierten Colitis führt. Im Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Mechanismen diesem stärkeren Verlauf der entzündlichen Erkrankung bei AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen zugrunde liegen. Als mögliche Ursache der stärkeren Manifestation der Colitis Symptome scheint der reduzierte prozentuale Anteil der IEL im Colon als auch reduzierte Mengen von IgA in Stuhlproben von AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen plausibel und naheliegend zu sein.

### 5.1 AhRR-Expression in verschiedenen Organen und ihre Abhängigkeit von der Anwesenheit des AhR

Da EGFP innerhalb der Zelle möglicherweise eine andere Stabilität besitzt als der AhRR, stellte sich die Frage in wie weit die Expression von EGFP mit der Expression des endogenen *ahrr* Gens korreliert. Um zu untersuchen in welchen Organen der endogene *ahrr* exprimiert wird, wurden RT-PCR Analysen von Leber, Lunge, Haut, Dünndarm, PP und mLK von WT C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Vor allem Barriereorgane, wie Haut und Darm, zeigten *ahrr* Expression. Außerdem prägten die Organe des darmassoziierten Immunsystems, wie PP und mLK den AhRR relativ stark aus. Im Gegensatz dazu konnte in Leber und Lunge erstaunlicherweise keine *ahrr* Expression detektiert werden. Mikroskopische Analysen, der mit alkalischer Phosphatase gefärbten Leberschnitte, bestätigten die RT-PCR Ergebnisse und wiesen ebenfalls keine EGFP-exprimierenden Zellen auf (Daten nicht gezeigt). Auch die perorale und intraperitoneale Behandlung von AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen mit LPS und 3-MC führte nicht zur Induktion des AhRR in der Leber (Daten nicht gezeigt). RT-PCR Analysen der Zellen aus AhRR<sup>+/-</sup>, AhRR<sup>E/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen, die auf eine starke Expression des endogenen *ahrr* in Dünndarm, PP und mLK hindeuten, spiegelten die zuvor in unserer Arbeitsgruppe mittels FACS-Messung generierten Ergebnisse wider. Auf Proteinebene konnte in den Vorexperimenten eine starke konstitutive AhRR/EGFP-Expression in der Haut und im darmassoziierten Immunsystem beobachtet werden (H. Weighardt, O. Brandstätter, I. Förster, unpubliziert). Die quantitativen FACS-Analysen ergeben außerdem, dass die Ausprägung des AhRR nicht nur gewebespezifisch sondern auch zellspezifisch war. Beispielsweise waren fast alle DC in der LP des Dünndarms AhRR-positiv, wobei deren prozentualen Anteile in den Organen, die weiter entfernt vom Darmlumen liegen, wie PP und mLK, reduziert waren. Gleichermassen konnten nur im Dünndarm und in den PP AhRR-positive T-Zellen identifiziert werden, im mLK jedoch waren die T-Zellen AhRR negativ.

Ähnliche Resultate lieferten Untersuchungen von Bernshausen et al. in denen die konstitutive AhRR-Expression in Leber und Lunge aber auch in Ovar, Testis, Milz sowie Thymus relativ gering war, wobei in Herz und Hirn hohe Mengen an AhRR-Transkripten nachgewiesen werden konnten (163). Zugleich ermittelte die Analyse menschlicher Organe eine hohe Kopienzahl des AhRR in Lunge, Ovar, Testis und Milz (164, 165). Wobei im Humansystem die höchste CYP1A1-Expression in der Lunge beobachtet wurde, was darauf hindeutet, dass der AhRR nicht immer effektiv die Transkription der AhR-regulierten Gene supprimiert (165).

Die Leber als hochspezialisiertes Entgiftungsorgan benötigt eine Vielzahl von Enzymen aus der Familie der CYP450 Enzyme für Phase I-Reaktionen um hydrophobe Chemikalien zu verstoffwechseln. Die Aktivierung des AhR in diesem Organ wurde besonderes gut erforscht. Durch die hier gewonnenen Daten könnte spekuliert werden, dass die durch AhRR verminderte Aktivität des AhR für die Metabolisierungsprozesse von toxischen Stoffen hinderlich wäre, so dass die Expression des AhRR in der Leber gezielt unterdrückt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zum ersten Mal eine konstitutive Expression des AhRR im Colon mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS Analyse nachgewiesen. Die mikroskopischen Untersuchungen der mit DAPI gegengefärbten Colonschnitte der AhRR/EGFP-Mäuse offenbarten die Präsenz von EGFP-positiven Zellen in unmittelbarer Nähe der Epithelschicht. Zwischen den Epithelzellen konnten ebenfalls grüne Zellen detektiert werden. Die FACS Messungen der aus LP des Colons isolierten und gefärbten Zellen zeigten, dass ca. 30% der Makrophagen als auch ca. 40% der MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC und ähnliche Prozentanteile der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen den AhRR konstitutiv exprimieren. Somit war der Anteil der AhRR<sup>+</sup>-DC im Colon, im Vergleich zum Dünndarm, um die Hälfte reduziert, während die Frequenzen der anderen AhRR<sup>+</sup>-Zellpopulationen in beiden Organen vergleichbar waren.

Interessant ist dabei jedoch eine Diskrepanz zwischen den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen und den Literaturdaten, die beschreiben, dass im Darm von Mäusen keine konstitutive AhRR-Expression zu finden ist (82, 166). Es könnte sein, dass die dafür verwendete PCR-Technik nicht sensitiv genug war, um die geringen Mengen an Transkripten zu detektieren. Die Analyse der EGFP Reporter-Mäuse via FACS liefert im Gegensatz dazu viel höhere Sensitivität um die Expression des AhRR in einzelnen Zellen zu untersuchen.

Basierend auf einer umfangreichen Mikroarray-Analyse von Immunzellen wurde eine ubiquitäre Expression des AhR im Immunsystem angenommen (167). Die Expression des AhR wurde bislang nur mit Hilfe von Mikroarray-Analysen, qPCR und Western Blot-Analysen von Organen, jedoch nicht auf Einzelzellebene ermittelt. Aus diesem Grund ist eine Interpretation der biologischen Signifikanz dieser Ergebnisse wegen der Heterogenität von Zellgemischen eines Organs sehr schwierig. So kann

eine niedrige Expression in vielen Zelltypen oder eine erhöhte Expression in einem Zelltyp, der nicht häufig vorkommt, im Westernblot die gleiche Expressionsstärke aufweisen. Beispielsweise exprimieren IL-17 produzierende Th-17 Zellen erhöhte Mengen des AhR, obwohl sie nicht zahlreich im unstimulierten Immunsystem vorkommen und weniger als 1% der gesamten CD4 T-Zellen ausmachen (105). Deswegen könnte die so ermittelte AhR-Expression fälschlicherweise als sehr schwach und in allen T-Zellen anwesend interpretiert werden.

Wie die in dieser Arbeit dargestellten Analysen und die Angaben in der Literatur zeigen, variiert die Expression des AhR und seines Repressors sehr stark in verschiedenen Organen und Zellen. Interessant ist jedoch, dass obwohl der AhR ubiquitär exprimiert ist, sich die Expression des AhRR vor allem auf die Barriereorgane beschränkt.

### 5.1.1 Kanonische und nicht-kanonische Signalwege zur Aktivierung des AhRR

Um Erkenntnisse über die Abhängigkeit der AhRR-Expression von der Anwesenheit des AhR zu gewinnen, wurden AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse untersucht. In der LP des Dünndarms und Colons der AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse konnten keine EGFP-positiven Zellen detektiert werden, was dafür spricht, dass in der Abwesenheit des AhR keine Transkription des AhRR in diesen Lokalisationen stattfindet. Interessanterweise konnten aber in PP und mLK der AhR<sup>-/-</sup>AhRR<sup>E/+</sup>-Mäuse grün fluoreszierende Zellen gefunden werden. Diese Zellen konnten als MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC identifiziert werden. Histologische Untersuchungen der Haut zeigten ebenfalls eine AhR-unabhängige Transkription des AhRR. Somit konnte in dieser Studie nun erstmals belegt werden, dass eine Aufregulation des AhRR neben AhR-Aktivierung auch durch andere Mechanismen hervorgerufen werden kann. Bereits Baba et al. konnten zeigen, dass die AhRR-Expression durch GC-Boxen und eine NF-κB Bindungsstelle im AhRR-Promoter gesteuert werden kann (83). In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte über Interaktionen des AhR mit Mitgliedern der NF-κB Familie, etwa RelA und RelB, was auf einen nicht kanonischen Signalweg hinweist (168, 169). Proteine der NF-κB/Rel Familie sind Transkriptionsfaktoren, die eine essentielle Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. der erworbenen und angeborenen Immunität, bei Entzündungsreaktionen, als auch bei Proliferation und Differenzierung von Zellen, sowie Apoptose spielen. Ein AhR/RelB Dimer ist in der Lage an die XRE als auch an die NF-κB Bindestellen zu binden, was zur Aktivierung von AhR- und NF-κB-spezifischen Zielgenen nach TCDD Stimulation führen kann. Es konnte gezeigt werden, dass AhR/NF-κB Dimere die Expression von IL-8, BAFF (*B-cell activating factor*), IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) und CCL1 fördern (170). Interessanterweise waren nur die DC in PP und mLK AhRR-positiv und Experimente von Cejas et al. konnten beweisen, dass die Expression von RelB relativ früh während der



Differenzierung von DC hochreguliert wird und für die normale Entwicklung und Funktion der DC erforderlich ist (171). DC werden als Schlüsselregulatoren der Immunität oder Toleranz betrachtet und fungieren als wichtige Quelle vonIDO für die Induktion von Treg (172). In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass der alternative NF- $\kappa$ B Signalweg kritisch für die Induktion vonIDO in DC ist (173). Somit ist es auch sehr wahrscheinlich, dass die TCDD vermittelte Induktion vonIDO nicht nur den AhR erfordert, sondern gleichzeitig RelB involviert. Außerdem beeinflusst eine Behandlung von murinen DC aus Knochenmark mit TCDD signifikant deren Differenzierung und Reifung. Diese Reifung von DC geht mit der Bindung des AhR/RelB Dimers an DNA einher, was eine AhR-abhängige Induktion von *Ido1*, *Ido2*, *Ccr6* und *Il22* zur Folge hat (174). TCDD stimulierte DC exprimierten erheblich größere Mengen von MHCII und CD86, während die Expression von CD11c und Produktion von IL-6 nach TCDD Applikation reduziert waren (156). Diese Beobachtungen konnten in Experimenten von der AG um Kerkvliet, die verstärkte Expression der Oberflächenmarker CD86, MHCII und ICAM-1 auf Milz-DC von mit TCDD-behandelten Mäusen zeigten, validiert werden (155, 175).

Genauere Analysen der MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC, die in den PP und mLK unabhängig vom AhR den AhRR exprimieren, sind erforderlich. Es sollten beispielweise genauere Erkenntnisse bezüglich der DC Subpopulationen, die den AhRR ausprägen, gewonnen werden. In murinen PP lassen sich konventionelle DC bezüglich der Expression von Chemokinrezeptoren, wie CX<sub>3</sub>CR1 und CCR6 unterscheiden. Es wäre interessant zu erfahren, ob die AhRR<sup>+</sup> DC in den PP zu den CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>-DC gehören, die in engem Kontakt mit dem Follikel-assoziierten Epithel stehen und Antigene nach deren Transzytose durch die M-Zellen aufnehmen (176). Diese Zellen sind jedoch nicht in der Lage, eine T-Zell-abhängige Immunität zu induzieren. CCR6 exprimierende DC sind direkt unterhalb der subepithelialen Dom-Region der PP lokalisiert und unterstützen die antigenspezifische Th-Zellaktivierung in Antwort auf Bakterien (176). Außerdem befindet sich in den PP eine CD103<sup>+</sup> DC Subpopulation, die als Reaktion auf die Mikrobiota expandiert. Ihre genaue Lokalisation und Funktion im PP ist noch nicht geklärt (177).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Wechselwirkung zwischen dem AhR und AhRR sehr komplex ist und wahrscheinlich über einen einfachen AhR-induzierten, AhRR vermittelten Rückkopplungsmechanismus hinausgeht. Der AhRR kann offenbar auch durch andere Wege als AhR-abhängige Transkriptionskontrolle reguliert werden.

## 5.2 Regulation der AhRR-Expression durch AhR-Liganden

Die größte Quelle (> 90%) der Exposition des menschlichen Organismus gegenüber polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen mit Dioxin als prominentestem Beispiel, sind die Nahrungsmittel, wobei besonders tierische Lebensmittel, wie Eier, Milch, Fleisch und Fisch belastet sind (178). Modell-Analysen zur Bindung verschiedener Liganden zeigen, dass der AhR zahlreiche planare hydrophobe Substanzen binden kann (179). Deswegen ist der AhR in der Lage, neben diesen xenobiotischen Substanzen, die kanzerogene Wirkung haben können, auch natürliche antikanzinogene Stoffe zu binden. Interessanterweise kommt die Mehrzahl der bislang identifizierten natürlichen AhR-Liganden direkt aus der Nahrung oder aus pflanzlichen Produkten, wie beispielweise Flavonoide, Carotinoide und Indole. Daher wurde hier der Einfluss von Nahrungsbestandteilen auf die AhRR-Expression genauer untersucht.

### 5.2.1 Wirkung von Curcumin und Quercetin auf die AhRR-Expression

In Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Curcumin und Quercetin, die natürliche AhR-Liganden sind, auf die AhRR-Expression untersucht. Die FACS Analysen der mit Curcumin gefütterten Mäuse verdeutlichen einen großen Einfluss der natürlichen AhR-Liganden auf die AhRR Aufregulation in Dünndarm und PP. In allen analysierten Zellpopulationen des Dünndarms als auch in CD8<sup>+</sup>-Zellen und DC in PP war die durch Curcumin induzierte AhRR-Expression höher als die konstitutive AhRR-Expression. In den mLK jedoch war die Wirkung von Curcumin und Quercetin nicht mehr sichtbar. Interessanterweise hat sich in den hier durchgeführten Experimenten dieser natürliche AhR-Ligand aus Kurkuma genauso wirkungsvoll, wie der potente klassische AhR-Ligand, 3-MC, der in den Analysen als positive Kontrolle diente, erwiesen. Im Gegensatz zu Curcumin hat Quercetin keine Erhöhung der AhRR-Expression in der LP des Dünndarms hervorgerufen. Ähnlich wie nach der Behandlung mit Curcumin konnte in PP eine Quercetin-induzierte AhRR-Expression in CD8<sup>+</sup>-Zellen und MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC beobachtet werden.

Die Wirkung von Curcumin auf die Modulation von intrazellulären Signalwegen, die das Wachstum von Krebszellen, Entzündung, Apoptose und Zelltod kontrollieren, wurde bereits in der Literatur eingehend beschrieben (180, 181). Im Zusammenhang mit dem AhR Signalweg konnte gezeigt werden, dass Curcumin die Translokation des AhR in den Nukleus und die Heterodimerisierung von AhR und ARNT erhöht (182). Außerdem zeigen mehrere Studien, dass Curcumin durch Aktivierung des AhR die enzymatische Aktivität von CYP1A1 induzieren kann (89, 182, 183). Interessanterweise supprimierte in Anwesenheit von TCDD oder B(a)P Curcumin die TCDD-induzierte AhR

Phosphorylierung und AhR/ARNT Heterodimerisierung, was in Folge die CYP1A1-Expression inhibiert (89, 182, 184). Für Quercetin, das mit TCDD um die Bindung an den AhR konkurriert, konnten ebenfalls schwache antagonistische Effekte dieses natürlichen AhR-Liganden gezeigt werden (91, 183).

In Rahmen dieser Arbeit konnte also die AhR-Aktivierung durch relativ hohe Menge an Curcumin und Quercetin bestätigt werden, wobei die Effekte zell- und gewebespezifisch zu sein scheinen. Von den beiden analysierten natürlichen Substanzen hat sich Curcumin als potenterer AhR-Ligand erwiesen. Die Aktivierung des AhR durch viele natürliche Liganden in deren biologisch relevanten Konzentrationen konnte bislang nicht belegt werden. Außerdem sind Curcumin und Quercetin schwer wasserlöslich und werden deswegen im Magen-Darm-Trakt nur zu einem sehr geringen Maß resorbiert. Um das große therapeutische und pharmakologische Potenzial dieser Substanzen besser ausnutzen zu können, kommen immer häufiger Nanopartikel-basierte „Drug-delivery-Systeme“ zur Anwendung. Im Gegensatz zu freiem Curcumin ist Nanocurcumin leicht wasserlöslich, zeigt vergleichbare therapeutische Wirkungen in humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien und eine höhere Aktivität (185, 186).

In Übereinstimmung mit dem kürzlich formulierten Paradigma, dass die Aktivierung des AhR die Differenzierung der CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg verbessert, supprimiert TCDD-Exposition Entzündungsreaktionen in verschiedenen Mausmodellen, wie zum Beispiel experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (106), Colitis ulcerosa (187) und Typ 1 Diabetes (188). Dennoch ist Dioxin ein Toxin, das sich nicht für therapeutische Anwendungen eignet. Deswegen ist es von großer Bedeutung einen entsprechenden nicht toxischen potenten AhR-Liganden zu identifizieren oder zu entwickeln. Viele verschiedene Studien wurden durchgeführt, um festzustellen, ob AhR-Liganden eine mukosale Entzündungsreaktion dämpfen können. Beispielweise demonstrierten Furumatsu et al., dass die AhR Aktivierung durch perorale Gabe von  $\beta$ -Naphthoflavon die Symptome der DSS induzierten Colitis mildert (189). In ähnlicher Weise, induziert die perorale Applikation des probiotischen Bakteriums *Lactobacillus bulgaricus* OLL1181 bei Mäusen die Aktivierung des AhR-Signalwegs im Colon und unterdrückt somit die DSS-Colitis (190).

## 5.2.2 Nahrungsbestandteile als Hauptaktivator der AhRR-Expression

Die Experimente mit Curcumin und Quercetin haben zwei wichtigen Fragen aufgeworfen, nämlich 1) inwieweit beeinflussen Nahrungsbestandteile die Expression des AhRR? und 2) spielen bakterielle Bestandteile ebenfalls eine Rolle in der Aktivierung des AhRR? Um die erste Frage beantworten zu können, wurden AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse für mehrere Wochen mit einem speziellen ALR-Futter,

das eine reduzierte Menge an AhR-Liganden beinhaltet, gefüttert. AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse, die weniger AhR-Liganden im Vergleich zu normal gefütterten AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmäusen erhalten hatten, zeigten drastisch reduzierte prozentuale Anteile an AhRR-positiven Zellen in der LP des Dünndarms, PP und mLK, wobei Treg und RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-ILC im Dünndarm den AhRR gar nicht mehr exprimierten. Die Anteile der AhRR-positiven IEL im Colon waren ebenfalls drastisch von fast 100% auf ca. 5% reduziert. Somit konnten die hier gewonnenen Ergebnisse die Feststellung untermauern, dass die Nahrung einen starken Einfluss auf die Induktion des AhR-Signalwegs hat.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Nahrungskomponenten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Darm spielen. Die Wirkung der Phytochemikalien wird vor allem durch den AhR vermittelt. In der Tat sind die AhR-Liganden aus der Nahrung sehr wichtig für die postnatale Expansion von RORyt<sup>+</sup>-ILC und für die Entwicklung der ILF (114). Mäuse, die einer ALR-Diät ausgesetzt waren, zeigten niedrigere c-Kit Spiegel auf RORyt<sup>+</sup>-ILC, eine schlechtere postnatale Expansion von RORyt<sup>+</sup>-ILC und eine verzögerte Bildung der ILF. Interessanterweise konnten alle diese Parameter nach der Verabreichung eines AhR-Liganden im ALR-Futter wieder hergestellt werden. Diese Befunde korrelieren mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten, die einen 4-fach reduzierten Prozentanteil der RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-ILC in AhRR<sup>+/+</sup>- und auch in AhRR<sup>E/E</sup>- Mäusen nach Verabreichung der ALR-Diät im Vergleich zu der AhRR<sup>E/E</sup>-Kontrollmaus, die Normaldiät bekam, zeigen.

Bemerkungswert bei den Beobachtungen von Kiss et al. ist der Fakt, dass die Entstehung der ILF verzögert, aber nicht komplett inhibiert war. Diese Feststellung weist auf eine mögliche Beteiligung anderer AhR-Liganden hin, wie z.B. bakterielle Bestandteile oder Stoffwechselprodukte, die in späteren Phasen den Mangel an Liganden aus der Nahrung kompensieren könnten.

Interessanterweise sind die Liganden aus der Nahrung auch in der Lage, die Expansion epithelialer  $\gamma\delta$  T-Zellen im Darm zu regulieren (115). Das konnte ebenfalls mit den Analysen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da auch hier die Menge an IEL in den ALR-Diät exponierten Mäusen reduziert war.

Eine Diät, die wenig AhR-Liganden enthält, hat auch einen Einfluss auf entzündliche Erkrankungen bei Menschen. So ist bekannt, dass ein geringerer Obst- und Gemüseverzehr bei Kindern mit der Entstehung von Morbus Crohn assoziiert ist (191).

## 5.3 Rolle des AhRR im darmassoziierten Immunsystem

### 5.3.1 Überempfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse auf DSS-induzierte Colitis

Die starke AhRR-Expression in den Immunzellen des Darms legte die Frage nach der Rolle des AhRR im intestinalen Immunsystem nahe. Um diese Frage zu adressieren, wurde ein DSS-induziertes

Mausmodell für Colitis ausgesucht, dass ein Modell für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen darstellt.

Die Ätiologie von CED ist heutzutage noch nicht vollständig geklärt, wobei in der letzten Zeit die Entwicklung von modernen molekularen Techniken und Anwendung verschiedener Mausmodelle für Colitis zu einer besseren Kenntnis der Faktoren, die zur Verstärkung und Aufrechterhaltung der immunologischen Antworten beitragen, führten. Es ist unbestritten, dass eine hochgradige Aktivierung von darmassoziierten Immunzellen einen wesentlichen Aspekt der Pathophysiologie von CED darstellt. Die regulatorischen Vorgänge, die sowohl die Interaktion zwischen einer Vielzahl von Mediatoren außerhalb der Zellen als auch von intrazellulären Mechanismen der molekularen Immunregulation betreffen, sind hoch komplex. Ihre stückweise Entschlüsselung bietet den Ausblick auf ein Verständnis der wesentlichen Elemente chronischer Entzündungen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Gewichtsveränderungen als auch die Evaluation der Krankheitszeichen, die im DAI-Score zusammengestellt worden sind, zeigten, dass unabhängig von der Dauer der Erkrankung AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse wesentlich empfindlicher gegenüber der DSS-Behandlung waren als AhRR<sup>+/+</sup>-Versuchsmäuse. Die Beobachtungen konnten weiterhin durch die histopathologische Untersuchungen unterstützt werden, in denen die an Colitis erkrankten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse massive Zellinfiltration und stark ausgeprägte Zerstörung der epithelialen Barriere zeigten. Die erhöhten Spiegel von IL-6, IL1- $\beta$  und IFN- $\gamma$  in den mLK bei AhRR<sup>E/E</sup>- im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Tieren bereits in den ersten Tagen der Exposition mit DSS sprechen ebenfalls für stärkere mukosale Entzündungsreaktionen in der Abwesenheit des AhRR. Weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation war die Ermittlung der Mechanismen, die zu der Überempfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber der DSS-induzierten Colitis beitragen.

### **5.3.2 Einfluss des AhRR auf die Aufrechterhaltung der Epithelbarriere**

#### **5.3.2.1 Erhöhung der Darmpermeabilität nach DSS-Behandlung ist AhR/AhRR unabhängig**

Wie zuvor ausführlich beschrieben sind die IEL hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere verantwortlich. Da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse reduzierte Frequenzen von IEL im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen aufweisen, stellte sich die Frage, ob in Abwesenheit des AhRR möglicherweise Veränderungen der Permeabilität der Darmwand auftreten.

Eine ausführliche Studie konnte bereits zeigen, dass nicht nur Morbus Crohn Patienten, sondern auch deren Angehörige ersten Grades eine erhöhte gastrointestinale Permeabilität manifestieren (192). Dabei wurde die erhöhte Permeabilität bei den Verwandten als Indiz auf eine Erbllichkeit der Erkrankung angesehen. Interessanterweise ist eine Erhöhung der Permeabilität bei Morbus Crohn Patienten bereits vor dem Ausbruch der Erkrankung zu beobachten und wird heutzutage häufig als Marker für ein Rezidiv der Krankheit bewertet (193).

In Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der Aufnahme von FITC-Dextran gezeigt werden, dass gesundes Darmepithel relativ undurchdringlich ist, jedoch eine Zerstörung der Epithelzellen durch DSS zu einer Permeabilitätserhöhung führt. Es wird heutzutage angenommen, dass Veränderungen der Darmdurchlässigkeit die Einwanderung von Bakterien ermöglichen und Entzündungsprozesse hervorrufen. Dieser Vorgang der unkontrollierten Immunantwort wird im Wesentlichen als Grund für die Auslösung der akuten DSS-induzierten Colitis genannt. Die mit AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen durchgeführten Permeabilitätsanalysen am Tag 0, 2 und 4 nach der DSS-Behandlung deuteten darauf hin, dass bereits im frühen Stadium der Colitis, die Darmbarriere beeinträchtigt war. Allerdings haben sich an keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede in der Darmdurchlässigkeit zwischen den AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen gezeigt.

Des Weiteren deutet vieles darauf hin, dass die Durchlässigkeit der Darmmukosa auch nicht direkt von der Anwesenheit des AhR abhängig ist. Die Experimente von Li et al. belegten, dass naive AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse trotz reduzierter Anzahl an IEL, keine erhöhte Permeabilität für FITC-Dextran im Vergleich zu AhR<sup>+/+</sup>-Mäusen aufweisen. Ergänzend dazu zeigten die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse, dass auch am Tag 4 der DSS-Colitis die Abwesenheit des AhR nicht zu Beeinträchtigungen der Schleimhautpermeabilität führt. Interessanterweise resultierte die Aktivierung des AhR durch FICZ in einer Verbesserung der Darmbarriere. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die mit FICZ-behandelten Mäuse weniger Th1-Zellen und Th17-Zytokine aber dafür erhöhte Spiegel an IL-22 produzierten. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen verbesserte die Behandlung der Mäuse mit FICZ nicht nur den Verlauf der DSS-Colitis, sondern auch der TNBS- und T-Zelltransfer-Colitis (194). Diese Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass natürliche oder synthetische AhR-Liganden potentiell für therapeutische Anwendungen bei CED eingesetzt werden könnten.

### **5.3.2.2 Veränderungen im extrinsischen Anteil der Permeabilitätsbarriere in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen**

Da die Experimente unter peroraler Anwendung von FITC-Dextran zeigten, dass nach DSS-Behandlung die Darmbarriere in AhR- und AhRR-defizienten Mäuse als auch WT-Mäusen

gleichermaßen geschädigt war, wurde zusätzlich die Menge an sezernierten (s)IgA-Antikörpern als eine weitere Komponente der Darmbarriere untersucht. Die in das Darmlumen sezernierten (s)IgA-Antikörper bilden neben dem Darmepithel eine erste Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen. sIgA wirkt anti-inflammatorisch und bindet im Lumen an die Kommensalen sowie an invasive Bakterien, Nahrungsantigene und Toxine.

Interessanterweise zeigten weibliche unbehandelte AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse signifikant reduzierte IgA Konzentrationen im Stuhl, während im Blut der IgA-Spiegel im Vergleich zu AhRR<sup>+/-</sup>-Mäusen deutlich erhöht war. Demgegenüber wiesen die AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse nur eine leichte Reduktion des IgA im Stuhl und ebenfalls erhöhte IgA-Mengen im Blut auf. Man könnte also spekulieren, dass möglicherweise die Wanderung von IgA-produzierenden B1-Zellen aus der Bauchhöhle in die LP in Abwesenheit des AhRR gestört ist.

Da intestinale IgA-produzierende Plasmazelle vor allem aus in der Peritonealhöhle befindlichen B1-Zellen entstehen (195, 196), wurden in Rahmen dieser Arbeit peritoneale B-Zellen genauer untersucht. B1-Zellen sind spezifische B-Zellen die sich von konventionellen B-Zellen (B2-Zellen) durch deren Ursprung, Oberflächenmarker und Verteilung im Gewebe unterscheiden. Die prozentualen Anteile der CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>-peritonealen Zellen waren in AhRR<sup>E/E</sup>- und auch in AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert im Vergleich zu den entsprechenden WT-Tieren. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten widersprechen teilweise den Versuchen mit einem transgenen Mausmodell, in dem Mäuse, die einen konstitutiv aktiven AhR exprimierten einen selektiven Verlust der B1-Zellen aufwiesen (197). In Bezug auf diese Studie wäre es zu erwarten, dass nur AhRR<sup>E/E</sup>- aber nicht AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse verminderte Anteile an B1-Zellen haben. Weiterhin zeigte die vorliegende Arbeit, dass naive CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>-Zellen keinen AhRR exprimierten. Die *in vitro* Stimulation der peritonealen Zellen mit anti-IgM induzierte die Ausprägung des AhRR in CD19<sup>+</sup>-Zellen, wobei die zusätzliche Gabe von anti-CD40, die Frequenz der CD19<sup>+</sup>AhRR<sup>+</sup>-Zellen nochmals verdoppelte. Man könnte also spekulieren, dass der AhRR eine physiologische Rolle während der Aktivierung von B1-Zellen spielt. Diesbezüglich zeigen Untersuchungen an humanen Zellen, dass ruhende periphere B-Zellen wenig oder keinen AhR exprimierten, während deren Aktivierung mit CD40-Ligand zur Aufregulation des AhR auf RNA- und Protein-Ebene führte (198). Eine transiente AhR-Expression in murinen B-Zellen konnte nach LPS Aktivierung demonstriert werden, jedoch bleibt die physiologische Funktion des AhR in B-Zellen bisher ungeklärt (199).

Interessanterweise postulierten Ishikawa et al. bereits, dass die perorale Gabe von TCDD die Migration von B1-Zellen beeinträchtigt (150). Sie konnten zeigen, dass TCDD-Behandlung zur Störung der mukosalen Immunität und zu einer starken AhR-abhängigen Reduktion der IgA-Konzentration im Darm der Versuchsmäuse führte. Dieser Effekt konnte jedoch in Experimenten mit *ex vivo* stimulierten B1-Zellen nicht beobachtet werden, was dafür spricht, dass der reduzierte IgA-Spiegel

im Darm nicht der direkten TCDD-Wirkung auf die IgA-Produktion zugeschrieben werden kann. RT-PCR Messungen bestätigten, dass die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren, wie CCR2, CCR7, CXCR4 und CXCR5 in B1-Zellen nach TCDD-Behandlung reduziert war. Um die Hypothese bezüglich der beeinträchtigten Wanderung der B1-Zellen in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen zu untermauern, wäre es daher förderlich, die Expression der genannten Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche von AhRR-defizienten B1-Zellen mittels FACS-Analyse zu überprüfen. Ferner gibt es Anhaltspunkte dafür, dass eine selektive Migration der Plasmablasten in das diffuse Dünndarmgewebe oder Colon durch die Bildung unterschiedlicher Chemokine dirigiert wird. CCL25 wird vor allem von Epithelien der Darmkrypten sowie den Endothelzellen des Dünndarms produziert und lockt die CCR9-exprimierenden Plasmablasten an (200, 201). Eine Migration in das Colongewebe wird dagegen durch das Chemokin CCL28 gesteuert, welches mit dem Rezeptor CCR10 der IgA<sup>+</sup> Plasmablasten interagiert (202, 203). Demzufolge kann es nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression von CCR9 und CCR10 auf AhRR<sup>E/E</sup>-Plasmablasten reduziert ist. Alternativ wäre es auch möglich, dass die Produktion von CCL25 und CCL28 in Abwesenheit des AhRR beeinträchtigt ist. Dies könnte mit Hilfe von RT-PCR Analysen der aus Dünndarm und Colon gewonnenen Epithelzellen verifiziert werden. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass sich Plasmazellen in der LP auch in situ entwickeln können. Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass ROR $\gamma$ t<sup>-/-</sup>-Mäuse durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t weder über Lymphknoten noch andere darmassoziierte Lymphstrukturen verfügen, aber weiterhin IgA<sup>+</sup> Plasmazelle im Darm aufweisen (204, 205). Man geht davon aus, dass hochaffines IgA vornehmlich der Neutralisierung von Pathogenen dient, während sIgA mit niedriger Affinität den Eintritt kommensaler Bakterien verhindert (206). Eine neue Arbeit von Flavell et al. zeigt, dass IgA selektiv pathogene Bakterien bindet (207). Es ist daher gut möglich, dass reduzierte IgA-Konzentrationen im Stuhl der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse mit einem verminderten Schutz der Epithelbarriere gegenüber Kommensalen zusammenhängt und so die Entwicklung von Colitis begünstigt.

### 5.3.3 Die Rolle des AhR im aktuellen Modell für intestinale Homöostase

Die Rolle des AhR in der Regulation von mukosaler Immunität ist in den letzten fünf Jahren sehr intensiv erforscht worden. Die aktuelle Literatur zeigt, dass der AhR zu einer Reihe von regulatorischen Proteinen gehört, die entscheidend für die Entwicklung und Aufrechterhaltung wesentlicher Komponenten des Immunsystems sind, inklusive der darmassoziierten Lymphozyten. Demzufolge sind mindestens drei Subpopulationen der Lymphozyten, die intestinale Immunität vermitteln, nämlich die IEL als auch zwei IL-22-produzierende Zellpopulationen (NKp46<sup>+</sup> und LTI-



Zellen) in ihrer Entwicklung und Funktion vom AhR abhängig. Sie bilden zusammen ein zentrales Gerüst des zurzeit angenommenen Modells für die Organisation der mukosalen Immunität. Die Ergebnisse dreier Arbeitsgruppen haben in der letzten Zeit einen wesentlichen Beitrag zur Erweiterung dieses Modells beigetragen (114, 115, 147). Sie zeigten, dass die Entwicklung der CP und ILF, die AhR<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>- und AhR<sup>+</sup>RORγt<sup>+</sup>LTi-Zellen beinhalten, in Abwesenheit des AhR gestört ist. Der Mangel an IL-22-produzierenden Zellen, die die Überlebensrate der Epithelzellen erhöhen und zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) beisteuern, führt möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere. Allerdings konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten FITC-Dextran Experimenten ein solcher Barrieredefekt weder in AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen noch in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen nachgewiesen werden. Insbesondere die Reduktion der AMP begünstigt den Eintritt von Bakterien in die LP, was in einer potentiell lebensbedrohlichen Empfindlichkeit und überschiessenden Immunantworten resultieren kann und somit zu entzündlichen Darmerkrankungen beitragen könnte.

### 5.3.3.1 Reduzierte Anteile der IEL sowohl in AhR<sup>-/-</sup>- als auch in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der AhRR ebenfalls einen Einfluss auf die Anwesenheit von IEL hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Anteile der CD8α<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen im Colon aber nicht im Dünndarm der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse um das 2-fache im Vergleich zu den analogen Zellen der AhRR<sup>+/+</sup>-Mäuse reduziert war. Dagegen wiesen die AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse stark verminderte Frequenzen der CD8α<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen in beiden Teilen des Darms auf.

In der Literatur ist beschrieben, dass die IEL Populationen im Darm, wie TCRαβCD8αα und TCRγδ Lymphozyten den AhR stark exprimieren (115). Die hier ermittelten Daten zeigen ebenfalls, dass fast alle CD8α<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup>-Zellen im Dünndarm als auch im Colon den AhRR exprimierten. Weiterhin hat die Aktivierung des AhR-Transkriptionsfaktors unmittelbar Einfluss auf die Erhaltung und Expansion aber nicht die Entwicklung von IEL (115). Interessanterweise begrenzte sich der Einfluss des AhRR auf die Menge der IEL im Colon. Man könnte diesbezüglich spekulieren, dass gerade im Colon, wo die höchste bakterielle Exposition herrscht und Colitis ulcerosa am stärksten ausgeprägt ist, eine besondere Kontrolle der Aufrechterhaltung von IEL notwendig ist. Somit könnte die Kontrolle der IEL und dadurch auch der Schutz gegen eine Zerstörung der epithelialen Barriere sowie Invasion von Mikroben durch den AhR als auch den AhRR notwendig sein. Es ist anzunehmen, dass die Effekte des AhR in den Regionen, in denen die Gewährleistung der Homöostase extrem schwierig ist, streng überwacht und gut abgestimmt werden müssen.

Der Befund, dass AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse reduzierte Anteile an IEL aufweisen, kann möglicherweise als eine der Ursachen für die Empfindlichkeit der Mäuse gegenüber der DSS-induzierten Colitis gelten. Diese Feststellung könnte zukünftig mit Hilfe eines *in vivo* Transfers von natürlichen IEL aus C57BL/6 WT-Mäusen in die AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse validiert werden. Klose et al. konnten bei der Untersuchung der Tbx21<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen, dass sie genau wie AhR<sup>-/-</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse empfindlich gegenüber der DSS-Colitis reagierten (208). In den Tbx21<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlt T-bet, ein Transkriptionsfaktor, der ebenfalls eine sehr wichtige Rolle in der Regulation der mukosalen Homöostase vor allem in der Epithelbarriere spielt. Ein Transfer der CD8α<sup>+</sup> IEL aus C57BL/6 WT-Mäusen in die Tbx21<sup>-/-</sup>-Mäuse drei Tage vor der Induktion von DSS-Colitis hat in diesem Fall die Symptome der Krankheit gemildert.

### 5.3.3.2 Untersuchungen der Rolle der AhRR-Expression in ILC

Als zweites großes Kernstück im gegenwärtigen Modell für mukosale Homöostase gelten ILC, die vor allem für die Produktion von IL-22 zuständig sind. In den Experimenten zur Ermittlung der Anteile der RORγt<sup>+</sup>-ILC im Dünndarm und Colon der naiven und DSS-behandelten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Collagenasen verwendet. Die unterschiedlichen Verdauansätze mit dem Enzym brachten jedoch abweichende Resultate. Unter der Anwendung von Collagenase VIII konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit des AhRR keinen Einfluss auf die prozentualen Anteile der RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup>- und RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>-Zellen unabhängig vom Krankheitsstatus hatte. Eine Ausnahme hierfür war die erhöhte Frequenz an RORγt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup>-Zellen im Dünndarm der unbehandelten AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen. Literaturangaben, die zeigen, dass im Dünndarm von naiven AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen fast keine ILC vorhanden sind, konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (114, 147, 162). Dahingegen zeigte die Isolierung der Zellen mit der Collagenase D in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen reduzierte Frequenzen der beiden ILC Subpopulationen im Dünndarm am Tag 0 als auch Tag 6 nach der Induktion von Colitis. Die Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass die Behandlung der Mäuse mit DSS die Anteile der ILC im Colon deutlich reduziert hat, was durch die verstärkte Einwanderung von inflammatorischen Zellen bedingt sein könnte. Die Abnahme der ILC in der Abwesenheit von AhRR könnte daher mit der Überempfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber der DSS-Behandlung korrelieren. Um diese Aussage zu bestätigen, sind weitere genaue Untersuchungen der ILC in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen notwendig. Die Experimente von Kiss et al. belegen, dass sich die AhR-defizienten RORγt<sup>+</sup> ILC weniger vermehren und niedrigere Mengen der Rezeptor-Tyrosinkinase, c-Kit, exprimieren (114). Interessanterweise sind c-Kit und sein Ligand, *stem cell factor* (SCF) wichtig für die Aufrechterhaltung der intestinalen RORγt<sup>+</sup> ILC (209). Ferner berichteten Qiu et al., dass in der Abwesenheit des AhR der IL-7 Signalweg

beeinträchtigt ist, was ebenfalls zur mangelhaften Aufrechterhaltung der RORyt<sup>+</sup> ILC führen kann (162). Darüber hinaus ist die Expression von IL-7R auf den RORyt<sup>+</sup> ILC in der Abwesenheit des AhR reduziert. Es ist bekannt, dass beim Fehlen von IL-7R die Anzahl der RORyt<sup>+</sup> ILC im Darm drastisch vermindert ist und dass IL-7 für die Stabilisierung der RORyt-Expression in RORyt<sup>+</sup> ILC erforderlich ist (210, 211). Um die Abnahme der mit Collagenase D isolierten RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>- und RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup>-Zellen in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen verifizieren zu können, wäre es empfehlenswert, die Zellen in Bezug auf die Expression von c-Kit (CD117) und IL-7R genauer zu untersuchen. Weiterhin könnte eine Analyse von IL-22 zu der Aussage führen, dass die reduzierten Frequenzen der ILC mit der Empfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber der DSS-induzierten Colitis einhergehen. Qiu et al. konnten nachweisen, dass der *IL22 locus* viele XRE-Elemente für die AhR-Bindung beinhaltet, die mit den ROR-response Elements zusammenhängen (162). Der AhR und RORyt sind in der Lage, physikalisch miteinander zu interagieren und die Koexpression der beiden Transkriptionsfaktoren kann synergistisch eine Aufregulation der IL-22 Transkription induzieren.

Der genaue Mechanismus, durch den der AhR die Generation von ILC kontrolliert, ist noch nicht vollständig verstanden. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass der AhR die Expression von Notch, dem Transkriptionsfaktor, der erforderlich für die Entwicklung der NKp46<sup>+</sup> ILC ist, induziert (147). Der Notch Signalweg steuert durch die Stimulation des AhR die IL-22 Produktion in T-Zellen, was für die Existenz einer positiven Rückkopplungsschleife spricht, in welcher Notch und AhR die IL-22 abhängige Aufrechterhaltung der Integrität der epithelialen Barriere fördern (212).

Die FACS-Analysen der ILC in dieser Arbeit wiesen darauf hin, dass fast alle RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>- und 30-50% der RORyt<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup>-Zellen im Dünndarm unabhängig vom gesundheitlichen Zustand der Mäuse als auch von der verwendeten Collagenase den AhRR exprimierten. Im Colon wurden jedoch auch Einflüsse des unterschiedlichen Collagenaseverdaus auf die AhRR-Expression sichtbar. Die Expression des AhR in RORyt<sup>+</sup> ILC konnte in der Literatur das erste Mal bereits im Jahr 2009 nachgewiesen werden (213). Die Expression des AhRR, der zur AhR-Genfamilie gehört, war in ILC genauso stark wie in IEL.

Eine Erklärung für die divergenten Ergebnisse der verschiedenen Collagenasen liegt wahrscheinlich darin, dass die Enzyme unterschiedliche Wirkung auf die Viabilität und/oder die Oberflächenmarkerexpression der Zellen haben. In einer sehr ausführlichen Publikation, die sich mit der Optimierung der Isolation von Zellen aus dem murinen Dünndarm befasst, konnte gezeigt werden, dass manche Collagenasen CD8α, CD138 und B220 von der Zelloberfläche ablösen und die Expression von anderen Markern beeinträchtigen können (214). Da die Experimente bisher nur 1-2 Mal jeweils mit Collagenase VIII und Collagenase D bei den naiven und DSS exponierten

Versuchstieren durchgeführt worden sind, müssen die Untersuchungen zukünftig noch fortgesetzt werden.

Monteleone et al. haben bereits die Expression des AhR bei Colitis Patienten untersucht (194). Das Ergebnis dieser Studie zeigte, dass im Vergleich zu den gesunden Probanden die AhR mRNA in Morbus Crohn Patienten reduziert war, während sie bei Colitis ulcerosa Patienten unverändert war. Die AhR-Expression wurde hauptsächlich in den Regionen der entzündeten Mukosa runter reguliert. Im Gegensatz dazu war IL-22 in beiden Gruppen von CED Patienten aufreguliert (215, 216). Darüber hinaus korrelierte die Menge des AhR mit dem Schweregrad der Erkrankung (217). Über die Ursachen dieser Diskrepanz kann nur spekuliert werden. Es könnte an den unterschiedlichen Methoden liegen, die verwendet worden sind, um die AhR-Expression zu erfassen. Da der AhR auch durch Dioxine im Zigarettenrauch induziert wird, könnten diese Abweichungen den unterschiedlichen Raucherstatus der Patienten widerspiegeln.

#### **5.3.4 Analyse der AhRR-Expression in T-Zellen und myeloiden Zellen in Zusammenhang mit Colitis**

Neben den bisher diskutierten Mechanismen können auch noch andere Wege zur AhR-vermittelten Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase beisteuern. In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede in den Frequenzen der CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-Zellen im darmassoziierten Immunsystem in Abwesenheit des AhRR festgestellt werden. Darüber hinaus erhöhte die DSS-Behandlung die Frequenzen der Treg nur im Colon, was jedoch unabhängig vom AhRR geschah. Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen dem Anteil von Tregs in Colon und der Aktivität einer intestinalen Entzündung konnte auch im Humansystem gezeigt werden. Patienten, die an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa leiden, zeigen während der aktiven Phase der Erkrankung einen erhöhten Anteil an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in der entzündeten Mukosa gegenüber nicht-entzündeten Bereichen. Im Gegensatz zum Anstieg des Treg-Anteils im Colon ist der Anteil an Tregs im peripheren Blut in der aktiven Phase der Erkrankung reduziert und während der Remission erhöht. Dies deutet auf eine Migration von Tregs aus dem peripheren Blut in die entzündete Mukosa hin, um dort die Entzündungsreaktion zu reduzieren (218). Da aber der Anteil der Treg in AhRR<sup>+/+</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen nach DSS-Behandlung gleichermaßen erhöht war, scheint der AhRR keine Rolle bei der Migration dieser Zellen zu spielen.

Es gibt Belege dafür, dass die AhR-Aktivierung in den DSS-behandelten Mäusen FoxP3<sup>+</sup>-Zellen induziert und die Differenzierung von Th17<sup>+</sup>-Zellen reduziert (187, 219). Der durch TCDD aktivierte AhR fördert außerdem die Expansion anderer Subpopulation von Treg, nämlich der Tr1-Zellen (220).

FACS-Analysen haben jedoch auf keine Veränderungen in Frequenzen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen in PP, mLK und Milz hingewiesen (221). Die AhR-Expression ist in CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen relativ hoch, was für eine mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors in diesen Zellpopulationen spricht (106, 221). Interessanterweise erhöht die Aktivierung des AhR durch TCDD die Bindung des AhR an den Foxp3 Promotor und reguliert dessen Expression auf (106). Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass über die Hälfte der CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg im Dünndarm und etwa 15% der CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg im Colon den AhRR exprimierten. Da die DSS-Behandlung die Prozentanteile der Treg nicht verändert hat, bleibt es offen, welche Aufgaben der AhRR in Treg im intestinalen Immunsystem erfüllt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der AhRR für die orale Toleranz wichtig ist. Übermäßige Aktivierung des AhR durch Liganden aus der Nahrung könnte möglicherweise zu Nahrungsmittelunverträglichkeit führen.

Zahlreiche Untersuchungen belegen zweifellos eine Beteiligung von DC an der Pathogenese von CED, jedoch ist deren genauere Bedeutung noch nicht vollständig verstanden. Es wurde beschrieben, dass DC sowohl eine protektive, als auch eine pathogene Rolle bei der Entstehung und beim Verlauf von CED spielen können. Beispielsweise führte eine Ablation der CD11c<sup>+</sup> Zellen während einer DSS-induzierten Colitis zu einer Milderung der Symptome (222). Andererseits bewirkte die Abwesenheit von DC vor Induktion der Colitis eine Verschlimmerung der Krankheitszeichen (222).

Obwohl im Colon ca. 40% der CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC den AhRR exprimieren, gab es keine Unterschiede in dem Anteil der DC zwischen AhRR<sup>+/-</sup>- und AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen. Die Induktion von Colitis hat die Frequenzen der CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC nur leicht reduziert. Somit lässt sich sagen, dass die Überempfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse gegenüber DSS sehr wahrscheinlich nicht an veränderten Frequenzen der CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> DC liegt. Da die Versuche mit nur 1 bzw. 2 Mäusen pro Gruppe durchgeführt worden sind, müssen sie noch wiederholt werden, um diese Aussagen zu verifizieren. Es wäre außerdem erforderlich, in der Zukunft verschiedene DC Populationen insbesondere in Hinblick auf ihre Funktion bei der T-Zellaktivierung genauer zu untersuchen.

### 5.3.5 Untersuchungen der Mikrobiota des Darms

Es wird angenommen, dass Veränderungen der Mikrobiota des Darms die Auslösung und Ausprägung entzündlicher Darmerkrankungen determinieren. Die Forschung ist immer mehr darauf konzentriert entzündliche Darmerkrankungen wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa durch gezielte Veränderung der Darmbakterien therapeutisch zu beeinflussen und im Idealfall den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern bzw. schwere klinische Verläufe durch geeignete Massnahmen abzumildern.

Die Sequenzierungsanalyse der bakteriellen DNA, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden ist, weist auf eine stark erhöhte Diversität der bakteriellen Populationen im Dünndarm und Colon der AhR<sup>-/-</sup>-Mäuse aber nicht in AhRR<sup>E/E</sup>-Mäusen hin. Diesbezüglich gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die Reduktion der AhR-Aktivität die Produktion von anti-mikrobiellen Peptiden beeinträchtigt und in Zusammenhang mit einer tiefgreifenden Reduktion von Perforin und Granzym steht. Das Fehlen des AhR resultierte demzufolge in einer erhöhten Besiedlung des Darms durch *Bacteroides* spp. (115). Dagegen waren die anderen Bakterienstämme, wie Firmicutes, Actinomyces und Proteobacteria in den AhR<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht verändert. Eine andere Studie konnte interessanterweise keine Unterschiede in der bakteriellen Belastung zwischen den AhR-profizienten und AhR-defizienten Mäusen feststellen (162). Eine mögliche Ursache für diese gegensätzlichen Aussagen ist der Fakt, dass die zuerst erwähnte Arbeitsgruppe die Menge und Zusammensetzung der Bakterien im Gewebe (Dünndarm und Colon) und die zweite Gruppe die Menge der Bakterien in den Stuhlproben der Mäuse analysiert hat. Weiterhin ist allgemein bekannt, dass die Haltung von Mäusen in verschiedenen Tierhäusern in Zusammenhang mit unterschiedlichem Futter zu Variationen in der Komposition der Mikrobiota führen kann.

Die antimikrobielle Funktion des Darms wird durch ein Netzwerk der Immunzellen, wie spezialisierte IEL, ILC, B- und T-Lymphozyten in PP und mLK, isolierte Lymphfollikel sowie Cryptopatches unterstützt. Außerdem spielt bei der Entwicklung und Migration der B1-Zellen in den Darm die Stimulation durch die Bakterien eine wichtige Rolle (153). In den genannten Zellen und lymphatischen Strukturen ist der AhR stark exprimiert und wie die Ergebnisse der bakteriellen 16S rDNA Sequenzierung in dieser Arbeit zeigen erforderlich für die normale Erhaltung der bakteriellen Komposition. Im Gegensatz dazu, scheint der AhRR zumindest auf der Ebene der Verteilung der bakteriellen Stämme keine wesentliche Rolle bei der Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm zu spielen, obwohl er ebenfalls in IEL und ILC stark ausgeprägt ist.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des AhRR die Symptome der DSS-induzierten Colitis verstärkt. Eine mögliche Erklärung hierfür konnten reduzierte Anteile der IEL im Colon der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse im Vergleich zu AhRR<sup>+/+</sup>-Mäusen sein. Weiterhin zeigten unbehandelte AhRR-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen signifikant reduzierte IgA Titer im Stuhl und erhöhte IgA Konzentrationen im Blut auf, was für eine begrenzte Wanderung von IgA produzierenden B1-Zellen aus der Bauchhöhle in die LP in Abwesenheit des AhRR spricht. Somit wurde in dieser Arbeit auf eine wichtige Rolle des AhRR in entzündlichen Erkrankungen des Darms hingewiesen, wobei es anzunehmen ist, dass noch mehr Faktoren zur Überempfindlichkeit der AhRR<sup>E/E</sup>-Mäuse beitragen.

## Literaturverzeichnis

1. Thomma, Bart P H J, Cammue, Bruno P A, and K. Thevissen. 2002. Plant defensins. *Planta*. 216(2): 193–202.
2. Stockinger, B., and M. Veldhoen. 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Current opinion in immunology*. 19(3): 281–286.
3. Bauer, E., B. A. Williams, H. Smidt, Versteegen, Martin W A, and R. Mosenthin. 2006. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intest Microbiol*. 7(2): 35–51.
4. Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews. Immunology*. 3(4): 331–341.
5. Koni, P. A., and R. A. Flavell. 1998. A role for tumor necrosis factor receptor type 1 in gut-associated lymphoid tissue development: genetic evidence of synergism with lymphotoxin beta. *J. Exp. Med*. 187(12): 1977–1983.
6. Fütterer, A., K. Mink, A. Luz, M. H. Kosco-Vilbois, and K. Pfeffer. 1998. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*. 9(1): 59–70.
7. Neutra, M. R., A. Frey, and J. P. Kraehenbuhl. 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*. 86(3): 345–348.
8. Garrett, W. S., J. I. Gordon, and L. H. Glimcher. 2010. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 140(6): 859–870.
9. Coombes, J. L., and F. Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol*. 8(6): 435–446.
10. Kanamori, Y., K. Ishimaru, M. Nanno, K. Maki, K. Ikuta, H. Nariuchi, and H. Ishikawa. 1996. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med*. 184(4): 1449–1459.
11. Eberl, G., and D. R. Littman. 2004. Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. *Science*. 305(5681): 248–251.
12. Eberl, G., S. Marmon, M.-J. Sunshine, P. D. Rennert, Y. Choi, and D. R. Littman. 2004. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat. Immunol*. 5(1): 64–73.
13. Hamada, H., T. Hiroi, Y. Nishiyama, H. Takahashi, Y. Masunaga, S. Hachimura, S. Kaminogawa, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Kiyono, H. Yamamoto, and H. Ishikawa. 2002. Identification of

- multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 168(1): 57–64.
14. Hu, S., K. Yang, J. Yang, M. Li, and N. Xiong. 2011. Critical roles of chemokine receptor CCR10 in regulating memory IgA responses in intestines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 108(45): E1035–44.
  15. Yeung, M. M., S. Melgar, V. Baranov, A. Oberg, A. Danielsson, S. Hammarström, and M. L. Hammarström. 2000. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gammadelta expression. *Gut.* 47(2): 215–227.
  16. Pabst, O., H. Herbrand, M. Friedrichsen, S. Velaga, M. Dorsch, G. Berhardt, T. Worbs, A. J. Macpherson, and R. Förster. 2006. Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J. Immunol.* 177(10): 6824–6832.
  17. Fagarasan, S., M. Muramatsu, K. Suzuki, H. Nagaoka, H. Hiai, and T. Honjo. 2002. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science.* 298(5597): 1424–1427.
  18. Eberl, G., and S. Sawa. 2010. Opening the crypt: current facts and hypotheses on the function of cryptopatches. *Trends in immunology.* 31(2): 50–55.
  19. Griebel, P., T. Beskorwayne, Van den Broeke, A, and G. Ferrari. 1999. CD40 signaling induces B cell responsiveness to multiple members of the gamma chain-common cytokine family. *Int. Immunol.* 11(7): 1139–1147.
  20. Shockett, P., and J. Stavnezer. 1991. Effect of cytokines on switching to IgA and alpha germline transcripts in the B lymphoma I.29 mu. Transforming growth factor-beta activates transcription of the unrearranged C alpha gene. *J. Immunol.* 147(12): 4374–4383.
  21. Burns, J. W., M. Siadat-Pajouh, A. A. Krishnaney, and H. B. Greenberg. 1996. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science (New York, N.Y.).* 272(5258): 104–107.
  22. Bomsel, M., M. Heyman, H. Hocini, S. Lagaye, L. Belec, C. Dupont, and C. Desgranges. 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity.* 9(2): 277–287.
  23. Russell, M. W., J. Reinholdt, and M. Kilian. 1989. Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and their Fab alpha fragments: inhibition of IgG-mediated complement activation. *European journal of immunology.* 19(12): 2243–2249.
  24. Brandtzaeg, P. 2010. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. *Current opinion in gastroenterology.* 26(6): 554–563.



25. Wolf, H. M., M. B. Fischer, H. Pühringer, A. Samstag, E. Vogel, and M. M. Eibl. 1994. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes. *Blood*. 83(5): 1278–1288.
26. Neurath, M. F., B. Weigmann, S. Finotto, J. Glickman, E. Nieuwenhuis, H. Iijima, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, J. Mudter, P. R. Galle, A. Bhan, F. Autschbach, B. M. Sullivan, S. J. Szabo, L. H. Glimcher, and R. S. Blumberg. 2002. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 195(9): 1129–1143.
27. Matsuoka, K., N. Inoue, T. Sato, S. Okamoto, T. Hisamatsu, Y. Kishi, A. Sakuraba, O. Hitotsumatsu, H. Ogata, K. Koganei, T. Fukushima, T. Kanai, M. Watanabe, H. Ishii, and T. Hibi. 2004. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut*. 53(9): 1303–1308.
28. Fuss, I. J., C. Becker, Z. Yang, C. Groden, R. L. Hornung, F. Heller, M. F. Neurath, W. Strober, and P. J. Mannon. 2006. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm. Bowel Dis.* 12(1): 9–15.
29. Fuss, I. J., F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R. S. Blumberg, P. Mannon, and W. Strober. 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 113(10): 1490–1497.
30. Infante-Duarte, C., H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* 165(11): 6107–6115.
31. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6(11): 1133–1141.
32. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6(11): 1123–1132.
33. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 441(7090): 231–234.
34. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441(7090): 235–238.

35. Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 445(7128): 648–651.
36. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155(3): 1151–1164.
37. Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C. L. Karp, H. Cheroutre, and M. Kronenberg. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* 10(11): 1178–1184.
38. Heath, V. L., E. E. Murphy, C. Crain, M. G. Tomlinson, and A. O'Garra. 2000. TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *European journal of immunology*. 30(9): 2639–2649.
39. Tanner, S. M., E. M. Staley, and R. G. Lorenz. 2013. Altered generation of induced regulatory T cells in the FVB.mdr1a<sup>-/-</sup> mouse model of colitis. *Mucosal immunology*. 6(2): 309–323.
40. Boehm, F., M. Martin, R. Kesselring, G. Schiechl, E. K. Geissler, H.-J. Schlitt, and S. Fichtner-Feigl. 2012. Deletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC gastroenterology*. 12: 97.
41. Read, S., V. Malmström, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 192(2): 295–302.
42. Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H.-C. Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 307(5707): 254–258.
43. Niess, J. H., and G. Adler. 2010. Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1<sup>+</sup> dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 184(4): 2026–2037.
44. Cerovic, V., S. A. Houston, C. L. Scott, A. Aumeunier, U. Yrlid, A. M. Mowat, and Milling, S W F. 2013. Intestinal CD103<sup>-</sup> dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal immunology*. 6(1): 104–113.
45. Bain, C. C., C. L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Williams, B. Malissen, W. W. Agace, and A. M. Mowat. 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 6(3): 498–510.

46. Jaensson, E., H. Uronen-Hansson, O. Pabst, B. Eksteen, J. Tian, J. L. Coombes, P.-L. Berg, T. Davidsson, F. Powrie, B. Johansson-Lindbom, and W. W. Agace. 2008. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* 205(9): 2139–2149.
47. Strauch, U. G., N. Grunwald, F. Obermeier, S. Gürster, and H. C. Rath. 2010. Loss of CD103+ intestinal dendritic cells during colonic inflammation. *World J. Gastroenterol.* 16(1): 21–29.
48. Persson, E. K., H. Uronen-Hansson, M. Semmrich, A. Rivollier, K. Hägerbrand, J. Marsal, S. Gudjonsson, U. Håkansson, B. Reizis, K. Kotarsky, and W. W. Agace. 2013. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity.* 38(5): 958–969.
49. Lewis, K. L., M. L. Caton, M. Bogunovic, M. Greter, L. T. Grajkowska, D. Ng, A. Klinakis, I. F. Charo, S. Jung, J. L. Gommerman, I. I. Ivanov, K. Liu, M. Merad, and B. Reizis. 2011. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity.* 35(5): 780–791.
50. Edelson, B. T., W. KC, R. Juang, M. Kohyama, L. A. Benoit, P. A. Klekotka, C. Moon, J. C. Albring, W. Ise, D. G. Michael, D. Bhattacharya, T. S. Stappenbeck, M. J. Holtzman, S.-S. J. Sung, T. L. Murphy, K. Hildner, and K. M. Murphy. 2010. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207(4): 823–836.
51. Jakubczik, C., M. Bogunovic, A. J. Bonito, E. L. Kuan, M. Merad, and G. J. Randolph. 2008. Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *J. Exp. Med.* 205(12): 2839–2850.
52. Fujimoto, K., T. Karuppuchamy, N. Takemura, M. Shimohigoshi, T. Machida, Y. Haseda, T. Aoshi, K. J. Ishii, S. Akira, and S. Uematsu. 2011. A new subset of CD103+CD8alpha+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *J. Immunol.* 186(11): 6287–6295.
53. Sung, S.-S. J., S. M. Fu, C. E. Rose, F. Gaskin, S.-T. Ju, and S. R. Beaty. 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950).* 176(4): 2161–2172.
54. Rivollier, A., J. He, A. Kole, V. Valatas, and B. L. Kelsall. 2012. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* 209(1): 139–155.
55. Hadis, U., B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Müller, T. Sparwasser, R. Förster, and O. Pabst. 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity.* 34(2): 237–246.

56. Spits, H., and Di Santo, James P. 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature immunology*. 12(1): 21–27.
57. Yokota, Y., A. Mansouri, S. Mori, S. Sugawara, S. Adachi, S. Nishikawa, and P. Gruss. 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*. 397(6721): 702–706.
58. Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, Di Santo, James P, G. Eberl, S. Koyasu, R. M. Locksley, McKenzie, Andrew N J, R. E. Mebius, F. Powrie, and E. Vivier. 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology*. 13(2): 145–149.
59. Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J.-I. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 463(7280): 540–544.
60. Price, A. E., H.-E. Liang, B. M. Sullivan, R. L. Reinhardt, C. J. Eisley, D. J. Erle, and R. M. Locksley. 2010. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(25): 11489–11494.
61. Hams, E., M. E. Armstrong, J. L. Barlow, S. P. Saunders, C. Schwartz, G. Cooke, R. J. Fahy, T. B. Crotty, N. Hirani, R. J. Flynn, D. Voehringer, McKenzie, Andrew N J, S. C. Donnelly, and P. G. Fallon. 2014. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(1): 367–372.
62. Neill, D. R., S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, Langford, Theresa K A, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin, and McKenzie, Andrew N J. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 464(7293): 1367–1370.
63. Ferguson, A., and D. M. Parrott. 1972. The effect of antigen deprivation on thymus-dependent and thymus-independent lymphocytes in the small intestine of the mouse. *Clin. Exp. Immunol*. 12(4): 477–488.
64. Spencer, J., T. T. Macdonald, T. C. Diss, J. A. Walker-Smith, P. J. Ciclitira, and P. G. Isaacson. 1989. Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut*. 30(3): 339–346.
65. Maloy, K. J., A. M. Mowat, R. Zamoyska, and I. N. Crispe. 1991. Phenotypic heterogeneity of intraepithelial T lymphocytes from mouse small intestine. *Immunology*. 72(4): 555–562.
66. Schattenfroh, N. C., R. A. Hoffman, S. A. McCarthy, and R. L. Simmons. 1995. Phenotypic analysis of donor cells infiltrating the small intestinal epithelium and spleen during graft-versus-host disease. *Transplantation*. 59(2): 268–273.

67. Nüssler, N. C., B. Stange, R. A. Hoffman, W. H. Schraut, A. J. Bauer, and P. Neuhaus. 2000. Enhanced cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in patients with Crohn's disease. *Langenbecks Arch Surg.* 385(3): 218–224.
68. Sydora, B. C., P. F. Mixer, H. R. Holcombe, P. Eghtesady, K. Williams, M. C. Amaral, A. Nel, and M. Kronenberg. 1993. Intestinal intraepithelial lymphocytes are activated and cytolytic but do not proliferate as well as other T cells in response to mitogenic signals. *J. Immunol.* 150(6): 2179–2191.
69. Carol, M., A. Lambrechts, A. van Gossum, M. Libin, M. Goldman, and F. Mascart-Lemone. 1998. Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut.* 42(5): 643–649.
70. Taguchi, T., W. K. Aicher, K. Fujihashi, M. Yamamoto, J. R. McGhee, J. A. Bluestone, and H. Kiyono. 1991. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J. Immunol.* 147(11): 3736–3744.
71. D'Haens, G. R., K. Geboes, M. Peeters, F. Baert, F. Penninckx, and P. Rutgeerts. 1998. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology.* 114(2): 262–267.
72. Poland, A., and J. C. Knutson. 1982. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22: 517–554.
73. Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch, and C. A. Bradfield. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 519–561.
74. Liu, C., E. Goshu, A. Wells, and C.-M. Fan. 2003. Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 278(45): 44857–44867.
75. Mimura, J., K. Yamashita, K. Nakamura, M. Morita, T. N. Takagi, K. Nakao, M. Ema, K. Sogawa, M. Yasuda, M. Katsuki, and Y. Fujii-Kuriyama. 1997. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* 2(10): 645–654.
76. Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, and C. A. Bradfield. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(13): 6731–6736.
77. Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, D. M. Hilbert, T. McPhail, S. S. Lee, S. Kimura, D. W. Nebert, S. Rudikoff, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science.* 268(5211): 722–726.

78. Tijet, N., P. C. Boutros, I. D. Moffat, A. B. Okey, J. Tuomisto, and R. Pohjanvirta. 2006. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol. Pharmacol.* 69(1): 140–153.
79. Burbach, K. M., A. Poland, and C. A. Bradfield. 1992. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 89(17): 8185–8189.
80. Perdew, G. H. 1988. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263(27): 13802–13805.
81. Ma, Q., and J. P. Whitlock. 1997. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.* 272(14): 8878–8884.
82. Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13(1): 20–25.
83. Baba, T., J. Mimura, K. Gradin, A. Kuroiwa, T. Watanabe, Y. Matsuda, J. Inazawa, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. 2001. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J. Biol. Chem.* 276(35): 33101–33110.
84. Karchner, S. I., D. G. Franks, W. H. Powell, and M. E. Hahn. 2002. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J. Biol. Chem.* 277(9): 6949–6959.
85. Korkalainen, M., J. Lindén, J. Tuomisto, and R. Pohjanvirta. 2005. Effect of TCDD on mRNA expression of genes encoding bHLH/PAS proteins in rat hypothalamus. *Toxicology.* 208(1): 1–11.
86. Zhang, S., C. Qin, and S. H. Safe. 2003. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect.* 111(16): 1877–1882.
87. Ren, W., Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, and L. Zhang. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev.* 23(4): 519–534.
88. Pohl, C., F. Will, H. Dietrich, and D. Schrenk. 2006. Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 54(26): 10262–10268.
89. Ciolino, H. P., P. J. Daschner, T. T. Wang, and G. C. Yeh. 1998. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 56(2): 197–206.

90. Sergent, T., I. Dupont, Van der Heiden, Edwige, M.-L. Scippo, L. Pussemier, Y. Larondelle, and Y.-J. Schneider. 2009. CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol. Lett.* 191(2-3): 216–222.
91. Ciolino, H. P., P. J. Daschner, and G. C. Yeh. 1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* 340 (Pt 3): 715–722.
92. Nguyen, L. P., and C. A. Bradfield. 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 21(1): 102–116.
93. Denison, M. S., and S. R. Nagy. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 309–334.
94. Rannug, A., U. Rannug, H. S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell, and A. K. Grafström. 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262(32): 15422–15427.
95. Perdew, G. H., and C. F. Babbs. 1991. Production of Ah receptor ligands in rat fecal suspensions containing tryptophan or indole-3-carbinol. *Nutr Cancer.* 16(3-4): 209–218.
96. Zelante, T., R. G. Iannitti, C. Cunha, A. de Luca, G. Giovannini, G. Pieraccini, R. Zecchi, C. D'Angelo, C. Massi-Benedetti, F. Fallarino, A. Carvalho, P. Puccetti, and L. Romani. 2013. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 39(2): 372–385.
97. Nguyen, N. T., A. Kimura, T. Nakahama, I. Chinen, K. Masuda, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto. 2010. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(46): 19961–19966.
98. Kimura, A., T. Naka, T. Nakahama, I. Chinen, K. Masuda, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto. 2009. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *The Journal of experimental medicine.* 206(9): 2027–2035.
99. Jux, B., S. Kadow, and C. Esser. 2009. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol.* 182(11): 6709–6717.
100. Wang, T., K. L. Wyrick, M. R. Pecka, T. B. Wills, and B. A. Vorderstrasse. 2012. Mechanistic exploration of AhR-mediated host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Int. Immunopharmacol.* 13(4): 490–498.
101. Jin, G.-B., A. J. Moore, J. L. Head, J. J. Neumiller, and B. P. Lawrence. 2010. Aryl hydrocarbon receptor activation reduces dendritic cell function during influenza virus infection. *Toxicol. Sci.* 116(2): 514–522.

102. Inoue, H., K. Mishima, S. Yamamoto-Yoshida, R. Ushikoshi-Nakayama, Y. Nakagawa, K. Yamamoto, K. Ryo, F. Ide, and I. Saito. 2012. Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of EBV reactivation as a risk factor for Sjögren's syndrome. *J. Immunol.* 188(9): 4654–4662.
103. Negishi, T., Y. Kato, O. Ooneda, J. Mimura, T. Takada, H. Mochizuki, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama, and S. Furusako. 2005. Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J. Immunol.* 175(11): 7348–7356.
104. Kimura, A., T. Naka, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto. 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(28): 9721–9726.
105. Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J.-C. Renauld, and B. Stockinger. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature.* 453(7191): 106–109.
106. Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 453(7191): 65–71.
107. Apetoh, L., F. J. Quintana, C. Pot, N. Joller, S. Xiao, D. Kumar, E. J. Burns, D. H. Sherr, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11(9): 854–861.
108. Head, J. L., and B. P. Lawrence. 2009. The aryl hydrocarbon receptor is a modulator of antiviral immunity. *Biochem. Pharmacol.* 77(4): 642–653.
109. Thurmond, T. S., J. E. Staples, A. E. Silverstone, and T. A. Gasiewicz. 2000. The aryl hydrocarbon receptor has a role in the in vivo maturation of murine bone marrow B lymphocytes and their response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology and applied pharmacology.* 165(3): 227–236.
110. Zhang, Q., D. E. Kline, S. Bhattacharya, R. B. Crawford, R. B. Conolly, R. S. Thomas, M. E. Andersen, and N. E. Kaminski. 2013. All-or-none suppression of B cell terminal differentiation by environmental contaminant 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268(1): 17–26.
111. Lu, H., R. B. Crawford, J. E. Suarez-Martinez, Kaplan, Barbara L F, and N. E. Kaminski. 2010. Induction of the aryl hydrocarbon receptor-responsive genes and modulation of the immunoglobulin M response by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in primary human B cells. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology.* 118(1): 86–97.



112. Dreij, K., K. Rhrissorrakrai, K. C. Gunsalus, N. E. Geacintov, and D. A. Scicchitano. 2010. Benzo[a]pyrene diol epoxide stimulates an inflammatory response in normal human lung fibroblasts through a p53 and JNK mediated pathway. *Carcinogenesis*. 31(6): 1149–1157.
113. Kiss, E. A., and A. Diefenbach. 2012. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Controlling Maintenance and Functional Programs of ROR $\gamma$ t(+) Innate Lymphoid Cells and Intraepithelial Lymphocytes. *Front Immunol*. 3: 124.
114. Kiss, E. A., C. Vonarbourg, S. Kopfmann, E. Hobeika, D. Finke, C. Esser, and A. Diefenbach. 2011. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science*. 334(6062): 1561–1565.
115. Li, Y., S. Innocentin, D. R. Withers, N. A. Roberts, A. R. Gallagher, E. F. Grigorieva, C. Wilhelm, and M. Veldhoen. 2011. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell*. 147(3): 629–640.
116. Khor, B., A. Gardet, and R. J. Xavier. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 474(7351): 307–317.
117. Xavier, R. J., and D. K. Podolsky. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 448(7152): 427–434.
118. Andus, T., and V. Gross. 2000. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease--environmental factors. *Hepatology*. 47(31): 29–43.
119. Newman, B., and K. A. Siminovitch. 2005. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 21(4): 401–407.
120. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*. 2(8): 675–680.
121. Takeda, K. 2005. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *Journal of endotoxin research*. 11(1): 51–55.
122. Rescigno, M., and E. E. Nieuwenhuis. 2007. The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation. *Current opinion in gastroenterology*. 23(1): 21–26.
123. Watanabe, T., A. Kitani, P. J. Murray, and W. Strober. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature immunology*. 5(8): 800–808.
124. Salucci, V., M. Rimoldi, C. Penati, G. M. Sampietro, van Duist, Marjan Maria, G. Matteoli, S. Saibeni, M. Vecchi, S. Ardizzone, G. B. Porro, and M. Rescigno. 2008. Monocyte-derived dendritic cells from Crohn patients show differential NOD2/CARD15-dependent immune responses to bacteria. *Inflammatory bowel diseases*. 14(6): 812–818.
125. Fiocchi, C. 1990. Immune events associated with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl*. 172: 4–12.

126. Caradonna, L., L. Amati, T. Magrone, N. M. Pellegrino, E. Jirillo, and D. Caccavo. 2000. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J. Endotoxin Res.* 6(3): 205–214.
127. Sartor, R. B. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology.* 126(6): 1620–1633.
128. Sartor, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 134(2): 577–594.
129. Swidsinski, A., J. Weber, V. Loening-Baucke, L. P. Hale, and H. Lochs. 2005. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* 43(7): 3380–3389.
130. Sartor, R. B. 2003. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. *Rev Gastroenterol Disord.* 3 Suppl 1: S9-17.
131. Fuss, I. J., M. Neurath, M. Boirivant, J. S. Klein, de la Motte, C, S. A. Strong, C. Fiocchi, and W. Strober. 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950).* 157(3): 1261–1270.
132. Hoffmann, J. C., N. N. Pawlowski, A. A. Kühl, W. Höhne, and M. Zeitz. 2002. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology.* 70(3): 121–130.
133. Sellon, R. K., S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick, and R. B. Sartor. 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity.* 66(11): 5224–5231.
134. Contractor, N. V., H. Bassiri, T. Reya, A. Y. Park, D. C. Baumgart, M. A. Wasik, S. G. Emerson, and S. R. Carding. 1998. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950).* 160(1): 385–394.
135. Waidmann, M., O. Bechtold, J.-S. Frick, H.-A. Lehr, S. Schubert, U. Dobrindt, J. Loeffler, E. Bohn, and I. B. Autenrieth. 2003. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology.* 125(1): 162–177.
136. Morris, G. P., P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. R. Szewczuk, and J. L. Wallace. 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 96(3): 795–803.

137. Wirtz, S., C. Neufert, B. Weigmann, and M. F. Neurath. 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols*. 2(3): 541–546.
138. Heller, F., I. J. Fuss, E. E. Nieuwenhuis, R. S. Blumberg, and W. Strober. 2002. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*. 17(5): 629–638.
139. Okayasu, I., S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, and R. Nakaya. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 98(3): 694–702.
140. Cooper, H. S., S. N. Murthy, R. S. Shah, and D. J. Sedergran. 1993. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69(2): 238–249.
141. Axelsson, L. G., E. Landström, T. J. Goldschmidt, A. Grönberg, and A. C. Bylund-Fellenius. 1996. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflammation research official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. 45(4): 181–191.
142. Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén, and P. Nyrén. 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical biochemistry*. 242(1): 84–89.
143. Kim, S.-W., W. Suda, S. Kim, K. Oshima, S. Fukuda, H. Ohno, H. Morita, and M. Hattori. 2013. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA research an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 20(3): 241–253.
144. Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*. 73(16): 5261–5267.
145. Edgar, R. C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*. 10(10): 996–998.
146. Hamady, M., C. Lozupone, and R. Knight. 2010. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *The ISME journal*. 4(1): 17–27.
147. Lee, J. S., M. Cella, K. G. McDonald, C. Garlanda, G. D. Kennedy, M. Nukaya, A. Mantovani, R. Kopan, C. A. Bradfield, R. D. Newberry, and M. Colonna. 2012. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nature immunology*. 13(2): 144–151.
148. Turner, J. R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9(11): 799–809.

149. Fernandez, M. I., T. Pedron, R. Tournebize, J. C. Olivo-Marin, P. J. Sansonetti, and A. Phalipon. 2003. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity*. 18(6): 739–749.
150. Ishikawa, S. 2009. Children's immunology, what can we learn from animal studies (3): Impaired mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): a possible role for allergic sensitization. *The Journal of toxicological sciences*. 34 Suppl 2: SP349-61.
151. Lamm, M. E., and J. M. Phillips-Quagliata. 2002. Origin and homing of intestinal IgA antibody-secreting cells. *J. Exp. Med.* 195(2): F5-8.
152. Kroese, F. G., E. C. Butcher, A. M. Stall, P. A. Lalor, S. Adams, and L. A. Herzenberg. 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *International immunology*. 1(1): 75–84.
153. Ha, S.-a., M. Tsuji, K. Suzuki, B. Meek, N. Yasuda, T. Kaisho, and S. Fagarasan. 2006. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *The Journal of experimental medicine*. 203(11): 2541–2550.
154. Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science (New York, N.Y.)*. 288(5474): 2222–2226.
155. Vorderstrasse, B. A., and N. I. Kerkvliet. 2001. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules. *Toxicology and applied pharmacology*. 171(2): 117–125.
156. Lee, J.-A., J.-A. Hwang, H.-N. Sung, C.-H. Jeon, B.-C. Gill, H.-J. Youn, and J.-H. Park. 2007. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates functional differentiation of mouse bone marrow-derived dendritic cells Downregulation of RelB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology letters*. 173(1): 31–40.
157. León, A. J., E. Gómez, J. A. Garrote, D. Bernardo, A. Barrera, J. L. Marcos, L. Fernández-Salazar, B. Velayos, A. Blanco-Quirós, and E. Arranz. 2009. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm*. 2009: 580450.
158. Chen, Y., K. Chou, E. Fuchs, W. L. Havran, and R. Boismenu. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(22): 14338–14343.
159. Tsuchiya, T., S. Fukuda, H. Hamada, A. Nakamura, Y. Kohama, H. Ishikawa, K. Tsujikawa, and H. Yamamoto. 2003. Role of gamma delta T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice. *J. Immunol.* 171(10): 5507–5513.

160. Kühl, A. A., N. N. Pawlowski, K. Grollich, C. Loddenkemper, M. Zeitz, and J. C. Hoffmann. 2007. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *J. Leukoc. Biol.* 81(1): 168–175.
161. Inagaki-Ohara, K., T. Chinen, G. Matsuzaki, A. Sasaki, Y. Sakamoto, K. Hiromatsu, F. Nakamura-Uchiyama, Y. Nawa, and A. Yoshimura. 2004. Mucosal T cells bearing TCRgammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J. Immunol.* 173(2): 1390–1398.
162. Qiu, J., J. J. Heller, X. Guo, Z.-m. E. Chen, K. Fish, Y.-X. Fu, and L. Zhou. 2012. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity.* 36(1): 92–104.
163. Bernshausen, T., B. Jux, C. Esser, J. Abel, and E. Fritsche. 2006. Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch. Toxicol.* 80(4): 206–211.
164. Tsuchiya, Y., M. Nakajima, S. Itoh, M. Iwanari, and T. Yokoi. 2003. Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines. *Toxicol. Sci.* 72(2): 253–259.
165. Yamamoto, J., K. Ihara, H. Nakayama, S. Hikino, K. Satoh, N. Kubo, T. Iida, Y. Fujii, and T. Hara. 2004. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci.* 74(8): 1039–1049.
166. Hosoya, T., N. Harada, J. Mimura, H. Motohashi, S. Takahashi, O. Nakajima, M. Morita, S. Kawauchi, M. Yamamoto, and Y. Fujii-Kuriyama. 2008. Inducibility of cytochrome P450 1A1 and chemical carcinogenesis by benzo[a]pyrene in AhR repressor-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications.* 365(3): 562–567.
167. Frericks, M., M. Meissner, and C. Esser. 2007. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220(3): 320–332.
168. Vogel, Christoph F A, and F. Matsumura. 2009. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. *Biochemical pharmacology.* 77(4): 734–745.
169. Tian, Y., S. Ke, M. S. Denison, A. B. Rabson, and M. A. Gallo. 1999. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *The Journal of biological chemistry.* 274(1): 510–515.
170. Vogel, Christoph F A, E. Sciallo, and F. Matsumura. 2007. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochemical and biophysical research communications.* 363(3): 722–726.

171. Cejas, P. J., L. M. Carlson, D. Kolonias, J. Zhang, I. Lindner, D. D. Billadeau, L. H. Boise, and K. P. Lee. 2005. Regulation of RelB expression during the initiation of dendritic cell differentiation. *Molecular and cellular biology*. 25(17): 7900–7916.
172. Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingluff, and A. L. Mellor. 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science (New York, N.Y.)*. 297(5588): 1867–1870.
173. Tas, S. W., M. J. Vervoordeldonk, N. Hajji, Schuitemaker, Joost H N, van der Sluijs, Koen F, M. J. May, S. Ghosh, M. L. Kapsenberg, P. P. Tak, and de Jong, Esther C. 2007. Noncanonical NF-kappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood*. 110(5): 1540–1549.
174. Vogel, Christoph F A, D. Wu, S. R. Goth, J. Baek, A. Lollies, R. Domhardt, A. Grindel, and I. N. Pessah. 2013. Aryl hydrocarbon receptor signaling regulates NF-κB RelB activation during dendritic-cell differentiation. *Immunology and cell biology*. 91(9): 568–575.
175. Vorderstrasse, B. A., E. A. Dearstyne, and N. I. Kerkvliet. 2003. Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen-presenting activity of dendritic cells. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*. 72(1): 103–112.
176. Salazar-Gonzalez, R. M., J. H. Niess, D. J. Zammit, R. Ravindran, A. Srinivasan, J. R. Maxwell, T. Stoklasek, R. Yadav, I. R. Williams, X. Gu, B. A. McCormick, M. A. Pazos, A. T. Vella, L. Lefrancois, H.-C. Reinecker, and S. J. McSorley. 2006. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity*. 24(5): 623–632.
177. Fink, L. N., and H. Frøkiaer. 2008. Dendritic cells from Peyer's patches and mesenteric lymph nodes differ from spleen dendritic cells in their response to commensal gut bacteria. *Scandinavian journal of immunology*. 68(3): 270–279.
178. Liem, A. K., P. Fürst, and C. Rappe. 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit Contam*. 17(4): 241–259.
179. Waller, C. L., and J. D. McKinney. 1995. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. *Chem. Res. Toxicol*. 8(6): 847–858.
180. Rao, C. V., A. Rivenson, B. Simi, and B. S. Reddy. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer research*. 55(2): 259–266.

181. Limtrakul, P., S. Lipigorngoson, O. Namwong, A. Apisariyakul, and F. W. Dunn. 1997. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer letters*. 116(2): 197–203.
182. Rinaldi, A. L., M. A. Morse, H. W. Fields, D. A. Rothas, P. Pei, K. A. Rodrigo, R. J. Renner, and S. R. Mallery. 2002. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer research*. 62(19): 5451–5456.
183. Mohammadi-Bardbori, A., J. Bengtsson, U. Rannug, A. Rannug, and E. Wincent. 2012. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chemical research in toxicology*. 25(9): 1878–1884.
184. Nishiumi, S., K.-I. Yoshida, and H. Ashida. 2007. Curcumin suppresses the transformation of an aryl hydrocarbon receptor through its phosphorylation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 466(2): 267–273.
185. Bisht, S., G. Feldmann, S. Soni, R. Ravi, C. Karikar, A. Maitra, and A. Maitra. 2007. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of nanobiotechnology*. 5: 3.
186. Anand, P., H. B. Nair, B. Sung, A. B. Kunnumakkara, V. R. Yadav, R. R. Tekmal, and B. B. Aggarwal. 2010. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical pharmacology*. 79(3): 330–338.
187. Singh, N. P., U. P. Singh, B. Singh, R. L. Price, M. Nagarkatti, and P. S. Nagarkatti. 2011. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS ONE*. 6(8): e23522.
188. Kerkvliet, N. I., L. B. Stepan, W. Vorachek, S. Oda, D. Farrer, C. P. Wong, D. Pham, and D. V. Mourich. 2009. Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy*. 1(4): 539–547.
189. Furumatsu, K., S. Nishiumi, Y. Kawano, M. Ooi, T. Yoshie, Y. Shiomi, H. Kutsumi, H. Ashida, Y. Fujii-Kuriyama, T. Azuma, and M. Yoshida. 2011. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis. *Digestive diseases and sciences*. 56(9): 2532–2544.
190. Takamura, T., D. Harama, S. Fukumoto, Y. Nakamura, N. Shimokawa, K. Ishimaru, S. Ikegami, S. Makino, M. Kitamura, and A. Nakao. 2011. Lactobacillus bulgaricus OLL1181 activates the aryl hydrocarbon receptor pathway and inhibits colitis. *Immunology and cell biology*. 89(7): 817–822.

191. D'Souza, S., E. Levy, D. Mack, D. Israel, P. Lambrette, P. Ghadirian, C. Deslandres, K. Morgan, E. G. Seidman, and D. K. Amre. 2008. Dietary patterns and risk for Crohn's disease in children. *Inflammatory bowel diseases*. 14(3): 367–373.
192. Buhner, S., C. Buning, J. Genschel, K. Kling, D. Herrmann, A. Dignass, I. Kuechler, S. Krueger, H. H.-J. Schmidt, and H. Lochs. 2006. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 55(3): 342–347.
193. Irvine, E. J., and J. K. Marshall. 2000. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology*. 119(6): 1740–1744.
194. Monteleone, I., A. Rizzo, M. Sarra, G. Sica, P. Sileri, L. Biancone, T. T. MacDonald, F. Pallone, and G. Monteleone. 2011. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 141(1): 237-48, 248.e1.
195. Suzuki, K., M. Maruya, S. Kawamoto, and S. Fagarasan. 2010. Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunological reviews*. 237(1): 180–190.
196. Kopf, M., F. Brombacher, P. D. Hodgkin, A. J. Ramsay, E. A. Milbourne, W. J. Dai, K. S. Ovington, C. A. Behm, G. Köhler, I. G. Young, and K. I. Matthaei. 1996. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*. 4(1): 15–24.
197. Andersson, P., A. Ridderstad, J. McGuire, S. Pettersson, L. Poellinger, and A. Hanberg. 2003. A constitutively active aryl hydrocarbon receptor causes loss of peritoneal B1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 302(2): 336–341.
198. Allan, L. L., and D. H. Sherr. 2005. Constitutive activation and environmental chemical induction of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor in activated human B lymphocytes. *Molecular pharmacology*. 67(5): 1740–1750.
199. Marcus, R. S., M. P. Holsapple, and N. E. Kaminski. 1998. Lipopolysaccharide activation of murine splenocytes and splenic B cells increased the expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287(3): 1113–1118.
200. Kunkel, E. J., J. J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Boisvert, A. I. Roberts, E. C. Ebert, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, H. B. Greenberg, C. M. Parker, E. C. Butcher, D. P. Andrew, and W. W. Agace. 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *The Journal of experimental medicine*. 192(5): 761–768.



201. Papadakis, K. A., J. Prehn, V. Nelson, L. Cheng, S. W. Binder, P. D. Ponath, D. P. Andrew, and S. R. Targan. 2000. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 165(9): 5069–5076.
202. Lazarus, N. H., E. J. Kunkel, B. Johnston, E. Wilson, K. R. Youngman, and E. C. Butcher. 2003. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 170(7): 3799–3805.
203. Kunkel, E. J., C. H. Kim, N. H. Lazarus, M. A. Vierra, D. Soler, E. P. Bowman, and E. C. Butcher. 2003. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *The Journal of clinical investigation*. 111(7): 1001–1010.
204. Tsuji, M., K. Suzuki, H. Kitamura, M. Maruya, K. Kinoshita, I. I. Ivanov, K. Itoh, D. R. Littman, and S. Fagarasan. 2008. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity*. 29(2): 261–271.
205. Fagarasan, S., S. Kawamoto, O. Kanagawa, and K. Suzuki. 2010. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 28: 243–273.
206. Macpherson, A. J., K. D. McCoy, F.-E. Johansen, and P. Brandtzaeg. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology*. 1(1): 11–22.
207. Palm, N. W., de Zoete, Marcel R, T. W. Cullen, N. A. Barry, J. Stefanowski, L. Hao, P. H. Degan, J. Hu, I. Peter, W. Zhang, E. Ruggiero, J. H. Cho, A. L. Goodman, and R. A. Flavell. 2014. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*. 158(5): 1000–1010.
208. Klose, Christoph S N, K. Blatz, Y. d'Hargues, P. P. Hernandez, M. Kofoed-Nielsen, J. F. Ripka, K. Ebert, S. J. Arnold, A. Diefenbach, E. Palmer, and Y. Tanriver. 2014. The transcription factor T-bet is induced by IL-15 and thymic agonist selection and controls CD8 $\alpha\alpha$ (+) intraepithelial lymphocyte development. *Immunity*. 41(2): 230–243.
209. Chappaz, S., C. Gärtner, H.-R. Rodewald, and D. Finke. 2010. Kit ligand and Il7 differentially regulate Peyer's patch and lymph node development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 185(6): 3514–3519.
210. Vonarbourg, C., A. Mortha, V. L. Bui, P. P. Hernandez, E. A. Kiss, T. Hoyler, M. Flach, B. Bengsch, R. Thimme, C. Hölscher, M. Hönig, U. Pannicke, K. Schwarz, C. F. Ware, D. Finke, and A. Diefenbach. 2010. Regulated expression of nuclear receptor ROR $\gamma$ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR $\gamma$ t(+) innate lymphocytes. *Immunity*. 33(5): 736–751.

211. Satoh-Takayama, N., S. Lesjean-Pottier, P. Vieira, S. Sawa, G. Eberl, Vosshenrich, Christian A J, and Di Santo, James P. 2010. IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. *The Journal of experimental medicine*. 207(2): 273–280.
212. Alam, M. S., Y. Maekawa, A. Kitamura, K. Tanigaki, T. Yoshimoto, K. Kishihara, and K. Yasutomo. 2010. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(13): 5943–5948.
213. Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, Lennerz, Jochen K M, J. M. Doherty, J. C. Mills, and M. Colonna. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 457(7230): 722–725.
214. Goodyear, A. W., A. Kumar, S. Dow, and E. P. Ryan. 2014. Optimization of murine small intestine leukocyte isolation for global immune phenotype analysis. *Journal of immunological methods*. 405: 97–108.
215. Andoh, A., Z. Zhang, O. Inatomi, S. Fujino, Y. Deguchi, Y. Araki, T. Tsujikawa, K. Kitoh, S. Kim-Mitsuyama, A. Takayanagi, N. Shimizu, and Y. Fujiyama. 2005. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology*. 129(3): 969–984.
216. Brand, S., F. Beigel, T. Olszak, K. Zitzmann, S. T. Eichhorst, J.-M. Otte, H. Diepolder, A. Marquardt, W. Jagla, A. Popp, S. Leclair, K. Herrmann, J. Seiderer, T. Ochsenkühn, B. Göke, C. J. Auernhammer, and J. Dambacher. 2006. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 290(4): G827-38.
217. Wolk, K., E. Witte, U. Hoffmann, W.-D. Doecke, S. Endesfelder, K. Asadullah, W. Sterry, H.-D. Volk, B. M. Wittig, and R. Sabat. 2007. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J. Immunol*. 178(9): 5973–5981.
218. Maul, J., C. Loddenkemper, P. Mundt, E. Berg, T. Giese, A. Stallmach, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2005. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 128(7): 1868–1878.
219. Benson, J. M., and D. M. Shepherd. 2011. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*. 120(1): 68–78.

220. Gandhi, R., D. Kumar, E. J. Burns, M. Nadeau, B. Dake, A. Laroni, D. Kozoriz, H. L. Weiner, and F. J. Quintana. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 11(9): 846–853.
221. Funatake, C. J., N. B. Marshall, L. B. Stepan, D. V. Mourich, and N. I. Kerkvliet. 2005. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells with characteristics of regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 175(7): 4184–4188.
222. Abe, K., K. P. Nguyen, S. D. Fine, J.-H. Mo, C. Shen, S. Shenouda, M. Corr, S. Jung, J. Lee, L. Eckmann, and E. Raz. 2007. Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(43): 17022–17027.

## Abbildungverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes.....	10
Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Peyerschen Plaques (PP) und des Follikel-assoziierten Epithels.....	12
Abb. 3: Die Struktur von Kryptopatches (CP) und isolierten lymphatischen Follikeln (ILF).....	13
Abb. 4: Klassifizierung von <i>innate lymphoid cells</i> in drei Gruppen basierend auf deren funktionalen Eigenschaften. ....	19
Abb. 5: Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) vermittelte Signaltransduktion.....	22
Abb. 6: AhR-vermittelte immunologische Effekte in verschiedenen Zellen und Organen. ....	26
Abb. 7: Expressionsanalyse des endogenen <i>ahrr</i> . ....	60
Abb. 8: AhR-Abhängigkeit der AhRR-Expression im Dünndarm und Colon. ....	61
Abb. 9: Partielle Abhängigkeit der AhRR-Expression in PP und mLK von der Anwesenheit des AhR. ...	63
Abb. 10: AhR-Abhängigkeit der AhRR-Expression in der Rückenhaut und am Ohr. ....	64
Abb. 11: AhRR/EGFP-Expression in den Zellen des GALT nach peroraler Applikation von verschiedenen AhR-Liganden.....	66
Abb. 12: Einfluss der ALR-Diät auf die Frequenz von Immunzellen im Dünndarm und auf die AhRR-Expression im darmassoziierten Immunsystem.....	68
Abb. 13: Einfluss der ALR-Diät auf die Prozentanteile der IEL und auf die AhRR-Expression in Colon. ....	69
Abb. 14: Effekte verschiedener DSS Konzentrationen auf den Verlauf der Colitis in C57BL/6 Mäusen. ....	71
Abb. 15: Verlauf der Colitis in AhRR <sup>+/-</sup> , AhRR <sup>E/+</sup> und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen nach der Behandlung mit 3,5% DSS.....	73
Abb. 16: Verstärkte Colitissymptome in AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen nach 7 Tagen Behandlung mit 5% DSS.....	74
Abb. 17: Histopathologische Untersuchungen des Colons nach 7 Tagen Behandlung mit 5% DSS.....	75
Abb. 18: Histopathologie der Colons von AhRR <sup>+/-</sup> , AhRR <sup>E/+</sup> und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen nach 8 Tagen DSS-Behandlung. ....	76
Abb. 19: Representative Bilder der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des Colons der AhRR <sup>+/-</sup> , AhRR <sup>E/+</sup> und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäuse nach 8 Tagen DSS-Behandlung .....	77
Abb. 20: Kinetik der Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Lymphknotenzellen in den AhRR <sup>+/-</sup> - und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen nach 3, 4 und 5 Tagen DSS-Behandlung.....	78
Abb. 21: FITC-Dextran Assay zu Überprüfung der Permeabilität des Colons. ....	80

Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der EpCAM gefärbten Colonpräparate der AhRR <sup>E/E</sup> -Mäuse, die entweder 4 oder 8 Tage mit 5% DSS bzw. unbehandelt waren. ....	81
Abb. 23: Untersuchungen zur Permeabilität des Darms anhand der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran im Serum.....	82
Abb. 24: IgA Konzentrationen im Blut der AhRR <sup>E/E</sup> -, AhR <sup>-/-</sup> -, AhR <sup>-/-</sup> AhRR <sup>E/E</sup> - und WT-Mäuse am: a) Tag 0 und b) 6 Tage nach Colitis-Induktion mit DSS (n=2-30 Mäuse pro Gruppe). ....	83
Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der anti-IgA gefärbten Colonschnitte aus AhRR <sup>+/+</sup> - und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen. ....	84
Abb. 26: IgA-Konzentrationen in Stuhlproben verschiedener Knockout- und WT-Mäuse. ....	85
Abb. 27: FACS-Analyse von peritonealen B1-Zellen aus AhRR <sup>E/E</sup> - und AhR <sup>-/-</sup> -Mäusen sowie entsprechenden WT-Wurfgeschwistern. ....	86
Abb. 28: FACS-Analyse der peritonealen B-Zellen aus AhRR <sup>E/E</sup> - und AhRR <sup>+/+</sup> -Mäusen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit anti-IgM oder anti-IgM und anti-CD40 Antikörpern. ....	87
Abb. 29: FACS-Analyse der MHCII <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> DC und F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Makrophagen im Colon von AhRR <sup>+/+</sup> - und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen. ....	89
Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der anti-F4/80 gefärbten Colonschnitte der AhRR <sup>E/E</sup> -Mäuse am Tag 0 als auch Tag 6 und Tag 8 nach der Colitis-Induktion.....	90
Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der anti-MHCII gefärbten Colonschnitte der AhRR <sup>E/E</sup> -Mäuse am Tag 0 als auch Tag 6 und Tag 8 nach Colitis-Induktion. ....	91
Abb. 32: FACS-Analyse der T-Zellen im Colon von AhRR <sup>+/+</sup> - und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen am Tag 0 und 6 Tage nach Colitis-Induktion.....	92
Abb. 33 Abb. 34: FACS-Analyse der Treg im Dünndarm, Colon, PP und mLK von AhRR <sup>+/+</sup> - und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen am Tag 0 und Tag 6 nach Colitis-Induktion. ....	94
Abb. 35: FACS-Analyse der intraepithelialen Lymphozyten im Dünndarm und im Colon von naiven AhRR <sup>E/E</sup> -, AhR <sup>-/-</sup> und AhRR <sup>+/+</sup> -Mäusen.....	96
Abb. 36: FACS-Analyse der <i>Innate lymphoid cells</i> im Dünndarm und im Colon der AhRR <sup>+/+</sup> -, AhRR <sup>E/E</sup> - und AhR <sup>-/-</sup> - Mäuse am Tag 0 und Tag 6 nach Colitis-Induktion. ....	99
Abb. 37: FACS-Analyse der <i>Innate lymphoid cells</i> in Dünndarm und Colon von AhRR <sup>+/+</sup> und AhRR <sup>E/E</sup> -Mäusen am Tag 0 und Tag 6 nach Colitis-Induktion. ....	100
Abb. 38: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Colons einer AhRR <sup>E/E</sup> -Maus.....	102
Abb. 39: Untersuchungsergebnisse der Sequenzierungsanalyse der bakteriellen 16s rDNA aus dem Dünndarm- und Coloninhalt der AhRR <sup>E/E</sup> -, AhR <sup>-/-</sup> und entsprechender WT-Wurfgeschwister .....	104
Abb. 40: UniFrac basierte Clusteranalyse der Verteilung der unterschiedlichen bakteriellen Gemeinschaften in AhR <sup>-/-</sup> -, AhRR <sup>E/E</sup> - und den entsprechenden WT-Mäusen.....	105



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Selbst hergestellte Lösungen und Puffer.....	36
Tab. 2: Antikörper für Durchflusszytometrie. ....	37
Tab. 3: Primärantikörper für Histologie. ....	38
Tab. 4: Sekundärantikörper für Histologie. ....	38
Tab. 5: Disease Activity Index (DAI).....	43
Tab. 6: PCR-Ansatz für die cDNA Synthese.....	53
Tab. 7: Allgemeine Schritte der RPS6 PCR.....	54
Tab. 8: PCR-Ansatz für die RT-PCR mit SYBR® Green. ....	55
Tab. 9: Allgemeine Schritte der RT-PCR. ....	55

## Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
3-MC	3-Methylcholanthren
A. dest.	Lat.: aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AhRR	Arylhydrocarbon Rezeptor Repressor
AK	Antikörper
ALR	AhR-Liganden reduziert
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ARNT	eng.: AhR Nuklear Translocator
AV	Avidin
bHLH	eng.: basic Helix-Loop-Helix
bio	Biotin
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zelle	B-Lymphozyt: bone marrow lymphocyte (im Knochenmark reifend)
bzw	beziehungsweise
CCL	C-C motif Ligand
CCR	eng.: Chemokine Receptors
CD	Cluster of Differentiation
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CP	Cryptopatches
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotide
Cy	Cyanin
DAI	Disease Activity Index
DAMP	eng.: Damage-Associated Molecular Pattern Molecules
DANN	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle
DeltaOD	Differenz der optischen Dichte bei zwei Wellenlängen (bei Absorptionmessungen)
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	eng.: enhanced GFP
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay



et al.	Lat.: et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	eng.: Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FAE	Follikel- assoziierte Epithel
FCS	engl.: Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FICZ	6-Formylindolo(3,2-b)carbazole
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Flt3L	eng.: Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
FoxP3	engl.: Forkhead box P3
FSC	engl.: Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
GALT	engl.: Gut-Associated Lymphoid Tissue (Darmassoziiertes
GFP	eng.: Green Fluorescence Protein
HAH	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEV	hochendothelialen Venulen
HIF1 $\alpha$	eng.: Hypoxia Inducible Factor $\alpha$
HRP	engl.: Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
i.p.	intraperitoneal
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	eng.: Innate Lymphoid Cells
ILF	isolierten Lymphfollikeln
iPAS	eng.: inhibitory PAS
LP	lat.: Lamina Propria
LPL	eng.: Lamina Propria Lymphocytes
LTi	lyphoid tissue inducer
MALT	engl.: Mucosal Associated Lymphoid Tissue
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mLK	mesenteriale Lymphknoten
mRNA	engl.: messenger RNA
M-Zelle	eng.: microfold cells
NGS	eng.: Next Generation Sequencing
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OTU	eng.: operational taxonomic units
OVA	Ovalbumin, Hühnereiweiß
p.o.	peroral
PAH	aromatische Kohlenwasserstoffe
PAMP	eng.: Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	engl.: Phosphat-Buffered Saline (Phosphatpuffer mit Salzen)
PCB	polychlorierten Biphenyle
PCDD	polychlorierten Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	polychlorierten Dibenzofurane
PE	Phycoerythrin

PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PGM	eng.: Personal Genome Machine
PP	Peyersche Plaques
PRR	eng.: pattern recognition receptors
pur	purified (aufgereinigt, unkonjugierte Antikörper)
RAG	eng.: Recombination Activating Gene
ROR $\gamma$ t	eng.: Retinoic Acid-related Orphan Receptor- $\gamma$ t
rpm	engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellenfaktor
SD	eng.: Standard Deviation (Standardabweichung)
SEM	eng.: Standard Error of the Mean (Standardfehler)
sog.	so genannte
SPF	spezifisch pathogenfreien
SSC	engl.: Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TGF- $\beta$	engl.: Transforming Growth Factor beta
TH-Zelle	T-Helferzelle
TLR	engl.: Toll Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
T-Zelle	T-Lymphozyt bzw. Thymus-abhängiger Lymphozyt
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
WT	Wildtyp
XRE	eng.: Xenobiotic Responsive Elements
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	anti

## Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt aber Frau Prof. Irmgard Forster für die Überlassung und Betreuung des interessanten Dissertationsthemas und für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die wiederholten Denkanstöße während der Durchführung dieser Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau PD Dr. Heike Weighardt für wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen als auch konstruktive Kritik und ihren nie endenden Enthusiasmus. Ich kann dir gar nicht genug danken für die Zeit, Mühe und vor allem Geduld, die du in das Korrekturlesen meiner Arbeit investiert hast.

Herrn Prof. Sven Burgdorf danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich für ihre freundliche Unterstützung und produktive Zusammenarbeit danken. Besonderer Dank gilt Oliver Schanz vor allem für die Übernahme der letzten FACS-Messungen, Martina Schunk für ihre tatkräftige Hilfe, Bereitschaft und Engagement als auch Tamara Groß für exzellente Unterstützung im Tierhaus. Allen anderen Mitgliedern des Instituts für umweltmedizinische Forschung und des LIMES Instituts ein herzliches Danke für die ständige Hilfsbereitschaft.

Meinem lieben Sohn Bela danke ich für die wundervolle Zeit, die ich mit ihm erleben darf und dafür, dass das Zusammensein die Welt immer wieder in Ordnung bringt.

Und nicht zuletzt möchte meinem Mann Daniel für die liebevolle Unterstützung, Verständnis und Motivation und dafür, dass er immer für mich da ist, danken.