



Die Bedeutung des Arylhydrocarbonrezeptors für das darmassoziierte Immunsystem

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefanie Chmill
aus Lüdenscheid

Düsseldorf, Mai 2010

aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatterin: Prof. Charlotte Esser
2. Berichterstatter: Prof. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Umweltexposition	1
1.2 Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)	3
1.3 Effekte der Überaktivierung	4
1.4 Endogene AhR Funktionen	5
1.5 Immunsystem des Darms (GALT)	8
1.5.1 Aufbau des Darmimmunsystems	9
1.5.2 Entstehung oraler Toleranz	12
1.6 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Antikörper	17
2.1.2 Primer	19
2.1.3 Chemikalien	20
2.1.4 Versuchstiere	22
2.1.5 Programme	22
2.1.6 Puffer	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Isolation von intraepithelialen Lymphozyten	24
2.2.2 Isolation von Lamina propria Zellen	24
2.2.3 Isolation von Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und Pey- er'schen Plaques	26
2.2.4 Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie	26
2.2.5 Kultivierung von primären Lymphozyten für die intrazelluläre Zytokinfärbung	27
2.2.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung	27

2.2.7	T-Zell Proliferationsmessung	28
2.2.8	MACS (Magnetic-activated cell separation)	29
2.2.9	Zellsortierungen	30
2.2.10	Gewinnung von RNA	32
2.2.11	cDNA Synthese	33
2.2.12	sqRT-PCR (semi-quantitative Real-Time Polymerase chain re- action)	34
2.2.13	GM-CSF-Messung im Darm	35
2.2.14	Behandlung von Mäusen mit TCDD	35
2.2.15	Auslösen und Test von oraler Toleranz	35
2.2.16	Antikörper-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) . .	37
2.2.17	Statistik	39
3	Ergebnisse	41
3.1	AhR Expression in Geweben und Zellen des GALT	41
3.2	Funktionalität des AhR	42
3.3	Effekte der Überaktivierung des AhR durch TCDD auf das GALT . .	44
3.3.1	Die Immunsuppressive Wirkung von TCDD wird durch wie- derholte Immunisierung aufgehoben	44
3.3.2	Dioxin verhindert die Etablierung von oraler Toleranz	44
3.3.3	Veränderung der Zellzusammensetzung des GALT durch TCDD	48
3.3.4	Veränderung des Zytokinmilieus im GALT durch TCDD . . .	51
3.4	Veränderungen des GALT in AhR-KO Mäusen	55
3.4.1	Höhere Antikörpertiter im Blut von AhR-KO Mäusen	55
3.4.2	Geringe Ausschüttung von OVA-spezifischen AK in den Kot von AhR-KO Mäusen	56
3.4.3	AhR-KO Mäuse haben Defizite in der Entwicklung von OT . .	57
3.4.4	Änderungen in der Zellzusammensetzung des GALT in AhR- KO Mäusen	59
3.4.5	Verringerte GM-CSF Sekretion im Darm von AhR-KO Mäusen	62
3.4.6	Zellen der MLN aus AhR-KO Mäusen proliferieren schneller .	63
4	Diskussion	65
4.1	Überaktivierung mit TCDD	65
4.1.1	Keine Unterdrückung der sekundären Immunantwort durch TCDD	65
4.1.2	Beeinflussung der OT durch TCDD	67
4.1.3	Verschiebung des Treg/Th17 Gleichgewichts	68

4.1.4	Möglichkeiten der Beeinflussung dendritischer Zellen durch TCDD	69
4.2	AhR-Defizienz	71
4.2.1	Untersuchung der IgG1 und IgA Immunantwort in AhR-KO Mäusen	72
4.2.2	Keine OT Etablierung in AhR-KO Mäusen	74
4.2.3	Mögliche Ursachen für die verringerte TCR $\gamma\delta^+$ T-Zell-Anzahl in AhR-KO Mäusen	75

Verwendete Abkürzungen

AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AhR-KO	AhR defiziente Mäuse
AhRR	Arylhydrocarbonrezeptor Repressor
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
CFA	komplettes Freund's Adjuvanz (<i>complete Freund's adjuvant</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
ConA	Concanavalin A
Cyp	Cytochrom P450
DC	dendritische Zelle
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Epithelzellen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	foetales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GALT	darmassoziiertes Immunsystem (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (Hank's Buffered Salt Solution)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFA	unvollständiges Freund's Adjuvanz (<i>incomplete Freund's adjuvant</i>)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LPA	lineares Polyacrylamid
MACS	magnetische Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MLN	mesenteriale Lymphknoten
OT	orale Toleranz
OVA	Ovalbumin
PE	Phycoerythrin

Fortsetzung der verwendeten Abkürzungen

PerCP	Peridinin Chlorophyll A Protein
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP	Peyer'sche Plaques
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TMB	3,3',5,5' tetramethyl Benzidine
Treg	regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Exposition gegenüber 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) führt über die Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors (AhR) zu einer Vielzahl toxischer Effekte, insbesondere zu einer Schädigung des Immunsystems. Obwohl die Hauptexposition über unsere Nahrung erfolgt, sind weder die Effekte einer TCDD induzierten Überaktivierung noch die physiologische Bedeutung des AhR für das Immunsystem des Darms bisher erforscht worden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die orale Gabe von 10 μ g TCDD die anschließende Etablierung von oraler Toleranz (OT) gegen das Protein Ovalbumin (OVA) verhinderte. Spätestens nach drei Immunisierungen gegen OVA produzierten TCDD behandelte, tolerante Mäuse ähnlich viele spezifische IgG1 und IgA Antikörper in Serum und Kot wie die nicht toleranten Tiere. TCDD führte zu mehr IL-6 produzierenden DC und IL-17 produzierenden T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Diese Daten weisen darauf hin, dass TCDD das Gleichgewicht im Darm hin zu proinflammatorischen Th17 Zellen verschiebt. Sie werfen damit die Frage nach den Risiken hochdosierter AhR-Liganden in frei-verkäuflichen Nahrungsergänzungsmitteln auf. Anhand von AhR-KO Mäusen konnten wir als erste zeigen, dass der AhR eine Rolle bei der Besiedelung des Dünndarmepithels mit regulatorische CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ T-Zellen spielt. Diese für die Epithelintegrität und die Entstehung von OT wichtigen Zellen waren in AhR-KO Mäusen auf die Hälfte reduziert. Interessanterweise konnten wir in AhR-KO Mäusen zeigen, dass auch das Fehlen des AhR die dauerhafte Etablierung von OT verhinderte. Überraschenderweise konnten diese kaum OVA-spezifische IgA in den Darm ausschütten, obwohl der Gesamt-Titer dem der WT-Mäuse entsprach.

Der AhR übernimmt wichtige und vielfältige Funktionen im darmassoziierten Immunsystem. Einerseits führte eine Überaktivierung zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und zu einer Behinderung in der Entstehung der OT. Andererseits wurde er für die Differenzierung oder das Überleben von antiinflammatorischen TCR γ δ T-Zellen im Epithel benötigt, so dass ein Fehlen des AhR ebenfalls die Etablierung der OT verhinderte.

1 Einleitung

Das frühzeitige Erkennen von Gefahren durch Chemikalien für den Menschen und die Umwelt ist von großem öffentlichen Interesse und steht im Fokus des Umweltbundesamts (2009). Insbesondere die Exposition persistenter und bioakkumulativer Substanzen wie Dioxinen wird regelmässig überprüft. Die Bedeutung des Arylhydrocarbonrezeptors (AhR) für die Vermittlung der Toxizität von Dioxinen auf das periphere Immunsystem und die Thymozytenentwicklung wurde in vergangenen Jahren bereits umfassend beleuchtet (Holsapple et al., 1991; Kerkvliet, 1995; den Berg et al., 1994). Die Aufnahme von AhR-Liganden erfolgt aber hauptsächlich über die Nahrung (Umweltbundesamt, 2009). Anders als das periphere Immunsystem steht das Immunsystem des Darms in ständigem Kontakt mit harmlosen Antigenen. Somit muss es auf die Auslösung und Erhaltung von Toleranz spezialisiert sein, aber gleichzeitig auch schnell auf gefährliche Substanzen reagieren können. Die Effekte von Dioxinen und die Rolle des AhR in diesem Zusammenhang sind noch weitgehend unerforscht. Daher befasst sich diese Arbeit mit der Bedeutung des AhR in Bezug auf die Entstehung oraler Toleranz, einer Kernfunktion des Immunsystem des Darms. Eine Störung dieser Regulationsmechanismen resultiert im günstigsten Fall in Nahrungsmittelallergien kann aber auch zu chronischen Entzündungen führen. (Ardizzone und Porro, 2005).

1.1 Umweltexposition

Als Dioxine werden polychlorierte Dibenzodioxine (PCDDs) und Dibenzofurane (PCDFs) bezeichnet, von denen der giftigste Vertreter das TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) ist. 7 PCDDs, 10 PCDFs und 12 dioxinähnliche polychlorierte Biphenyle entfalten ihre Wirkung wie TCDD über Bindung an den AhR. Ihre Toxizität wird relativ zu TCDD als sogenannter TEQ (toxic equivalence) Wert angegeben, wobei TCDD der Wert "1" zugeordnet wurde (den Berg et al., 1998).

Dioxine entstehen als unerwünschte Nebenprodukte bei Verbrennungstemperaturen von 300 bis 900°C in der Gegenwart von Chlorverbindungen, insbesondere bei

der Müllverbrennung (McKay, 28 April 2002). Durch den Einbau von Filteranlagen aufgrund der Bundesimmissionsschutzverordnung von 1990 konnte der jährliche Dioxinausstoß in Deutschland seit 1990 von 1200g auf 70g gesenkt werden, so dass mittlerweile die Emissionen der Metallindustrie im Fordergrund stehen (Umweltbundesamt, 2009). Dioxine sind in der Umwelt nur schwer abbaubar und reichern sich aufgrund ihrer stark lipophilen Eigenschaften im Fettgewebe an, so dass sie in der Nahrungskette akkumulieren. Die menschliche Exposition vor allem über tierische Nahrung liegt mit über 100pg pro Tag (Umweltbundesamt, 2009) immer noch im Bereich der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 1998) empfohlenen täglichen maximalen Aufnahmemenge von 1-4pg/kg Körpergewicht (KG). Die vom Umweltbundesamt (2009) in verschiedenen Lebensmitteln festgestellten Kontaminationen sind in Abbildung 1.1 wiedergegeben.

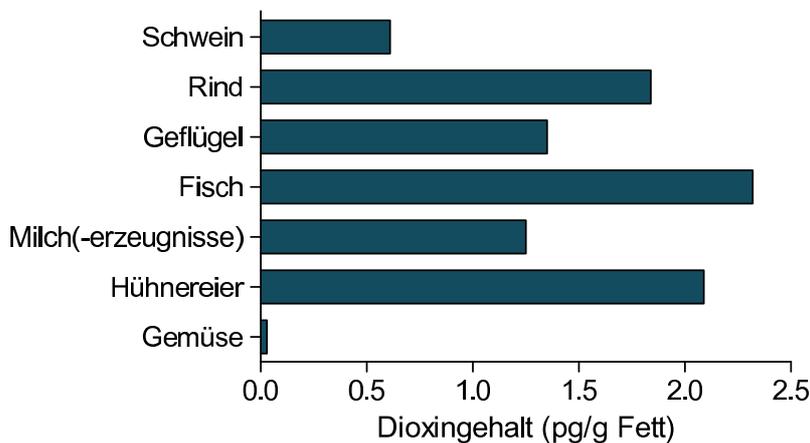


Abbildung 1.1: Gehalt an PCDDs und PCDFs in Lebensmitteln. Quelle: Umweltbundesamt (2009)

Die Ausscheidung von Dioxinen verläuft meist über den Kot, aber auch über den Urin und die Muttermilch (den Berg et al., 1994). Dabei variiert die Halbwertszeit je nach Spezies stark. Während zum Beispiel TCDD in Mäusen bereits nach etwa 11 Tagen wieder eliminiert ist, benötigen Meerschweinchen über 30 Tage und Menschen geschätzte 7-9 Jahre (den Berg et al., 1994). Ähnliches gilt für die LD₅₀-Werte, welche die Dosis kennzeichnen, die die Hälfte der Tiere nicht mehr überleben. Beispielsweise sterben Meerschweinchen schon bei einer Dosis von 0,6µg TCDD pro kg KG. Bei den in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6 Mäusen liegt die LD₅₀ bei etwa 100µg/kg KG und bei Hamster sogar um die 1-5mg/kg KG. Für den Menschen ist diese Dosis selbstverständlich nicht bekannt, aber aufgrund der Daten aus Industrieunfällen wie in Seveso weiß man, dass der Mensch zu den unempfindlichen Spezies gehört (di Domenico und Zapponi, 1986).

1.2 Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR)

Der AhR ist ein Sensor für unpolare, planare, niedermolekulare Substanzen. Ursprünglich wurde er wegen der Vermittlung der Toxizität von Dioxinen bekannt, die mit steigender Bindungsaffinität zunimmt. Entsprechend bindet TCDD am stärksten an den AhR (Poland und Knutson, 1982). Anhand von AhR-KO Mäusen, denen der AhR fehlt, konnte gezeigt werden, dass diese gegenüber den toxischen Effekten von TCDD resistent waren (Fernandez-Salguero et al., 1996). Die inaktive Form des AhR, der als Transkriptionsfaktor zur Familie der basic-Helix-Loop-Helix-per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) Familie gehört, liegt im Zytoplasma gebunden an die stabilisierenden Hilfsproteine AIP (AhR interagierendes Protein) und Hsp90 (Hitzeschockprotein 90) vor (Perdew, 1988; Bell und Poland, 2000). Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung und Translokation in den Zellkern, wo die Hilfsproteine abgespalten werden. Nach dem "klassischen" AhR-Signalweg assoziiert der AhR im Kern mit ARNT (AhR-nuklear Translokator). Dieser Komplex kann an sogenannte DREs (Dioxin responsive Elemente) der DNA binden und die Transkription der entsprechenden Gene steuern (Ma, 2001). Zu den bekanntesten Zielgenen gehören die Cytochrom P450 Enzyme wie *cyp1a1* und *cyp1a2* des Fremdstoffmetabolismus. Mittlerweile konnten aber etliche tausend Gene identifiziert werden, die direkt oder indirekt über den AhR reguliert werden (Frericks et al., 2006). Die genauen Auswirkungen einer Aktivierung sind dabei stark vom untersuchten Zelltyp abhängig.

Die transkriptionelle Aktivität des AhR wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen wird nach DNA-Bindung des aktivierten Rezeptors dessen Ubiquitinierung und somit dessen Abbau eingeleitet (Ma und Baldwin, 2000). Gleichzeitig steuert der AhR die vermehrte Expression des AhRR (AhR Repressor). Dieser konkurriert mit dem AhR im Kern um die Bindung mit ARNT. Da dem AhRR eine DNA-Bindedomäne fehlt, ist das resultierende Dimer aber transkriptionell nicht aktiv und reguliert somit über die negative Rückkopplung die AhR Aktivität (Mimura et al., 1999).

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass der AhR neben ARNT auch mit RelA und RelB des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Signalweges interagieren kann, wobei RelA eher inhibiert und RelB aktiviert wird (Ruby et al., 2002; Marshall und Kerkvliet, 2010; Vogel et al., 2007). RelA und RelB induzieren Gene für die Regulation von Proliferation und Immunregulation. Dabei steigert die Aktivierung von RelA das Überleben von Zellen und induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-2 und GM-CSF. Im Gegensatz dazu wirkt RelB über die vermehrte Expression von IL-8 und Indolamin

1.3. Effekte der Überaktivierung

2,3-dioxygenase (IDO) eher immunsuppressiv (Pahl, 1999; Ruby et al., 2002; Vogel et al., 2007). Dieser alternative AhR-Signalweg ist neben dem zuvor beschriebenen "klassischen" Signalweg in Abb.1.2 dargestellt.

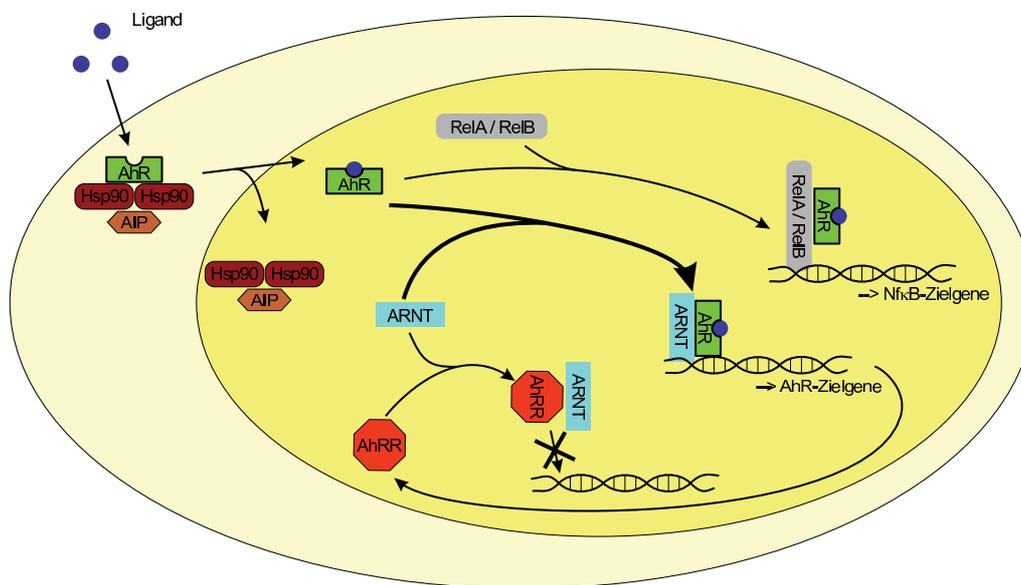


Abbildung 1.2: Schema des "klassischen", ARNT vermittelten und des "alternativen", RelA/RelB abhängigen AhR-Signalweges. Der AhR Repressor (AhRR) konkurriert mit dem AhR um die Bindung mit ARNT und inhibiert so die Transkription der Zielgene des "klassischen" Signalwegs

1.3 Effekte der Überaktivierung

Als Überaktivierung wird eine Aktivierung über das physiologische Niveau hinaus bezeichnet. Der AhR wird beispielsweise durch TCDD überaktiviert, da dieser Ligand nicht durch die induzierten Cyp450 Enzyme verstoffwechselt wird. Dadurch kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung des AhR. Obgleich die Effekte dieser Überaktivierung bereits in etlichen Studien untersucht wurden (Holsapple et al., 1991; Kerkvliet, 1995; Poland und Knutson, 1982), sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch immer weitgehend ungeklärt. Je nach Tierart unterscheiden sich die Wirkungen von TCDD, jedoch ließen sich in allen bislang untersuchten Labor-tieren (Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen) Lebertoxizität, Thymusathrophie, Auszehrung und eine ausgeprägte Immunsuppression sowohl der T- als auch der B-Zellen beobachten (Vos et al., 1973; Holsapple et al., 1991; Chapman und Schiller, 1985). In Mäusen wurden außerdem teratogene, neurotoxische und kanzerogene Effekte beobachtet (Weber et al., 1985). Bereits ab einer Dosis von $0,7\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ließ

sich in Mäusen eine verringerte humorale Immunantwort beobachten (Davis und Safe, 1988), so dass das Immunsystem als ein sehr empfindliches Ziel der TCDD Toxizität gilt. Dosen über $5\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG führen zu Thymusathrophie, wohingegen für Teratogenität und Auszehrung deutlich höhere Dosen von 12-20 und $25\mu\text{g}$ pro kg KG nötig sind (Weber et al., 1985; Vos et al., 1973). Abhängig vom Zelltyp kann TCDD die Zellproliferation fördern (Shimba et al., 2002) oder hemmen (Kolluri et al., 1999). Außerdem verändert TCDD die Zytokinausschüttung von T-Zellen (Ito et al., 2002), stört die Entwicklung naiver dendritischer Zellen (Vorderstrasse und Kerkvliet, 2001; Bankoti et al., 2010) und beeinflusst die Differenzierung von regulatorischen (Treg) und inflammatorischen Th17 Zellen (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008; Funatake et al., 2005).

Humane Daten stammen aus Unfällen, bei denen zumeist eine Mischung verschiedener dioxinähnlicher Substanzen freigesetzt wurde. Da die Exposition der einzelnen Individuen oft nicht genau bekannt war und zum Teil erst nach relativ langer Zeit Untersuchungen durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse kontrovers. Dennoch scheint TCDD auch im Menschen langfristige Schäden des Immunsystems zu verursachen. Tonn et al. (1996) konnten nach über 20 Jahren noch eine verringerte T-Helferzellfunktion nachweisen, die allerdings zu keinen klinischen Beschwerden bei den untersuchten Personen führte. Hoffman et al. (1986) zeigten ebenfalls eine verringert T-Zellfunktionen, während Webb et al. (1989) eine erhöhte Zahl an CD8^+ T-Zellen und höhere IgA Seruntiter beobachteten.

1.4 Endogene AhR Funktionen

Der AhR gehört zu den in vielen Spezies hochkonservierten Rezeptoren und wird von vielen Körperzellen exprimiert. Welche Gene nach einer Aktivierung reguliert werden, variiert stark je nach Zelltyp, Differenzierungsgrad und möglicherweise Ligand (Frericks et al., 2006). Dies führt zu den genannten, teilweise gegensätzlichen Effekten wie der Förderung von Treg durch TCDD und Th17 Zellen durch FICZ (Quintana et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Daher erschien es wahrscheinlich, dass der AhR mehr als ein Teil des Fremdstoffmetabolismus ist und insbesondere im Immunsystem eine Rolle bei der Zellentwicklung spielt.

Erste Hinweise lieferte der Phänotyp der von F. Gonzales generierten AhR-KO Mäuse, denen der AhR fehlt. Diese zeigen neben einer verringerten Fruchtbarkeit vor allem in Leber, Herz, Haut und Darm Veränderungen des Gefäßsystems und

Hyperplasien. Die Leber dieser Mäusen ist deutlich kleiner, zeigt Anzeichen von Fibrosen im Bereich der Portalvene (Fernandez-Salguero et al., 1997). Lahvis et al. (2005) konnten zeigen, dass in AhR-KO Mäusen der Ductus Venosus nach der Geburt nicht verschlossen ist. In Studien mit Mäusen mit verringerter AhR-Aktivität konnte gezeigt werden, dass der Verschluss des Ductus Venosus in der Entwicklung von AhR Liganden abhängig ist, da die Überaktivierung mit TCDD den beobachteten Defekt aufhob (Walisser et al., 2004).

Obwohl die humorale Immunantwort von AhR-KO Mäuse nicht beeinträchtigt ist (Vorderstrasse et al., 2001), ist die Entwicklung des Immunsystems in vielen Bereichen gestört. So besitzen diese Mäuse weniger Zellen im Thymus. Die Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und Reaktion auf T-Zellrezeptorstimulation entspricht aber der von WT-Mäusen (Camacho et al., 2005). Die *in vitro* Stimulation von T-Zellen mit Concanavalin A oder Ovalbumin führt zu einer verstärkten Sekretion der Th1 Zytokine IFN γ und IL-12, ohne die Sekretion von Th2 Zytokinen zu verändern (Rodríguez-Sosa et al., 2005).

Veldhoen et al. (2008) und Kimura et al. (2008) konnten zeigen, dass der AhR ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Entstehung funktionaler Th17 Zellen ist. Diese häufig mit Autoimmunkrankheiten assoziierten T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen im Bereich der Epithelien und Schleimhäute durch die Sekretion von IL-22. T-Zellen von AhR-KO Mäusen können zwar in begrenztem Umfang die Merkmale von Th17 Zellen wie z.B. IL-17 Produktion ausprägen, aber kein IL-22 produzieren.

Defizite bei der Abwehr bakterieller Infektionen könnten eine Ursache für die häufigen Darmvorfälle bei AhR-KO Mäusen darstellen, die bei WT-Mäusen (Wildtyp C57Bl/6 Mäuse) in vergleichbarem Alter nie zu beobachten sind. Fernandez-Salguero et al. (1997) fanden bei 9 Monate alten AhR-KO Mäusen vermehrt Hyperplasien und Polypen im Magen-Darmtrakt. Eine höhere Inzidenz von Dickdarntumoren wurde von Kawajiri et al. (2009) in bis zu 70 Wochen alten AhR-KO Mäusen beobachtet, wobei die ersten Fälle bereits nach 11 Wochen auftraten. Mögliche Ursachen könnten chronische Entzündungen im Darmbereich aufgrund höherer Anfälligkeit gegenüber *Helicobacter spec.* Infektionen sein (Fernandez-Salguero et al., 1997). Insgesamt ist die Lebenserwartung von AhR-KO Mäusen signifikant verkürzt (Kawajiri et al., 2009).

Die beobachteten Entwicklungsdefizite vor allem im Bereich des Immun- und Gefäßsystems der AhR-KO Mäuse stimulierten die Suche nach endogenen AhR Liganden. In menschlichem Urin und Rinderserum wurde Indirubin nachgewiesen, das verglichen mit TCDD *in vitro* sogar eine 45x höhere Bindungsaffinität zum AhR besitzt. Wegen der schnellen Verstoffwechslung müssten wirksame Dosen *in vivo* aber etwa 5000x höher liegen als bei TCDD. Es muss noch gezeigt werden, dass die im Gewebe und im Urin festgestellten niedrigen Konzentrationen für eine Aktivierung des AhR ausreichen (Guengerich et al., 2004).

Lipoxin 4A, ein Metabolit der Arachidonsäure, aktiviert den AhR und damit seinen eigenen Abbau über die induzierten Cyp450 Enzyme bereits im nanomolaren Bereich (Schaldach et al., 1999). Lipoxine gehören zu den Eicosaniden und fungieren als autokrine Signalübermittler. In der frühen Entwicklung können sie die Differenzierung von Zellen beeinflussen und somit möglicherweise den Phänotyp von AhR-KO Mäusen teilweise erklären. Im adulten Tier regulieren sie die Infiltration von Eosinophilen und nicht-inflammatorischen Monozyten in entzündetes Gewebe, erhöhen die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und verstärken die Zellantwort auf TGF β (Bruegel et al., 2009). TCDD greift mitunter in die gleichen Prozesse ein, so dass eine Vernetzung von AhR und Metaboliten der Arachidonsäure wahrscheinlich ist (Nebert und Karp, 2008).

In der Haut entsteht durch UV Bestrahlung aus Tryptophan FICZ (6-Formylinindolo [3,2-b]carbazol), ein hochaffiner AhR-Ligand (Wei et al., 1998). FICZ wird innerhalb von etwa 20 Minuten (Bergander et al., 2004) durch die induzierten CYP450 Gene metabolisiert. Dennoch dürfte es als endogener Ligand von Bedeutung sein, da die Haut häufig UV-Strahlung ausgesetzt ist. Auch in einem anderem Barriereorgan, dem Darm, wurden bakterielle Tryptophan-Abbauprodukte als AhR Liganden diskutiert (Nguyen und Bradfield, 2008). Allerdings scheinen hier Flavonoide und Indole als natürliche AhR Liganden eine wichtigere Position einzunehmen, da sie ubiquitär in pflanzlicher Nahrung vorkommen. Im Vergleich mit TCDD binden sie zwar relativ schwach an den AhR, die tägliche Aufnahme von 30-100mg bei einer Bioverfügbarkeit von 50% und Halbwertszeiten von über 20h im Serum könnte aber durchaus wirksame Konzentrationen erreichen (Zhang et al., 2003; Ross und Kasum, 2002). Abbildung 1.3 zeigt einige der bislang untersuchten Flavonoide und Indole. Eine Zusammenfassung der AhR-Liganden wurde von Nguyen und Bradfield (2008) erstellt.

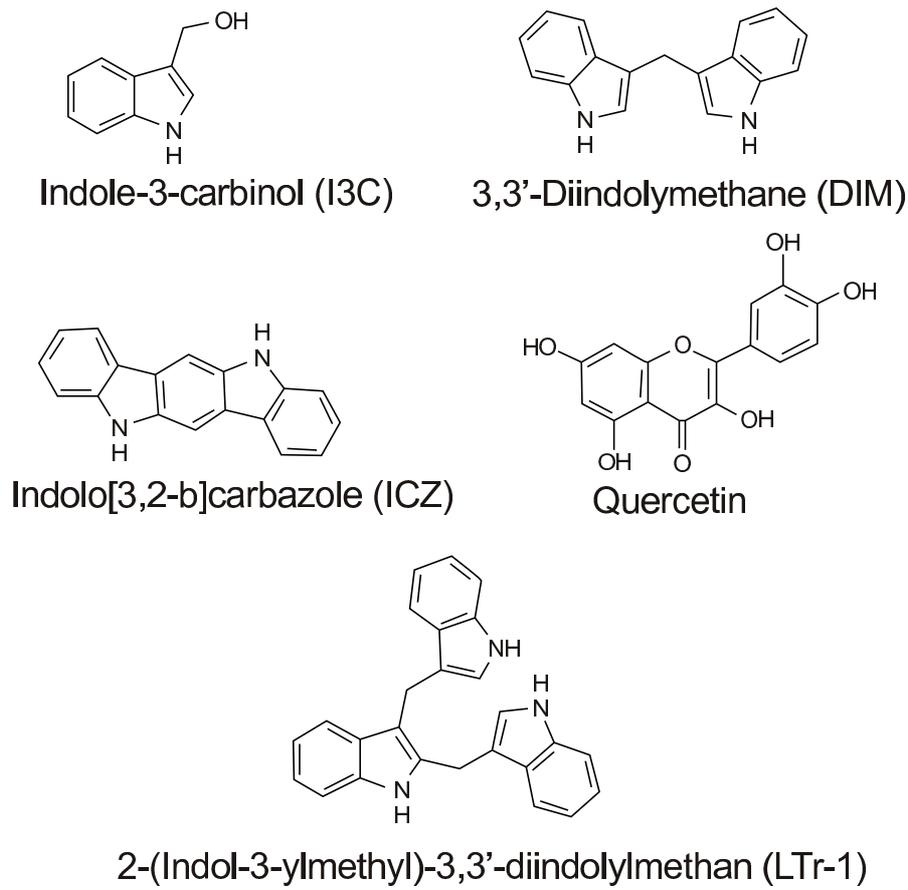


Abbildung 1.3: Struktur einiger AhR-Liganden unserer Nahrung. Quelle: Nguyen und Bradfield (2008)

1.5 Immunsystem des Darms (GALT)

Bislang wurden die Effekte von Dioxinen, insbesondere TCDD, auf das periphere Immunsystem gründlich untersucht. Die Bedeutung des Immunsystem des Darms wurde in diesem Zusammenhang noch nicht betrachtet, obwohl die Exposition mit diesen Umweltschadstoffen hauptsächlich über unsere Nahrung stattfindet. Gleichzeitig stieg in den vergangenen Jahren das Angebot an Nahrungsergänzungsmitteln, die AhR-Liganden wie Quercetin in bis zu 1000x höheren Konzentrationen enthalten wie eine normale Ernährung. Andererseits zeigte sich am Beispiel der vermehrt auftretenden Entzündungen und Polypen im Darm von AhR-KO Mäusen, dass der AhR im Darm auch eine physiologische Rolle bei der Immunhomöostase und Zellteilung besitzt.

Im Darm und den zugehörigen lymphatischen Strukturen befinden sich etwa 1/3 aller Lymphozyten. Er steht in ständigem Kontakt mit Bakterien, Umweltschadstoffen und Inhaltsstoffen unserer Nahrung. Das darmassoziierte Immunsystem (GALT)

muss in der Lage sein, einerseits schnell auf Infektionen oder Schädigungen zu reagieren und andererseits harmlose Antigene zu tolerieren. Eine Störung dieses Gleichgewichts resultiert in chronischen Entzündungen wie zum Beispiel Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Bei diesen Erkrankungen scheinen die vermehrt in den Darm einwandernden Th17 Zellen (Seiderer et al., 2008) für die gestörte Balance an antiinflammatorischen (IL-4, IL-10) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IFN γ und TNF α) mit verantwortlich zu sein (Ardizzone und Porro, 2005). Th17 Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr mikrobieller Infektionen in Epithelien aber auch bei der Entstehung von Autoimmunerkrankheiten. Da die Ursachen der vermehrten Einwanderung dieser Zellen in den Darm erkrankter Personen unbekannt sind, erfolgt die Behandlung symptomatisch mit antiinflammatorischen, meist gegen TNF α gerichteten Medikamenten. In anderen Geweben konnte gezeigt werden, dass TNF α die Expression des AhR aufreguliert (Kobayashi et al., 2008). Ebenso ist der AhR an der Sekretion von TNF α und der Differenzierung von Th17 Zellen beteiligt (Cheon et al., 2007; Veldhoen et al., 2008). Interessanterweise konnten Takamura et al. (2010) zeigen, dass TCDD eine durch Dextran natrium-sulfat (DSS) ausgelöste Colitis erheblich verbesserte, möglicherweise durch Blockade des AhR oder Ligandenspezifische Effekte. Somit könnte die Aufklärung der Rolle des AhR im Immunsystem des Darms auch das Verständnis von chronisch entzündlichen Erkrankungen verbessern.

1.5.1 **Aufbau des Darmimmunsystems**

Das Immunsystem des Darms besteht aus den intraepithelialen Lymphozyten (IEL), den Leukozyten der unterhalb des Epithels liegenden Lamina propria (LP), der mesenterialen Lymphknoten (MLN) und der Peyer'schen Plaques (PP).

Die IEL liegen unterhalb der Epithelzellen (EC), aber bereits oberhalb der Basalmembran. Sie befinden sich in einem teilaktiviertem Status, der sich dadurch äußert, dass sie auf ihrer Oberfläche den T-Zell Aktivierungsmarker CD69, aber kein CD24 oder CD44 tragen. Nach CD3 Stimulation zeigen sie alle Merkmale aktivierter T-Zellen wie IFN γ Sekretion, FasL, CD25 und CD44 Expression ähnlich schnell wie T-Gedächtniszellen und damit deutlich schneller als naive T-Zellen. Dies könnte ihnen ermöglichen, effizienter auf Antigene im Darm zu reagieren (Wang et al., 2002). Über 90% der T-Zellen im Dünndarmepithel sind CD8 $^+$. Neben "konventionellen" zytotoxischen T-Zellen (CD8 $\alpha\beta^+$ TCR $\alpha\beta^+$) exprimieren etwa 2/3 der IEL ein CD8 $\alpha\alpha$ Homodimer. Anders als das CD8 $\alpha\beta$ Heterodimers fungiert das CD8 $\alpha\alpha$ Molekül aufgrund fehlender intrazellulärer Domäne nicht als Co-Rezeptors des T-

Zell Rezeptors (TCR) (Gangadharan und Cheroutre, 2004). Stattdessen besitzt es eine hohe Affinität zu dem Thymus Leukemia Antigen (TLA), einem nicht klassischen MHCI Molekül, das im Darm ausschließlich auf Epithelzellen ausgeprägt wird. Eine Interaktion von $CD8\alpha\alpha$ und TLA führt zu einer verringerten Proliferation und zytotoxischen Aktivität der T-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation der Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (Lambolez und Rocha, 2001). Als weiterer Hinweis auf eine regulatorische Aktivität dieser Zellen fehlen ihnen die sonst typischen T-Zell Antigene CD2, CD28 und CD90, die auf konventionellen T-Zellen deren Aktivierung unterstützen (Denning et al., 2007).

$CD8\alpha\alpha^+$ T-Zellen lassen sich anhand ihres T-Zell Rezeptors in zwei Gruppen unterteilen. Etwa $1/3$ trägt den $TCR\alpha\beta$ Rezeptor, der auch auf zytotoxischen T-Zellen zu finden ist. Über die Funktion dieser Zellen ist bislang noch nicht viel bekannt, sie scheinen aber regulatorische Aufgaben wahrzunehmen. Denning et al. (2007) fanden in diesen Zellen erhöhte mRNA Level für inhibitorische NK Rezeptoren und LAG3, einem Protein, das die suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen vermittelt. Die restlichen $CD8\alpha\alpha^+$ T-Zellen tragen den $TCR\gamma\delta$ Rezeptor. Sie exprimieren ebenfalls LAG3 und scheinen regulatorische Funktionen wahrzunehmen. Darüber hinaus erhalten sie die Epithelbarriere über die Produktion von GM-CSF und KGF, welche die Proliferation von Epithelzellen insbesondere nach Verletzungen stimulieren (Cheroutre und Madakamutil, 2004; Chen et al., 2002). Wie am Modell der Dextran natrium-sulfat (DSS) induzierten Colitis zu sehen, führt eine beschädigte Barriere durch das Eindringen von Bakterien zu schweren Darmentzündungen. Insbesondere KGF regt die Proliferation von Epithelzellen an und beschleunigt damit die Heilung nach Verletzungen. GM-CSF führt in EC und den $CD103^+CX3CR1^-$ dendritischen Zellen (DC) der Lamina propria zur Synthese der immunsuppressiven Retinsäure (Yokota et al., 2009).

Da $CD8\alpha\alpha^+$ T-Zellen auch im Darm von thymektomierten Mäusen vorkommen, wenn auch in geringerer Zahl, war ihre Herkunft lange Zeit umstritten. Mittlerweile besteht weitgehend die Meinung, dass eine Entstehung im Darm zwar prinzipiell möglich ist, diese Zellen unter normalen Bedingungen aber im Thymus gebildet werden (Cheroutre und Lambolez, 2008; Hayday und Gibbons, 2008).

Im Gegensatz zum Epithel befinden sich kaum $CD8^+$ T-Zellen in der Lamina propria. Hier dominieren $CD4$ T-Zellen und B-Zellen, die IgA Antikörper in das Darmlumen ausschütten. Abbildung 1.4 zeigt die Verteilung der Lymphozytenpopulatio-

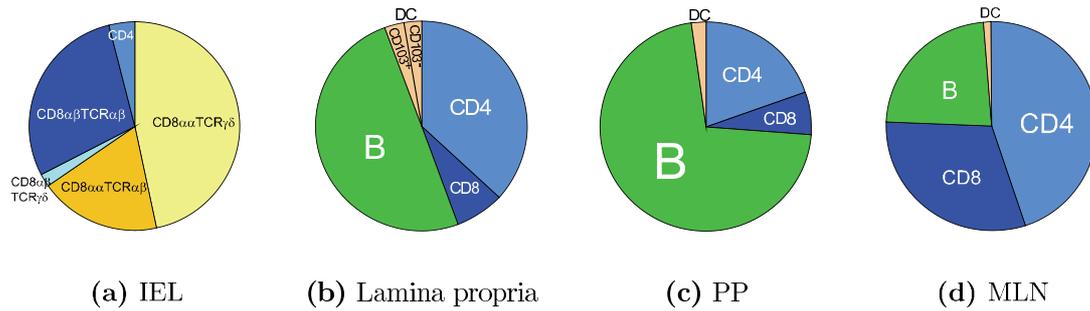


Abbildung 1.4: Verteilung der dendritischen Zellen (DC), CD8 T-Zellen, CD4 T-Helferzellen und B-Zellen in verschiedenen Teilen des Darmimmunsystems des Dünndarms (aus eigenen Daten) CD103⁺: CD103⁺CX3CR1⁻ DC, CD103⁻: CD103⁻CX3CR1⁺ DC

nen in den Kompartimenten des GALT. Die dendritischen Zellen (DC), definiert als MHCII⁺ CD11c⁺, der Lamina propria bestehen aus zwei distinkten Populationen: CD103⁻CX3CR1⁺ und CD103⁺CX3CR1⁻ DC. CD103⁻ CX3CR1⁺ DC stehen in direktem Kontakt mit dem Epithel und können über lange Fortsätze, die zwischen den EC hindurchreichen, Antigen direkt aus dem Darmlumen aufnehmen (Chieppa et al., 2006). Neben einer niedrigeren CD11c Expression als CD103⁺CX3CR1⁻ DC exprimieren sie außerdem die für Makrophagen typischen Oberflächenmoleküle CD11b, F4/80 und CD14. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CD103⁻CX3CR1⁺ DC im Gegensatz zu den CD103⁺CX3CR1⁻ DC *in vitro* nicht in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren (Schulz et al., 2009). Des Weiteren wandern sie nicht in die MLN, sondern verbleiben in der Lamina propria, wo sie vermutlich eine erste Barriere gegen Infektionen bilden.

Es ist unklar, ob die CD103⁺CX3CR1⁻ DC ebenfalls Antigen aus dem Darm direkt aufnehmen können. Als wahrscheinlicher gilt eine Übergabe von den Epithelzellen oder CD103⁻CX3CR1⁺ DC, wobei letztere nicht unbedingt benötigt werden (Schulz et al., 2009). Als migrierende Zellen transportieren die CD103⁺CX3CR1⁻ DC Antigene in die MLN, wo sie naive T-Zellen stimulieren können. Es konnte gezeigt werden, dass diese DC im Grundzustand tolerogen agieren, also vermehrt regulatorische T-Zellen induzieren (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007) und über die Induktion der Homingrezeptoren CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ auf T-Zellen diese in den Darm dirigieren (Johansson-Lindbom et al., 2005). Beide Funktionen scheinen durch Retinsäure vermittelt zu werden, da sich naive T-Zellen *in vitro* durch Retinsäure zu regulatorischen T-Zellen differenzieren lassen, bei gleichzeitiger Expression von CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ (Coombes et al., 2007; Svensson et al., 2008). Das Gen *ald1a2*, welches für das Schlüsselenzym der Retinsäuresynthese RALDH2 (retinaldehyde dehydrogenase 2)

kodiert, wird von $CD103^+CX3CR1^-$ DC stark exprimiert (Coombes et al., 2007). Gleichzeitig scheint das Zytokinmilieu im Darm und den MLN entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit der $CD103^+CX3CR1^-$ DC zu haben, tolerogene und über CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ in den Darm einwandernde T-Zellen zu generieren, da ihnen dies bei entzündlichen Darmerkrankungen (Shale und Ghosh, 2009) oder nach Austausch der MLN mit peripheren Lymphknoten nicht mehr möglich ist (Hammerschmidt et al., 2008).

Bei Peyer'schen Plaques handelt es sich um Lymphfollikel, die in die Wand des Dünndarms eingebettet sind. Dabei ist die Verteilung nicht gleichmäßig, sondern sie treten gehäuft im Bereich des Duodenums und besonders des Ileums auf. In C57BL/6 Mäusen wurden in eigenen Untersuchungen meist 5-7 Plaques pro Darm gefunden, Schwankungen zwischen 2 und 11 waren aber nicht untypisch. Über auf Antigenaufnahme und -präsentation spezialisierte M-Zellen stehen sie in direktem Kontakt zum Darmlumen. Sie zählen somit auch zur ersten Verteidigungslinie des Darms und übernehmen mitunter die Reifung der IgA sezernierenden B-Zellen der Lamina propria.

Wie in Abbildung 1.4(c),(d) zu sehen ist, ist die Verteilung der T- und B-Zellen in PP und MLN invers zueinander. Während in den PP - wie auch in der Lamina propria- überwiegend B-Zellen und kaum $CD8^+$ T-Zellen vorkommen, überwiegen in den MLN die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Sie drainieren den gesamten Dünndarm und den proximalen Teil des Colons und übernehmen somit die Modulation der Immunreaktion auf fast alle Darmantigene.

1.5.2 Entstehung oraler Toleranz

Nach oraler Aufnahme größerer Mengen eines Antigens "lernt" das Immunsystem, dieses Antigen zu tolerieren. Das heißt, dass auch nach Immunisierung weder im Darm noch systemisch eine Immunantwort ausgelöst wird (Kato et al., 2001). In Abbildung 1.5 sind die wichtigsten Faktoren bei der Entstehung der oralen Toleranz (OT) dargestellt.

Die erste Barriere gegen Antigen aus dem Darmlumen bilden die EC, die $TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen und $CD103^-CX3CR1^+$ Zellen. Dabei fördern die EC über die Sekretion von IL-7 und IL-15 das Überleben der $TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen (Kennedy et al., 2000), welche wiederum über KGF und GM-CSF die Proliferation der EC steuern (Chen et al., 2002). EC und $CD103^-CX3CR1^+$ Zellen nehmen Antigen aus dem Darm

auf und geben es an die CD103⁺CX3CR1⁻ DC weiter (Schulz et al., 2009). Diese können als einzige DC Population der Lamina propria in die MLN wandern, um dort Antigen zu präsentieren (Schulz et al., 2009). Im Gegensatz zu den PP werden die MLN für die Entstehung der OT unbedingt benötigt (Worbs et al., 2006). Ebenso muss Antigen von den CD103⁺CX3CR1⁻ DC dorthin transportiert werden, denn anders als die CD103⁻ DC, die aus der Peripherie in die MLN kommen, können CD103⁺CX3CR1⁻ DC große Mengen an Retinsäure und TGF β synthetisieren. Dadurch können sie naive T-Zellen sehr effizient zu regulatorischen T-Zellen (Treg) differenzieren (Coombes et al., 2007; Strober, 2008) und induzieren gleichzeitig CCR9 und $\alpha 4\beta 7$, die Homingrezeptoren für den Darm (Johansson-Lindbom et al., 2005). EC und TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen können die Retinsäuresynthese der CD103⁺CX3CR1⁻ DC über die Sekretion von GM-CSF steigern (Yokota et al., 2009).

Die Tregs können in den Darm einwandern und dort spezifisch via IL-10 und TGF β die Aktivität von anderen T-Effektorzellen unterdrücken, die das gleiche Antigen erkennen. Mitunter verhindern sie so auch die Ausschüttung spezifischer Antikörper in das Darmlumen. Es wird vermutet, dass sie nicht nur in den Darm, sondern auch in periphere Lymphknoten wandern und dadurch die systemische Toleranz erreicht wird (Tsuji et al., 2003).

Die Differenzierung von antiinflammatorischen Treg und von inflammatorischen Th17 Zellen hemmen sich gegenseitig. Retinsäuresynthese fördert die Treg-Entstehung und blockiert gleichzeitig die Differenzierung von Th17 Zellen, indem sie die Sekretion und die Wirkung der benötigten Zytokine hemmt. Im Gegenzug behindert IL-6, welches für die Entstehung von Th17 Zellen essentiell ist, die Differenzierung von Treg über die Verminderung der Expression des Retinsäurerezeptors auf naiven T-Zellen (Nolting et al., 2009). Unter inflammatorischen Bedingungen können die CD103⁺CX3CR1⁻ DC neben IL-6 und IL-21 für die Th17 Entwicklung auch Zytokine synthetisieren, welche die Th1 oder Th2 Differenzierung fördern. (Johansson-Lindbom et al., 2005).

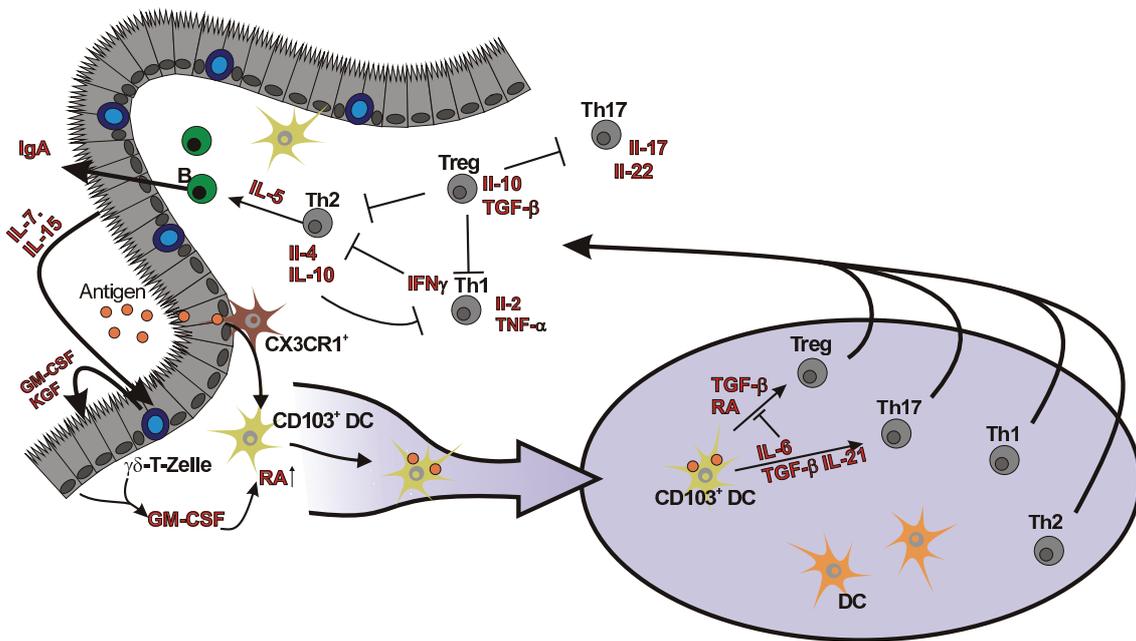


Abbildung 1.5: Möglicherweise an der oralen Toleranz beteiligte Zellen und Zytokine. Antigen wird von EC oder CD103⁻CX3CR1⁺ DC aus dem Darmlumen aufgenommen und an CD103⁺CX3CR1⁻ DC übergeben. Diese wandern über die drainierenden Lymphgefäße in die MLN, wo sie entweder durch Sekretion von Retinsäure und TGFβ die Differenzierung von Treg fördern oder via IL-6, IL-21 und TGFβ Th17 Zellen generieren. Diese können in den Darm einwandern, wo die Treg die Aktivität von T-Effektorzellen und die Ausschüttung von Antikörpern hemmen, während Th17 über die Produktion von IL-17 und IL-22 proinflammatorisch wirken. RA: Retinsäure, γδ T-Zelle: TCRγδ⁺ T-Zelle

1.6 Zielsetzung

Die Funktion des AhR als Vermittler der Toxizität von TCDD auf das periphere Immunsystem und die Thymozytenentwicklung wurde in den vergangenen Jahren bereits umfassend beleuchtet. Die Aufnahme von AhR-Liganden erfolgt aber hauptsächlich über unsere Nahrung. Durch den ständigen Kontakt mit harmlosen Antigenen muss das Immunsystem des Darms auf die Auslösung und Erhaltung von Toleranz spezialisiert sein, aber gleichzeitig auch schnell auf gefährliche Substanzen, pathogene Bakterien oder Viren reagieren können. Die Effekte von Dioxinen und die Rolle des AhR in diesem Zusammenhang sind aber noch weitgehend unerforscht. Daher befasst sich diese Arbeit mit der Bedeutung des AhR in Bezug auf die Entstehung oraler Toleranz. Eine Störung der Regulationsmechanismen kann im günstigsten Fall in Nahrungsmittelallergien aber auch in chronischen Entzündungen resultieren.

Zunächst wurde geklärt, in welchen Geweben und Zellen des Darms und der MLN der AhR exprimiert wird und ob dieser funktionell ist, also ob eine Aktivierung mit TCDD zu einem veränderten Expressionsprofil führt. Die Rolle des AhR in der oralen Toleranz wurde anschließend in zwei Aspekten untersucht:

Einerseits wurden die Effekte einer Überaktivierung des AhR durch TCDD betrachtet. Ziel war hier, herauszufinden, ob TCDD die zelluläre Zusammensetzung im GALT verändert und die Entstehung der oralen Toleranz beeinflusst. Die beteiligten Zytokine wurden analysiert, um die Ursachen für etwaige Änderungen zu finden.

Da sich mittlerweile die Hinweise auf eine endogene Rolle des AhR häufen, wurden andererseits entwicklungsbedingte Veränderungen an AhR-KO Mäusen untersucht, um Hinweise auf physiologische Funktionen des AhR für das Immunsystem des Darms zu erhalten. Neben der Analyse der Zellzusammensetzung in den Geweben des GALT wurde dabei auch die Fähigkeit zur Ausprägung von oraler Toleranz getestet. Vor allem im Hinblick auf die häufigen Darmvorfälle in AhR-KO Mäusen stellt sich die Frage, ob der AhR eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Immunhomöostase im Darm und damit der Darmgesundheit spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Die FITC oder Biotin gekoppelten Antikörper für die durchflusszytometrischen Färbungen wurden in einer Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Von den restlichen Antikörpern wurden $2\mu\text{g/ml}$ verwendet. Ausnahmen bildeten die Antikörper gegen MHCII ($0.2\mu\text{g/ml}$), FoxP3 ($2\mu\text{g/ml}$) und APC gekoppeltes Streptavidin ($0,66\mu\text{g/ml}$). Die Titer wurden in Vorversuchen als geeignet ermittelt.

Tabelle 2.1: Antikörper für die Oberflächenfärbung. Wenn nicht anders vermerkt, stammen die Antikörper aus Ratten. (arm. H.: armenischer Hamster)

Antigen	Fluoreszenz	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3	APC	145-2C11	IgG1 (arm. H.)	Natutec, Wien, Österreich
CD4	APC	RM4-5	IgG2a	Biolegend, San Diego, USA
CD4	FITC	GK1.5	IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	PerCP	RM4-5	IgG2a	Biolegend, San Diego, USA
CD5	FITC	53-7.3	IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg
CD8 α	PerCP	53-6.7	IgG2a	BD Biosciences, Heidelberg
CD8 β	PE	H35-17.2	IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg
CD11c	FITC	N418	IgG1 (arm. H.)	Natutec, Wien, Österreich
CD16/32	-	2.4G2	IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg
CD19	APC	MB19-1	IgA (Maus)	Natutec, Wien, Österreich
CD25	PE	PC61	IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
CD69	PE	H1.2F3	IgG1 (arm. H.)	BD Biosciences, Heidelberg
CD103	PE	2E7	IgG (arm. H.)	Natutec, Wien, Österreich
MCHII	APC	M5/114.15.2	IgG2b	Natutec, Wien, Österreich
TCR $\alpha\beta$	FITC	RR3-15	IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg
TCR $\gamma\delta$	FITC	UC7-13D5	IgG3 (arm. H.)	Natutec, Wien, Österreich
TCR $\gamma\delta$	Bio	GL3	IgG2 (arm. H.)	Natutec, Wien, Österreich
TCR $\gamma\delta$	FITC	GL3	IgG2 (arm. H.)	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 2.2: Antikörper für die intrazelluläre Färbung

Antigen	Fluoreszenz	Klon	Isotyp	Hersteller
FoxP3	FITC	FJK-16s	IgG2a	Natutec, Wien, Österreich
IFN γ	Biotin	XMG1.2	IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
IFN γ	APC	XMG1.2	IgG1	Biolegend, San Diego, USA
IL-10	PE	JES5-16E3	IgG2b	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17	PE	TC11-18H10.1	IgG1	Biolegend, San Diego, USA
IL-6	PE	MP5-20F3	IgG1	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 2.3: Isotypen und Streptavidin-Konjugate

Typ	Konjugat	Hersteller
Streptavidin	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin	PE	Biolegend, San Diego, USA
Streptavidin	APC	Natutec, Wien, Österreich
Isotyp Ratte IgG1	PE	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp Ratte IgG2a	PE	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp Ratte IgG2b	PE	BD Biosciences, Heidelberg

Für MACS wurden anti-CD4, anti-CD8 und Streptavidin Microbeads von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach zusammen mit MS-Säulen (Kapazität 2×10^8 Zellen, davon 1×10^7 markiert) verwendet.

Tabelle 2.4: ELISA- Antikörper und Standards

Antigen	Konjugat	Klon	Hersteller
Ziege anti Maus IgG1	-		Sigma Adrich, München
Ziege anti Maus IgG1	Biotin	polyklonal	SBA, Birmingham, USA
Ziege anti Maus IgA	-	TEPC-15	Sigma Adrich, München
Ziege anti Maus IgA	Biotin	polyklonal	SBA, Birmingham, USA
Standards			
IgA		233.1.3	Siekevitz et al. (1987)
IgG1		N1 G9	Cumano und Rajewsky (1985)
OVA IgA			vereinigte Proben immunisierter Tiere
OVA IgG1			vereinigte Proben immunisierter Tiere

Für die Erstellung des eigenen Standards der OVA-spezifischen IgG1 Antikörper wurden Mäuse zunächst mit OVA in CFA intraperitoneal immunisiert. 12 Tage später wurde der Antikörpertiter im Blut durch eine zweite Immunisierung mit OVA in IFA maximiert (vergleiche Kapitel 2.2.15). Die drei Tage später gewonnenen Serumsproben wurden im ELISA auf das Vorkommen OVA-spezifischer Antikörper untersucht und die Serumsproben mit gut messbaren Titern als Standard vereinigt. Für den IgA Standard wurden die Mäuse nach der zweiten Immunisierung dreimal jeden zweiten Tag mit 1mg OVA gefüttert, um die Sekretion OVA-spezifischer Antikörper in den Kot zu stimulieren. Die einen Tag später gewonnenen Kotproben wurden wie unter 2.2.15 beschrieben aufbereitet, auf das Vorkommen OVA-spezifischer Antikörper überprüft und entsprechend vereinigt. Die so hergestellten Standards dienten bei der Messung OVA-spezifischer Antikörper im ELISA als Referenz, um verschiedene Platten miteinander vergleichen zu können. Die OVA-spezifischen Titer sind im Ergebnisteil als Vielfaches des jeweiligen Standards angegeben.

2.1.2 Primer

Neue Primer wurden mit der Universal Probe Library (Roche, 2009) erstellt. Durch Primer-BlastTM wurde verifiziert, dass die Primersequenzen nur an die gewünschte RNA binden. Das heißt, dass sie sich an mehr als zwei Stellen von allen anderen Genen unterscheiden und ein Intron überspannen, um die Vervielfältigung möglicher DNA Verunreinigungen zu verhindern.

Tabelle 2.5: Primersequenzen

Größe: Größe des vervielfältigten Fragments (bp), Temp.: Bindungstemperatur der Primer (°C)

Primer	vorwärts (5'→3')	rückwärts (3'→5')	Größe	Temp.
HPRT	GCT GGT GAA AAG GAC CTC T	CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC	249	60
RPS6	ATT CCT GGA CTG ACA GAC AC	GTT CTT CTT AGT GCG TTG CT	246	55
AhR	AGG ACC AAA CAC AAG CTA GA	TGG AGA TCT CGT ACA ACA CA	391	55
AhRR	GCC AAT GCT GTC TAA TGA AG	AAC AGA GCA CCA AGA AAA CA	336	55
Cyp1a1	TCC TTG CAT GTC CAT GTT TC	TGC ATA AGC AAA ATA CAG TCC A	344	55
ald1a2	CAT GGT ATC CTC CGC AAT G	GCG CAT TTA AGG CAT TGT AAC	66	60
GM-CSF	GCC ATC AAA GAA GCC CTG AA	GCG GGT CTG CAC ACA TGT TA	114	60
IL-10	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA	ACT GCT CCA CTG CCT TGC T	191	60
IL-15	CAG TGA CTT TCA TCC CAG TT	CAT TTG GAC AAT GCG TAT AA	244	55

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Peqlab, Erlangen
Rinderserum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
ConA	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Adlrich, München
DNA-100bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Biomol, Wien, Österreich
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
FoxP3 Staining Kit	Natutec, Wien, Österreich
GM-CSF ELISA Ready SET GO!	Natutec, Wien, Österreich
GolgiPlug (enthält BrefeldinA)	BD Biosciences, Heidelberg
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Ionomycin	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Lineares Polyacrylamid (LPA)	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl	Sigma Adlrich, München
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaN ₃	Sigma Adlrich, München
NaOH	Merck, Darmstadt
Olivenöl	Sigma Adlrich, München
OptiPrep Density Gradient Medium	Sigma Adlrich, München
Ovalbumin Grad VI	Sigma Adlrich, München

Fortsetzung Tabelle 2.6

Substanz	Hersteller
p(dT)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
PerColl Separating Solution	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Propidium Iodid	Sigma Adrich, München
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
SybrGreen 2xSensiMix ¹	Quantace, Berlin
2,3,7,8 TCDD (100% rein in DMSO)	Promochem, Wesel
Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
TMB Ready to use substrate	Natutec, Wien, Österreich
Trizol TM	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt

¹besteht aus Hot-Start DNA-Polymerase, Sensi Reverse Transkriptase, Ultra-Pure dNTPs, MgCl₂ (6 mM) und SYBR Green I

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
DNase I (RNase frei)	10.000 $\frac{U}{ml}$	Invitrogen, Karlsruhe
DNase Puffer		Invitrogen, Karlsruhe
MMLV Reverse Transkriptase	200 $\frac{U}{\mu l}$	Promega, Mannheim
RTase Puffer		Promega, Mannheim
RNase Inhibitor	40 $\frac{U}{\mu l}$	Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase VIII von Clostridium Histolytikum	6000 $\frac{U}{ml}$	Sigma Adrich, München

2.1.4 Versuchstiere

Es wurden 8-12 Wochen alte, weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 und AhR-KO Mäuse aus der institutseigenen Zucht verwendet. AhR-KO Mäuse wurden 1996 von Schmidt et al. (1996) aus Stammzellen der Mauslinie 129/sv durch Deletion des Exons 2 generiert und auf C57BL6 Hintergrund zurückgekreuzt. Die Haltung entsprach den SPF Richtlinien der Federation European Laboratory Animal Science Association (FELASA). Die Abwesenheit insbesondere von Krankheitserregern des Darms wurde regelmässig über die mikrobiologische Untersuchung von Sentinel-Mäusen überprüft. Die Tiere erhielten autoklaviertes Standardfutter und Wasser *ad libitum* und wurden bei einem konstanten 12h/12h hell/dunkel Zyklus gehalten.

2.1.5 Programme

Programm	Hersteller
CellQuest 3.3	BD Biosciences, Heidelberg
Corel Draw 12	Corel Corporation, Ottawa, Canada
Excel 2000	Microsoft, Redmont, USA
FlowJo 7.2.1	Tree Star, Ashland, USA
JabRef	Open Source Community (GNU)
Kile	Open Source Community (GNU)
OpenOffice 2.4	Sun Microsystems, Santa Clara, USA
Powerpoint 2000	Microsoft, Redmont, USA
Prism 5	GraphPad, San Diego, USA
RotorGene 6	Qiagen, Hilden

2.1.6 Puffer

PBS wurde vor der Verwendung in der Zellkultur autoklaviert. Zur Entfernung von Schwebstoffen wurde der FACS Puffer filtriert. Der MACS-Puffer wurde sterilfiltriert. Alle anderen Puffer wurden maximal einen Tag vor Versuchsbeginn frisch angesetzt, da die Haltbarkeit wegen des enthaltenen FCS oder BSA begrenzt war. Für die Zugabe von HEPES und EDTA wurden 1M bzw. 0,25M Stammlösungen verwendet, die bei 4°C unbegrenzt haltbar sind.

1xPBS, pH7,4

140mM NaCl
2mM KCl
1,5mM KH₂PO₄
8mM Na₂HPO₄

FACS-Puffer

140mM NaCl
4mM KCl
2mM KH₂PO₄
20mM Na₂HPO₄
0,7mM EDTA

MACS-Puffer

0,5% BSA
2mM EDTA
in PBS

IEL-Isolation

0,9x PBS
10% FCS
15mM Hepes
5mM EDTA

11,5% Iodexanol (w/v)

71% (w/v) NaCl
80mM EDTA
0,4% (w/v) BSA
8,1mM Hepes
pH 7,4 einstellen
0,19% (v/v) OptiprepTM

15% Iodexanol (w/v)

0,25% (v/v) OptiprepTM
0,75% (v/v) HBSS

PBS/3mM EDTA

125ml 1x PBS
1,5ml 0,25M EDTA

RPMI/FCS/EGTA

50ml RPMI 1640
0,5ml FCS
19mg EGTA
75µl 1M MgCl₂

RPMI/Kollagenase

24ml RPMI 1640
6ml FCS
direkt vor Verdau zugeben
750µl Kollagenase VIII
(6000U/ml)

PBS/BSA/Azid

0,5% BSA
1mM NaN₃
in PBS

Perm-Puffer

0,5% Saponin
in PBS/BSA/Azid

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von intraepithelialen Lymphozyten

Zunächst wurde der Darm entnommen, indem man ihn in der Nähe des Magens mit einer Pinzette fasst, vom Magen abtrennt und dann vorsichtig schräg nach oben zieht, so dass das Mesenterium vollständig in der Bauchhöhle verbleibt. So wurde verhindert, dass Lipide aus sterbenden Fettzellen des Mesenteriums die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) schädigen. Direkt vor dem Blinddarm wurde der Dünndarm abgeschnitten und mit einer 20G Schlundsonde gründlich mit PBS gespült. Anschließend wurden die PP entfernt, um eine Kontamination der IEL mit den dort vorhandenen Lymphozyten auszuschließen, der Darm der Länge nach aufgeschnitten und in ca. 1cm große Stücke zerteilt. Je ein Darm wurde in ein 50ml Röhrchen überführt. Die IEL bilden etwa 15% (Rocha et al., 1994) der epithelialen Zellen und liegen oberhalb der Basalmembran. Durch Inkubation für 45min in 25ml mit 5mM EDTA bei 37°C und kräftigem Schütteln im Wasserbad (GFL, Düsseldorf, > 30% der Maximalgeschwindigkeit) lösen sich die epithelialen Zellen von der Basalmembran. Die genaue Zusammensetzung der Lösung für die IEL Isolation wird in 2.1.6 beschrieben. Trotz anschließender Filtration durch ein Sieb (cell strainer, BD Biosciences, Heidelberg) mit 100 μ m Maschengröße, verblieben noch relativ viele Schwebstoffe in der Lösung. Eine Zellzählung mit Trypanblau ergab pro Darm ca. 5×10^7 lebende Zellen bei einer Vitalität von 50%. Um Schwebstoffe, tote Zellen und einen großen Teil der Epithelzellen zu entfernen, wurden die Zellen auf einen PerCollTM-Gradienten aufgetragen. Hierzu wurde zunächst PerCollTM19:1 mit 20xPBS gepuffert und die so erhaltene 100% PerCollTM-Lösung mit 1xPBS auf 75%, 40% und 25% verdünnt. Angefangen bei 75% wurden die verschiedenen PerCollTM-Konzentrationen mit einer 10ml Pipette aufeinandergeschichtet, ohne sie zu vermischen, wobei sich die Zellen in der 25% Fraktion befanden. Die Trennung erfolgte bei 500G für 20min bei RT ohne Bremse. Die IEL befanden sich zwischen der 75% und der 40% Fraktion (Abb. 2.1). Pro Darm erhält man zwischen 1,5 und 3Mio. lebender Zellen bei einer Vitalität von über 80%.

2.2.2 Isolation von Lamina propria Zellen

Jeder Darm wurde wie für die Isolation der IEL (s. 2.2.1) beschrieben präpariert, mit PBS gespült, in ca. 1cm lange Stücke geteilt und in einen 3cm durchmessenden Glaszylinder überführt. Alle folgenden Schritte wurden auf einem Heizrührer bei 37°C und 200rpm durchgeführt. Um die Temperatur möglichst konstant zu halten, habe

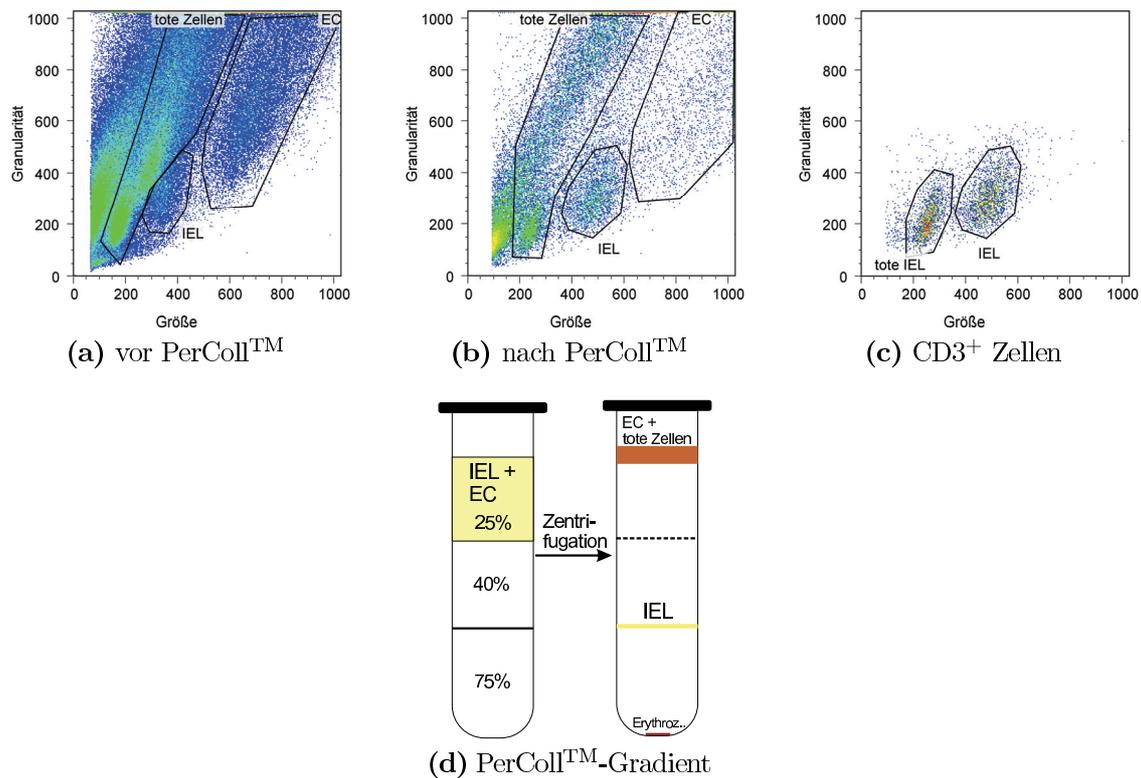


Abbildung 2.1: Scatter von IEL nach Isolation (a) ohne und (b) mit PerCollTM. Die Umrandeten Bereiche bezeichnen die Lage der IEL, EC (Epithelzellen) und toter Zellen. Am linken Rand befinden sich Zellfragmente. (c) Scatter CD3⁺ Zellen wurden genutzt, um die IEL zu identifizieren (d) Schematische Darstellung des PerCollTM-Gradienten vor und nach Zentrifugation.

ich zunächst Wasser in einem großen Becherglas auf dem Rührer erwärmt, in das dann die Glaszylinder mit den Proben gestellt wurden. Alle verwendeten Lösungen wurden vorgewärmt, und die Temperatur des Wassers während der Isolation kontinuierlich mit einem Digitalthermometer kontrolliert.

Um die IEL zu entfernen, wurden die ca. 30 Darmstücke jedes Darms zwei mal für 10min in 50ml PBS/3mM EDTA inkubiert (für die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer siehe 2.1.6) und der Überstand verworfen. Es folgten zwei je 15 minütiger Inkubationen in 15ml RPMI/FCS/EGTA. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Danach wurden die Darmstücke in ein 50ml Röhrchen mit 10ml RPMI/FCS/EGTA überführt und für 15sek mit einem Vortex kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit durch ein Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) mit einer Maschengröße von 80 μ m abgossen und die Darmstücke sowie der Glaszylinder mit 1x PBS gespült, da die Kollagenase durch Chelatbildner wie EGTA oder EDTA inaktiviert wird. Bevor die Darmstücke für den eigentlichen Verdau in

das Glas zurückgegeben wurden, erfolgte die mechanische Zerkleinerung mit einer Schere in möglichst kleine Fragmente. Diese wurden bei 200rpm in 30ml Medium mit Kollagenase VIII für 1,5h gerührt. Ein geringeres Volumen oder eine zu hohe Umdrehungszahl führte dazu, dass die Zellen von dem Rührfisch zerschlagen wurden. Nach je 45min wurde die Lösung mit einer 10ml Pipette kräftig auf- und abpipetiert. Wenn der Darm vollständig verdaut war, wurden die Zellen durch ein Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) mit $80\mu\text{m}$ großen Maschen filtriert. Nach Zentrifugation (1200rpm, 8min) wurden die Zellen in 2ml PBS aufgenommen und die Vitalität mit Trypanblau am Mikroskop überprüft. Je Darm wurden etwa 3 Millionen lebende und 500.000 tote Zellen (15%) isoliert.

2.2.3 Isolation von Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und Peyer'schen Plaques

Die mesenterialen Lymphknoten (MLN) liegen nebeneinander am Beginn des Dickdarms. Verwendet wurden die drei großen zusammenhängenden Lymphknoten. Die Peyer'schen Plaques (PP) liegen in der Wand des Dünndarms und können anhand ihrer hellen, körnigen Struktur gut erkannt werden. Pro Maus finden sich zumeist etwa 5-7 PP, die Anzahl kann aber zwischen zwei und elf stark variieren. Die PP wurden mit einer Pinzette gefasst und mit einer Schere möglichst flach aus dem Darm ausgeschnitten.

Für die Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die MLN und PP mit einer Pinzette unter leichtem Druck durch ein Sieb (cell strainer, BD Biosciences, Heidelberg) mit $100\mu\text{m}$ Maschengröße gerieben. Vorheriges Anfeuchten des Siebes mit etwa 1ml PBS erhöhte die Vitalität der gewonnenen Zellen. Aus den MLN konnten etwa 1×10^7 lebende Zellen gewonnen werden. Der Anteil toter Zellen lag bei 5-15%. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an PP pro Maus schwankte die Zahl der isolierten lebenden Zellen zwischen 2,5 und 8×10^6 , die Zahl pro PP lag bei ca. $0,7 \times 10^6$. Da immer auch einige Epithelzellen und Zellen der Darmwand mit ausgeschnitten wurden, die relativ schnell sterben, lag die Vitalität mit 70-80% unter der der mesenterialen Lymphknoten.

2.2.4 Färbung von Oberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie

Von einer Einzelzellsuspension wurden bis zu $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Färbung eingesetzt. Zunächst wurden die Fc-Rezeptoren mit anti CD16/32 Antikörpern ($2\mu\text{g}/\text{ml}$) in

15min bei 4°C blockiert. Es folgte ein Waschschrift in dem 10-fachen Volumen PBS. Nach Zentrifugation bei 1200rpm für 8min wurden die Zellen mit den gewünschten Antikörpern für 15min bei 4°C inkubiert. Eine Liste der verwendeten Antikörper und Konzentrationen findet sich unter 2.1. Falls biotinylierte Antikörper verwendet wurden, wurden die letzten beiden Schritte (Waschen und Färben) mit einem Streptavidin-Konjugat wiederholt. Nach erneutem Waschen in PBS und Zentrifugieren wurden die Zellen entweder direkt am Durchflusszytometer (FACS Calibur) gemessen oder für mehrere Tage in 2% (intraepitheliale Lymphozyten in 1%) PFA in PBS bei 4°C gelagert. Für jede durchflusszytometrische Messung wurde die Kompensation anhand von Einzelfärbungen für die verwendeten Fluorochrome angepasst. Die Verstärkung der Photovervielfacher wurde anhand ungefärbter Zellen bestimmt. Für die Datenaufnahme und Speicherung als Liste im "FCS"-Standard wurde das Programm CellQuestTM verwendet.

2.2.5 Kultivierung von primären Lymphozyten für die intrazelluläre Zytokinfärbung

Direkt nach der Isolation der Lymphozyten aus MLN und PP wurden diese mit Trypanblau in einer Neubauer Kammer gezählt und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in einer 24-Well Platte ausgesät. Das Medium (RPMI/ 10%FCS/ 1%PS) enthielt 5ng/ml PMA und 250ng/ml Ionomycin für die unspezifische Stimulation von T-Zellen, da die Zytokinkonzentration in inaktiven T-Zellen für eine Färbung zu gering ist. Gleichzeitig wurde 1 μ l GolgiPlugTM (BD Biosciences, Heidelberg, enthält BrefeldinA) pro ml Medium zugegeben, um den Golgi-Apparat zu blockieren und somit die Ausschüttung von Zytokinen zu verhindern. Nach 5h (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen für die FACS-Färbung geerntet.

2.2.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Nach Stimulation und Kultivierung mit BrefA (s.Kapitel 2.2.5) wurden zunächst die Oberflächenmoleküle wie unter 2.2.4 beschrieben gefärbt. Da relativ hohe Verlust durch die häufigen Waschschriftte bei der intrazellulären Färbung auftreten, wurden pro Färbung mindestens 1×10^6 Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 20min bei RT in 2% PFA in PBS fixiert, danach mit PBS/BSA/Azid gewaschen und mit 300 μ l Perm-Puffer 10min bei RT permeabilisiert. (Die Zusammensetzung der Puffer ist unter 2.1.6 aufgeführt.) Nach dem Abzentrifugieren wurden die Antikörper in Perm-Puffer verdünnt und die Zellen in 50 μ l für 20min bei RT im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Perm-Puffer und ein weiteres

Mal in PBS/BSA/Azid gewaschen, um den Hintergrund zu minimieren. Zusätzlich wurden für alle intrazellulären Antikörper die entsprechenden Isotypen (s. Tabelle 2.2) gefärbt, um auf unspezifische Bindungen kontrollieren zu können. Die durchflusszytometrische Messung wurde wie bei der Oberflächenfärbung (s. Kapitel 2.2.4) durchgeführt.

FoxP3

Für die intrazelluläre Färbung von FoxP3 wurden die von Natutec, Wien, Österreich mitgelieferten Puffer verwendet, da mit dem oben beschriebenen Protokoll keine Bindung des Antikörpers erreicht werden konnte. Die Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung für 45min bei 4°C in 500µl des kombinierten Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer fixiert. Nach dem Abzentrifugieren wurden sie über Nacht mit 2µg/ml FoxP3 in 100µl Permeabilisierungspuffer gefärbt, mit 2ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und wie oben beschrieben am Durchflusszytometer analysiert. Die Fixierung mit diesem Puffer verkleinerte, wie im zugehörigen Protokoll angegeben, die Zellen deutlich, so dass ihre Streuung mit der von toten Zellen vergleichbar war. Leider funktionierte die Färbung von Zytokinen in den Puffern von Natutec, Wien, Österreich nicht, so dass ein Kombinationsfärbung von FoxP3 und z.B. IL-17 nicht gelang.

2.2.7 T-Zell Proliferationsmessung

Die Proliferationsmessung erfolgte über Abnahme der Fluoreszenzintensität von CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidylester). Dieser grün fluoreszierende Farbstoff lagert sich in die Zellmembran ein, so dass bei jeder Zellteilung je die Hälfte auf die Tochterzellen übertragen wird. Die damit verbundene Halbierung der Fluoreszenzintensität und somit auch die Anzahl der Zellteilungen lässt sich durchflusszytometrisch bestimmen (Parish, 1999).

Zu einer Einzelzellsuspension aus kompletten mesenterialen Lymphknoten (1×10^7 Zellen pro ml in PBS) wurde CFSE mit einer Endkonzentration von 5µM zugegeben und 10min bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Ein Waschschriff mit Medium (RPMI/10%FCS/1%PS) inaktivierte die Reaktion durch das enthaltene FCS. Anschließend wurden $2-4 \times 10^5$ Zellen in 200µl Medium mit 10µg/ml Con A bei 37°C und 5%CO₂ in einer 96-Well Platte stimuliert. Nach 3,5 Tagen wurden sie mit PerCP-anti CD8α und APC-anti CD4 Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Bezugspunkt für die ungeteilten Zellen waren unstimulierte, CFSE

gefärbt Lymphozyten, da CFSE innerhalb von 3-4 Tagen auch im Brutschrank teilweise ausbleicht. Dadurch läßt sich die Fluoreszenzintensität des CFSE direkt nach der Färbung nicht als Referenz verwenden lässt.

Con A bindet an Glykoproteine auf der Zelloberfläche und kreuzvernetzt dabei auch den TCR/CD3 Komplex (Kay, 1991), benötigt aber zusätzlich das Vorhandensein von Antigen-präsentierenden Zellen, um die T-Zell Proliferation anzuregen (Anderson et al., 1979). Die in den MLN enthaltenen 20% B-Zellen und 1% DC waren dafür ausreichend. Bei Proliferationsversuchen mit Zellen der Milz mussten die T-Zellen aber zunächst über MACS (s. Abschnitt 2.2.8) bis zu einer Reinheit von etwa 80% konzentriert werden, da die sonst vorhandenen 70% B-Zellen die Proliferation behinderten.

2.2.8 MACS (Magnetic-activated cell separation)

Die Methode des MACS beruht darauf, dass spezifische, mit 50nm großen Magnetpartikeln beladene Antikörper an die zu sortierenden Zellen gebunden werden. Lässt man diese Zellen eine Säule mit Eisenmatrix in einem 0,6T Magnetfeld passieren (Miltenyi et al., 1990), so werden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten. Dadurch können diese Zellen sowohl angereichert als auch aus den Zellen depletiert werden, die die Säule ungehindert passieren.

Im Einzelnen wurde die Sortierung mit MACS wie folgt durchgeführt: Je 10^7 Zellen wurden in $90\mu\text{l}$ MACS-Puffer (s. Abschnitt 2.1.6) und $10\mu\text{l}$ des MACS-Antikörpers für 15min bei 4°C inkubiert. Der MACS-Puffer enthält BSA, um die Vitalität der Zellen zu erhalten und EDTA, welches ein Aneinanderhaften der Zellen verhindert. Abweichend von der von Miltenyi vorgeschlagenen Antikörpermenge wurden bei anti-CD8 und anti-CD4 Separationen nur $5\mu\text{l}$, bei anti-CD19 nur $3\mu\text{l}$ verwendet, da dadurch weniger Antikörper unspezifisch an anderen Zellen banden und die Reinheit deutlich verbessert werden konnte. Währenddessen wurde die Säule im Permanentmagneten mit $500\mu\text{l}$ LP äquilibriert. Die gewaschenen Zellen wurden anschließend in $500\mu\text{l}$ MACS-Puffer auf die Säule aufgetragen und die Säule 3 mal mit $500\mu\text{l}$ MACS-Puffer gewaschen. Um die gebundenen Zellen von der Säule zu eluieren, wurde diese aus dem Magneten entfernt, 1ml MACS-Puffer aufgetragen und zügig mit dem Stempel durchgedrückt. Zur Kontrolle der Reinheit wurde eine Fluoreszenzfärbung der gleichen Oberflächenantigene durchgeführt (s. Kapitel 2.2.4), die im MACS selektiert wurden, und der Anteil positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die

Reinheit lag zwischen 80% und 90%. Eine Zellzählung des Eluats und der an der Säule zurückgehaltenen Zellen mit Trypanblau ergab etwa 30% Verlust im Vergleich zu eingesetzten Zellzahl.

2.2.9 Zellsortierungen

TCR $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\alpha$ IEL

Um die CD8 $\alpha\alpha$ ⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ IEL zu isolieren, wurden zunächst die IEL, wie unter 2.2.1 beschrieben, mit EDTA abgelöst und anschließendem PerCollTMGradienten gereinigt. Die IEL wurden zunächst mit biotinylierten anti-TCR $\gamma\delta$ Antikörpern inkubiert, um die TCR $\gamma\delta$ ⁺ Zellen zu markieren. Die für die folgende MACS-Separation benötigten Magnetpartikel wurden über Streptavidin (Streptavidin Beads, 10 μ l pro 100 μ l) an die biotinylierten Antikörper gekoppelt und die Zellen wie im Kapitel 2.2.8 beschrieben angereichert. Die durchflusszytometrische Analyse Oberflächenfärbung des Eluats mit FITC-anti-CD3, PE-anti-CD8 β und Streptavidin-APC (für die Färbung des biotinylierten anti-TCR $\gamma\delta$) ergab, dass innerhalb der Leukozyten 80% der Zellen den TCR $\gamma\delta$ Rezeptor trugen, dass aber auch viele Epithelzellen unspezifisch an die für MACS verwendeten Antikörper gebunden haben. Der Anteil der EC lag nach MACS immer noch bei 50%. Daher wurden mit der Sortiereinheit des Durchflusszytometers die CD8 β ⁻ CD3⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ Zellen im Einzelzellmodus sortiert. Dadurch konnten TCR $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ Zellen mit einer Reinheit von über 90% gewonnen werden.

Darmepithelzellen

Für die Sortierung der Darmepithelzellen wurden ebenfalls die IEL wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben präpariert. Allerdings wurde kein PerCollTMGradient durchgeführt, da ein Entfernen der EC offensichtlich nicht gewünscht war. Da die EC im Darm alle 1-3 Tage vollständig erneuert werden (CREAMER et al., 1961), wurden viele tote oder alte Zellen isoliert, die den Stress der EDTA-Behandlung nicht überlebten. Dadurch enthielt die gewonnene Einzelzellsuspension etwa 50% tote EC, die bei der durchflusszytometrischen Analyse zwar etwas kleiner erschienen, sich aber nicht eindeutig anhand ihrer Brechungseigenschaften identifizieren ließen (s. Abb. 2.2). Deshalb wurden die Zellen direkt vor der Sortierung am Durchflusszytometer im Einzelzellmodus für etwa 2min mit 40 $\frac{ng}{ml}$ Propidium Iodid behandelt. Dieses kann nur in tote Zellen eindringen und fluoresziert nach DNA-Bindung bei 617nm (Steinkamp et al., 1999). Dabei ist zu beachten, dass die EC an sich schon sehr autofluoreszent sind. Ein Beispiel ist in Abb. 2.2 gezeigt. Die ebenfalls enthaltenen

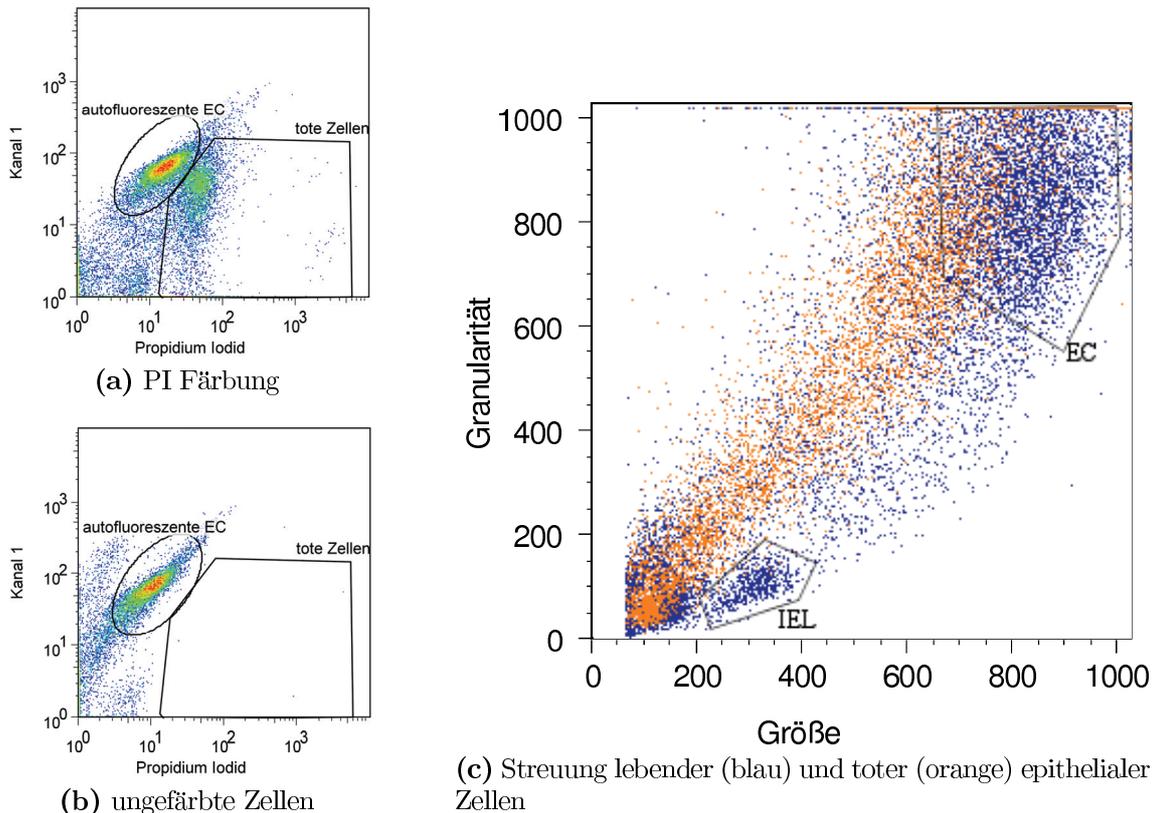


Abbildung 2.2: Beispiel für (a) die Färbung toter intraepithelialer Zellen mit Propidium Iodid (PI) und (b) ungefärbte IEL als Kontrolle. (c) Streuung lebender, PI-negativer (blau) und toter, PI-positiver (orange) epithelialer Zellen. Sortiert wurden die mit EC beschrifteten PI negativen Zellen.

Lymphozyten waren deutlich weniger granulär und ließen sich problemlos anhand ihrer Streuung ausschließen.

CD103⁺ DC aus MLN

Zellen der MLN wurden wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben isoliert. Eine Aufreinigung der DC über MACS blieb erfolglos, da die Zellen durch den MACS-Säulen induzierten Stress spätestens während des Sortierens am Durchflusszytometer starben. Daher wurden die DC über eine Gradientenzentrifugation nach dem OptiPrepTM Protokoll C20 von Sigma angereichert. Hierfür wurden die Zellen in 4ml einer 15% Iodexanol Lösung (s. 2.1.6) gelöst, mit 5ml 11,5% Iodexanol und abschließend mit 3ml HBSS überschichtet und für 15min bei 600g ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Da die DC eine geringere Dichte als andere Zellen besitzen, treiben sie in die Interphase zwischen HBSS und 11,5% Iodexanol. Die zellfreie 11,5% Iodexanol Schicht bewirkt dabei eine sauberere Trennung (s. Abb. 2.3).

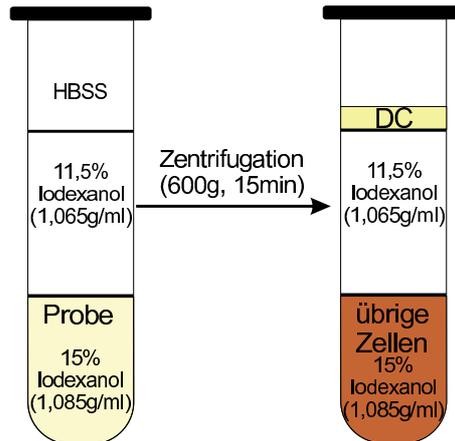


Abbildung 2.3: Aufbau eines OptiPrep™ Gradienten vor und nach der Zentrifugation

Die bis auf 50% angereicherten DC wurden für die weitere Sortierung mit FITC-anti-CD11c, PE-anti-CD103 und APC-anti-MHCII gefärbt. Am Durchflusszytometer wurden die Zellen im Einzelzellmodus sortiert, die positiv für alle drei Antigene waren. Die MLN einer Maus enthalten etwa 50.000 CD103⁺ DC. Durch Verlust während der Sortierung wurden die MLN von vier Mäusen benötigt, um 40.000 Zellen bei 90% Reinheit zu erhalten.

2.2.10 Gewinnung von RNA

- aus Einzelzellen

300.000 bis 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführt und bei 730g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa $30 \mu\text{l}$ dekantiert und das Pellet der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden in $500 \mu\text{l}$ TRIzol™ aufgenommen und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. TRIzol™ ist eine einphasige Mischung aus Phenol als Lösungsmittel für Proteine und DNA und Guanidinium Isothiocyanat, um RNAsen zu inaktivieren.

Nach dem Auftauen der Proben wurden $100 \mu\text{l}$ Chlorophorm für die RNA Extraktion zugegeben und für 20sek auf einem Vortex gut vermischt. Anschließend wurde für 15min bei 16.000g zentrifugiert, um eine Trennung in zwei Phasen zu erreichen. Die in der oberen wässrigen Phase enthaltene RNA wurde abgenommen, ohne die in der Interphase enthaltene DNA mitzuziehen. In der organischen Phase befinden sich die Proteine. Die RNA wurde nach Zugabe von $250 \mu\text{l}$ Isopropanol 15min bei RT gefällt und dann für 15min bei 16.000g abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift in $500 \mu\text{l}$ Ethanol wurde das Pellet kurz trocknen gelassen bis

der Ethanol vollständig verdampft war, aber die RNA noch nicht klar aussah. Die RNA wurde in $20\mu\text{l}$ RNase freiem (DEPC) Wasser gelöst und die Konzentration am NanodropTMSpektrophotometer bestimmt.

- aus geringen Zellzahlen

Für die Aufreinigung der RNA aus weniger als 100.000 Zellen wurde ein leicht abgewandeltes RNA-Isolationsprotokoll verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert, aber nur in $300\mu\text{l}$ TRIzolTM lysiert und bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden $5\mu\text{l}$ LPA (lineares Polyacrylamid) zugegeben, um die Effizienz der Fällung zu verbessern. Anschließend erfolgte die Phasentrennung mit $60\mu\text{l}$ Chloroform und die Fällung mit Isopropanol durch Zugabe des 0,7-0,8fachen Volumens der abgenommenen wässrigen Phase. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen in $400\mu\text{l}$ Ethanol wurde die RNA in $10\text{-}12\mu\text{l}$ DEPC-Wasser gelöst.

- aus Darmgewebe

Für die Genexpressionsanalysen im Darm wurde die RNA direkt aus dem Darmgewebe isoliert. Der Darm wurde in die drei Segmente Duodenum, Jejunum und Ileum geteilt (s. Abb. 2.4), gewaschen, längs aufgeschnitten und in 1cm Stücke zerlegt. Diese wurden in ein Eppendorf Röhrchen mit 1ml TRIzol überführt und 3h bei 37°C und 300rpm geschüttelt, um das Gewebe zu lysieren. Die anschließende RNA-Extraktion verlief wie unter 2.2.10 beschrieben.

2.2.11 cDNA Synthese

50ng bis $1\mu\text{g}$ RNA in $8\mu\text{l}$ wurden mit $1\mu\text{l}$ DNase (Endkonzentration $1\text{U}/\mu\text{l}$) und $1\mu\text{l}$ 10x DNase Puffer für 15min bei RT inkubiert, um eventuelle DNA-Verunreinigungen zu entfernen. Der Verdau wurde mit $1\mu\text{l}$ EDTA (Endkonz. 20mM) in 10min bei 60°C gestoppt. Die Anlagerung der p(dT) Primer ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) an den Poly-A-Schwanz der RNA erfolgte in 5min bei 60°C . Für die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurden je Ansatz $7\mu\text{l}$ RNase freies Wasser, $8\mu\text{l}$ 5x Reverse Transkriptase Puffer, $2\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase ($200\text{U}/\mu\text{l}$), $4\mu\text{l}$ DTT (100mM), $4\mu\text{l}$ dNTP (je 10mM) und $2\mu\text{l}$ RNase Inhibitor ($40\text{U}/\mu\text{l}$) benötigt. Die Reaktion dauerte 60min bei 37°C . Die Enzyme wurden bei 70°C in 10min inaktiviert.

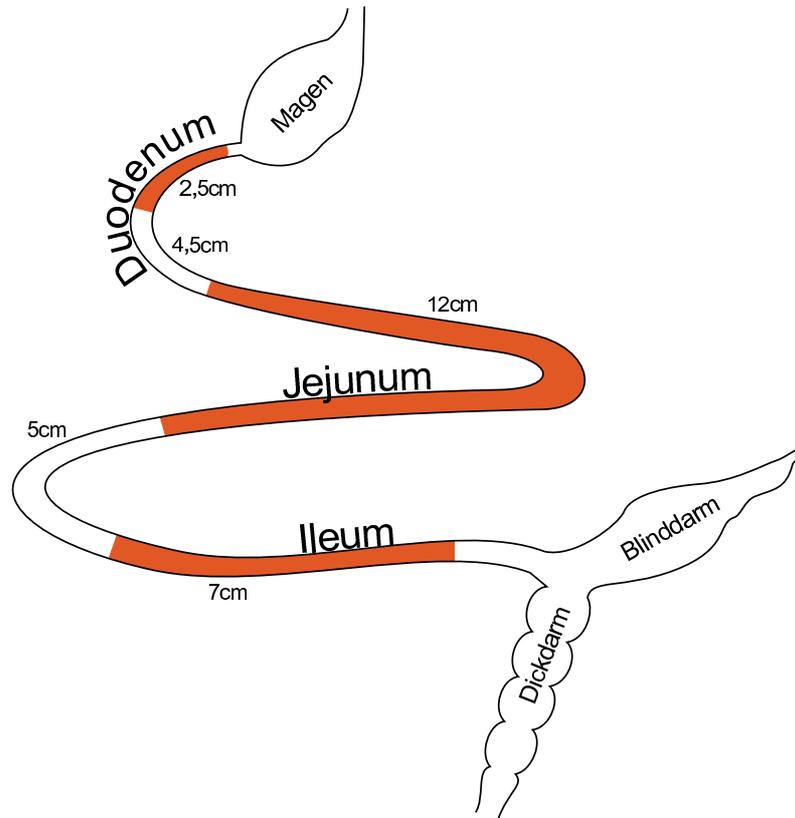


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Magen-Darmtrakts. Die farblich hinterlegten Bereiche markieren die Teile, die für die Zytokinmessungen als Duodenum, Jejunum und Ileum entnommen wurden. Die weißen Bereiche dienten als Sicherheitsabstand und wurden verworfen.

2.2.12 sqRT-PCR (semi-quantitative Real-Time Polymerase chain reaction)

Die sqRT-PCR bestimmt die Menge einer bestimmten RNA in Relation zu einem Haushaltsgen der Zelle. Beispiele hierfür sind RPS6 (Ribosomales Protein 6) und HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) (Frericks und Esser, 2008). Während der PCR-Reaktion wird der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen™ in die doppelsträngige cDNA eingebunden, so dass die Menge an DNA über die Fluoreszenz bei 521nm bestimmt werden kann. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz einen Schwellenwert überschreitet wird als SP (Schnittpunkt) bezeichnet. Die Differenz von SP des Haushaltsgen zu untersuchtem Gen (ΔSP) normiert die Expression auf die eingesetzte cDNA-Menge. Somit lassen sich verschiedene cDNA Proben direkt miteinander vergleichen.

Um in jeder Reaktion die exakt gleiche cDNA Menge einzusetzen, wurde zunächst eine Stammlösung aus cDNA und nukleasefreiem (nf) Wasser hergestellt. Für jedes

zu quantifizierende Gen wurden $1\mu\text{l}$ cDNA und $4,5\mu\text{l}$ nf-Wasser benötigt. Je $5,5\mu\text{l}$ der verdünnten cDNA wurden in $0,2\mu\text{l}$ fassende Plastikröhrchen pipettiert, mit 1mM Primer und $7,5\mu\text{l}$ 2xSybrGreenTM SensiMix, der bereits alle benötigten Enzyme und Nukleotide enthielt, vermischt und die sqRT-PCR Messung im RotorGene 3000 gestartet. Die optimale Annealing Temperatur und Fragmentlänge findet sich in Tabelle 2.5.

2.2.13 GM-CSF-Messung im Darm

Der Darm wurde wie unter 2.2.10 beschrieben präpariert und die Stücke für 6h bei 37°C und 5% CO_2 in 1ml DMEM in 24well-Platten kultiviert. Wegen seiner Länge wurden die Stücke des Jejunums auf zwei Ansätze verteilt und die Messwerte später addiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert und die sezernierte Zytokinmenge im ELISA ((Enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt. Hierzu wurde das von Natutec, Wien, Österreich empfohlene Protokoll für den GM-CSF ELISA befolgt, allerdings wurden alle Volumina auf $50\mu\text{l}$ halbiert. Für die Bestimmung des Nullwerts wurde anstelle des Kulturüberstandes DMEM aufgetragen. Für die Extinktionsmessung bei 450nm und 570nm wurde das Photometer EL800 von Bio-Tek, Bad Friedrichshall verwendet. Da theoretisch immer die gleiche Lichtmenge bei 570nm absorbiert werden sollte, diente die Messung bei dieser Wellenlänge dazu, Unebenheiten innerhalb der Platte auszugleichen. Die Extinktionswerte abzüglich des Nullwerts berechneten sich demnach folgendermassen:

$$\text{Delta-OD} = \frac{A_{450} - A_{450}(\text{Nullwert})}{A_{570} - A_{570}(\text{Nullwert})}$$

2.2.14 Behandlung von Mäusen mit TCDD

Den Mäusen wurden $10\mu\text{g}$ TCDD pro Kilogramm Körpergewicht in $100\mu\text{l}$ Olivenöl per Gavage verfüttert. In Einzelfällen wurden auch Mäuse verwendet, denen die Lösung intraperitoneal appliziert wurde. Dies ist in dem jeweiligen Ergebnisteil vermerkt. Durch die unterschiedliche Darreichungsform konnte kein Unterschied festgestellt werden, was mit den von Lakshmanan et al. (1986) und Nau und Bass (1981) veröffentlichten Daten übereinstimmt. Diese besagen, dass sich TCDD innerhalb von 24h Stunden unabhängig von der Behandlungsmethode in Ratten und NMRI Mäusen identisch verteilt.

2.2.15 Auslösen und Test von oraler Toleranz

Orale Toleranz beschreibt den Zustand, wenn nach oraler Aufnahme eines Antigens keine systemische Immunantwort gegen dieses Antigen mehr ausgelöst werden

kann (Weiner, 1994; Kato et al., 2001). In Vorversuchen habe ich festgestellt, dass bei C57BL/6 Mäusen eine dreimalige Gabe von je 20mg OVA p.o. (Schlundsonde, 25G) im Abstand von 2-3 Tagen ausreicht, um Toleranz gegen OVA zu induzieren. Protokolle mit geringeren Dosen oder einer einmaligen Fütterung mit bis zu 50mg OVA pro Maus führten zwar zu einer Reduktion der spezifischen Immunantwort um 80-90%, nicht aber zu einer vollständigen Unterdrückung. Dies wurde getestet, indem die Mäuse eine Woche nach Auslösen der oralen Toleranz gegen OVA immunisiert wurden (s. 2.2.15) und nach weiteren 10 Tagen, also nach Abschluss des Antikörperklassenwechsels zu IgG1, das Blut auf das Vorhandensein von OVA-spezifischen Antikörpern untersucht wurde. Insgesamt wurden drei Immunisierungen durchgeführt, um den Titer der OVA-spezifischen Antikörper zu maximieren und den Verlauf der Immunantwort nach TCDD-Gabe oder in AhR-KO Mäusen zu beobachten. Nach parenteraler Immunisierung werden keine spezifischen Antikörper in den Darm sekretiert (McGhee, 1999). Kato et al. (2001) konnten zeigen, dass nach oraler Immunisierung mit OVA und dem Adjuvans Cholera Toxin spezifische Antikörper sowohl im Serum als auch im Kot vorhanden waren. Diese Art der Immunisierung birgt aber den Nachteil, dass nur etwa 50% der Mäuse darauf ansprechen (Lauterslager und Hilgers, 2002), so dass ich die Mäuse zunächst mit wie oben beschrieben zweimal i.p. immunisiert habe. Dadurch konnte ich nach dreimaliger Fütterung von OVA (je 1mg im Abstand von 2-3 Tagen) auch ohne Zugabe eines Adjuvans OVA spezifische IgA Antikörper im Kot messen. Der experimentelle Ablauf und die Zeitpunkte der Blut- und Kotprobennahmen ist in der folgenden Abbildung 2.5 dargestellt.

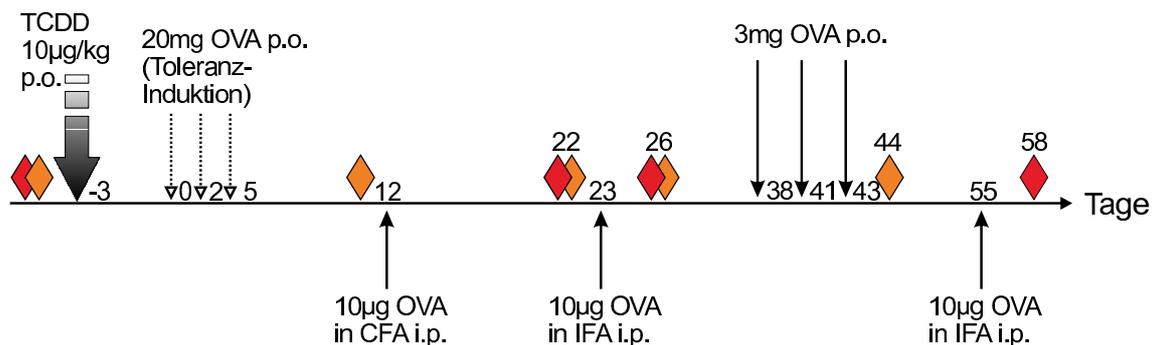


Abbildung 2.5: Ablauf des Experiments zur Untersuchung der Rolle des AhR in der oralen Toleranz (OT). Fütterung mit TCDD (Tag -3) und Induktion der OT (Tag 0,2,5) wurden nur in den entsprechenden Gruppen durchgeführt. ♦ Zeitpunkte der Kotprobennahme ◆ Zeitpunkte der Blutprobennahme

Immunisierung von Mäusen

Für die erste Immunisierung wurden 10 μ g OVA in komplettem Freund's Adjuvanz (CFA) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Für alle folgenden Immunisierungen wurde unvollständiges Freund's Adjuvanz (IFA) statt CFA verwendet, um Entzündungen des Bauchraums zu vermeiden. Pro Maus wurden 10 μ g OVA in 50 μ l PBS mit 50 μ l Freund'schem Adjuvanz auf einem Vortex gründlich gemischt. Die entstandene Emulsion war weiß und zerfloss nach Auftropfen auf Wasser nicht.

Gewinnung von Serum- und Kotproben zur Antikörperbestimmung

Pro Maus und Zeitpunkt wurden mindestens 2 Kotstückchen in 2ml Eppendorf Gefäßen eingesammelt. Wegen des unterschiedlichen Wassergehalts wurden diese offen und mit einem Tuch abgedeckt im Kühlschrank für etwa 3 Tage getrocknet. Je 100mg der Kotproben wurde 1ml PBS/0,01% NaN₃ zugegeben und bei 30°C und 1400min⁻¹ im Eppendorfschüttler gelöst (Kinoshita et al., 2006). Je nach Anzahl der Kotstücke dauerte dies 2-4h, wobei regelmäßig durch Invertieren und Schütteln der Eppendorf Röhren gründlich geprüft wurde, ob auch alle Stücke gelöst waren. Die Schwebstoffe wurden anschließend in 8min bei 5000rpm abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

Für die Blutabnahme wurden den Mäusen je 2-4 Tropfen Blut (entspricht 50-100 μ l) aus der Submandibularvene entnommen (Golde et al., 2005). Die Wunde verschließt sofort, wenn die durch das Halten der Maus aufgebaute Spannung der Haut gelöst wird. Nachdem das Blut für 1,5h bei RT geronnen war, wurde es ebenfalls 8min bei 5000rpm abzentrifugiert, das klare Serum in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.16 Antikörper-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Für die Bestimmung der IgG1 und IgA Antikörpertiter im Serum oder Kot wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Die Bindung des ersten Antikörper an die Platte geschah bei 4°C über Nacht in Bindungspuffer von Ebioscience, pH7,4. Für den Nachweis von OVA-spezifischen Antikörpern wurde anstelle des Erstantikörpers 100 μ g/ml OVA verwendet und wahlweise über Nacht bei RT oder für 2h bei 37°C an die Platte gebunden. Anschließend wurden die Platten 3x mit PBS/0,05% Tween gewaschen und für 1h bei RT mit 3% FCS in PBS blockiert. Nach Ausschlagen der Lösung wurden die Proben in den in Tabelle 2.8 angegebenen Verdünnungen aufgetragen.

Tabelle 2.8: Verdünnungen der Serums- und Kotproben für die Bestimmung der spezifischen und unspezifischen IgG1 und IgA Titer

Nachweis von	Probe	Verdünnung
IgG1	Serum	1:30.000, 1:60.000, 1:120.000, 1:240.000
OVA-spez. IgG1	Serum	1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000
IgA	Serum	1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000
	Kot	1:4.000, 1:8.000, 1:16.000, 1:32.000
OVA-spez. IgA	Kot	1:2 oder 1:4 in Doppelbestimmung

Da nur für die Bestimmung des Gesamt-IgG1 und -IgA Standards zur Verfügung standen, wurden als Standard für die Bestimmung von OVA-spezifischen Antikörpern eigene Seren bzw. Kotproben verwendet. Seren von zweimal mit OVA immunisierten Tieren (vgl.2.2.15) wurden mittels ELISA auf das Vorkommen von OVA-spezifischem IgG1 überprüft und bei positivem Ergebnis als Standard vereinigt. Für die Gewinnung der Kotproben, mit denen genauso verfahren wurde, wurden die Mäuse zusätzlich noch dreimal mit 1mg OVA gefüttert.

Die Inkubation der Proben erfolgte bei RT für 3h. Es folgten vier Waschschrte und eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper (s. Tab. 2.4). Ungebundene Antikörper wurden in vier Waschschrten gründlich entfernt. Über Streptavidin ließ sich nun eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) an den Zweitantikörper koppeln (30min, RT). Für den Nachweis mit TMB (3,3',5,5' tetramethyl Benzidin) muss überschüssige Strept-HRP in fünf Waschschrten vollständig entfernt werden, da bereits Spuren an zurückgebliebener HRP in hohem Hintergrund resultieren würden. TMB wurde von der HRP innerhalb von Minuten in einen blauen, löslichen Farbstoff umgewandelt. Die Reaktion wurde mit 2N H₂SO₄ gestoppt und das dann gelbe Produkt zügig im ELISA Reader bei 450nm gemessen, da der Farbstoff mit der Zeit wieder zerfällt. Eine weitere Messung bei 570nm diente der Überprüfung, ob Unterschiede durch Eigenschaften der Platte selber zustande kamen. Für die Auswertung wurde die als Delta-OD bezeichnete Differenz aus den Messungen bei 450nm und 570nm und ihren jeweiligen Nullwerten verwendet (Wells in denen anstelle der Proben nur PBS/1% FCS aufgetragen wurde).

$$\text{Delta-OD} = \frac{A_{450} - A_{450}(\text{Nullwert})}{A_{570} - A_{570}(\text{Nullwert})}$$

2.2.17 Statistik

Für die statistischen Tests wurde das Programm PrismTM von GraphPad verwendet. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen in einem Experiment wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) und ansonsten der Student t-Test verwendet. Beide Tests nehmen in allen Gruppen die gleiche Streuung an. Wenn diese Voraussetzung nicht erfüllt war, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse durch den Kruskal Wallis Test und der Student t-Test durch den Mann Whitney Test ersetzt, die beide keine Gauß-Verteilung benötigen.

3 Ergebnisse

3.1 AhR Expression in Geweben und Zellen des GALT

Die AhR mRNA-Expression variiert stark je nach untersuchtem Gewebe und Zelltyp. So besitzen zum Beispiel die Zellen aus Leber und Thymus vergleichsweise viel AhR, wohingegen er sich in Muskel und Gehirn kaum nachweisen lässt (Frericks et al., 2007). Auch viele Zellen des Immunsystems, wie die meisten T- und B-Zellen, prägen den AhR nur in geringen Mengen aus. Seit einigen Jahren zeigt sich, dass nur einige Subpopulationen wie die Langerhanszellen der Haut und die Th17-Zellen (Jux et al., 2009; Veldhoen et al., 2008) den AhR exprimieren. Daher wurde zunächst untersucht, ob und in welcher Menge AhR-mRNA in den verschiedenen Abschnitten, Strukturen und ausgewählten Zelltypen des Darms vorkommt.

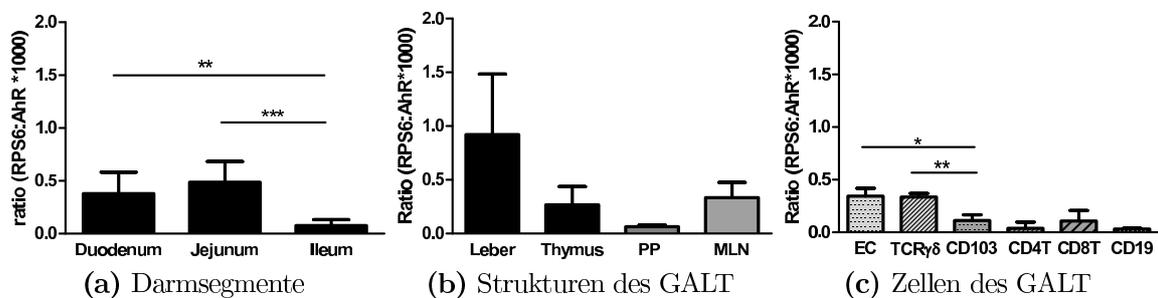


Abbildung 3.1: Relative Expression von AhR-RNA im Vergleich zum Haushaltsgen *RPS6* \pm SD in (a) Darmsegmenten, (b) Strukturen und (c) verschiedenen Zelltypen des GALT. $n \geq 3$, EC: Epithelzellen, TCR $\gamma\delta$: CD8 α^+ TCR $\gamma\delta^+$ intrepitheliale Lymphozyten, CD103: CD103 $^+$ DC aus den MLN. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (Student t-Test)

Für die Bestimmung der AhR Menge in den Darmsegmenten Duodenum, Jejunum und Ileum wurden die Peyer'schen Plaques entfernt und der Darm anschließend wie in Abb. 2.4 dargestellt zerteilt. Durch die nicht verwendeten, weiß dargestellten Bereiche sollte sichergestellt werden, dass die entnommenen Stücke auch zu den angegebenen Bereichen gehören. Das Protokoll für die anschließende Gewinnung der mRNA findet sich in Abschnitt 2.2.10. Duodenum und Jejunum enthalten im Vergleich zum Ileum etwa viermal mehr AhR-RNA (Abb. 3.1a). Die MLN enthalten

zwar deutlich weniger AhR-mRNA als die Leber, im Vergleich mit lymphatischen Organen sind sie aber mit dem Thymus vergleichbar, der für eine starke AhR Expression bekannt ist (Abb. 3.1b) (Jux et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte in den PP nur sehr wenig AhR-mRNA nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich an der unterschiedlichen Zellzusammensetzung von MLN und PP. Während die MLN zu über 70% aus T-Zellen bestehen, enthalten die PP 65-70% B-Zellen (vgl. 3.3.3), welche sehr wenig AhR exprimieren (Abb. 3.1c). B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen wurden über MACS mit einer Reinheit von 80%, CD103⁺ DC, CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ und EC am Durchflusszytometer mit einer Reinheit von annähernd 90% sortiert (vgl. Kapitel 2.2.9). Im Vergleich der einzelnen Zelltypen des GALT findet sich besonders viel AhR in den Epithelzellen und den CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ Zellen des Darmepithels. Allerdings prägen die CD103⁺ DC und CD8⁺ T-Zellen auf den MLN immerhin noch etwa ein Drittel so viel AhR aus.

3.2 Funktionalität des AhR

Um die Funktionalität des detektierten AhR zu überprüfen, wurde die verstärkte Expression der Gene *cyp1a1* und *ahrr* nach TCDD-Exposition untersucht. Dabei handelt es sich bei *cyp1a1* um ein bekanntes Zielgen des AhR aus dem Fremstoffmetabolismus, wohingegen der AhR-Repressor (AhRR) in vielen Zelltypen nach Aktivierung des AhR als dessen Gegenspieler hochreguliert wird (Mimura et al., 1999).

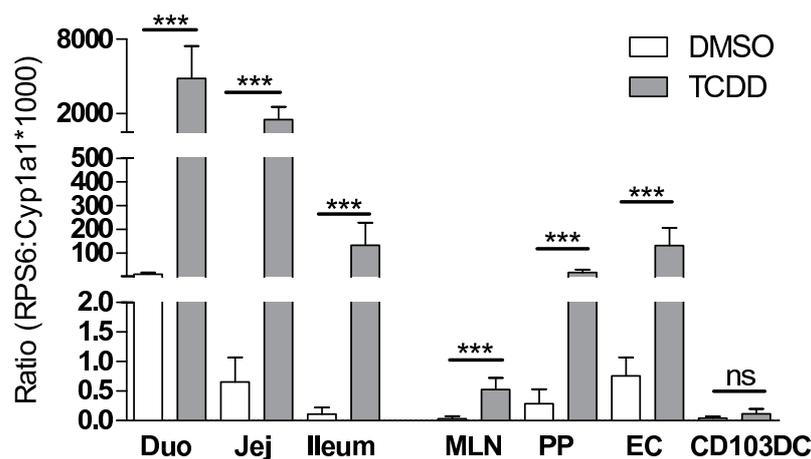


Abbildung 3.2: Induktion von Cyp1a1 mRNA im Vergleich zum Haushaltgen RPS6 drei Tage nach Fütterung von 10 μ g TCDD pro kg KG \pm SD. Duo: Duodenum, Jej: Jejunum. Epithelzellen (EC) und CD103⁺ DC (CD103) wurden mit einer Reinheit von über 90% sortiert. Die Daten der Darmsegmente, PP und EC stammen von je 4-6 Mäusen, die der MLN von 12 Mäusen und die der CD103⁺ DC von je 2-3 Mäusen je Gruppe. ****p* < 0,001 (Student t-Test)

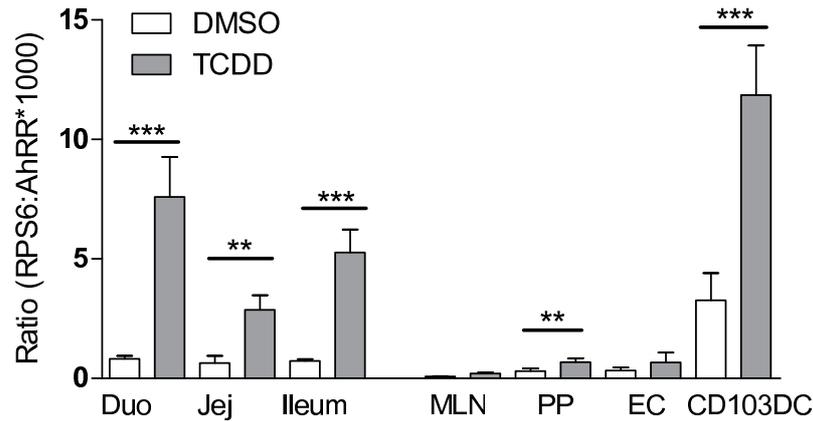


Abbildung 3.3: Induktion von AhRR mRNA im Vergleich zum Haushaltgen RPS6 drei Tage nach Fütterung von $10\mu\text{g}$ TCDD \pm SD. Duo: Duodenum, Jej: Jejunum. Epithelzellen (EC) und CD103⁺ DC (CD103) wurden mit einer Reinheit von über 90% sortiert. Die Daten der Darmsegmente, MLN, PP und EC stammen von je 6 Mäusen und die der CD103⁺ DC von je 2-3 Mäusen. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (Student t-Test)

Im Darm nimmt sowohl die basale als auch die induzierbare *cyp1a1* Expression von proximal nach distal ab (Abb. 3.2). Dies könnte im Ileum an der geringeren AhR Expression liegen. Die Ausprägung des AhR im Jejunum unterscheidet sich aber nicht vom Duodenum, so dass dies nicht die einzige Erklärung sein kann. Der AhRR lässt sich ebenfalls stark durch TCDD induzieren; ein Gradient wurde hier nicht beobachtet (Abb. 3.3). In den Peyer'schen Plaques und den Epithelzellen stieg die Cyp1a1 Expression um das ca. 100fache an, während in CD103⁺ DC sowohl basal als auch nach TCDD fast keine *cyp1a1* mRNA nachweisbar war (Abb. 3.2). Da der AhRR die Aktivität des AhR behindert, könnte die Stärke der Cyp1a1 Induktion reziprok zu der AhRR Expression sein. Hierzu würde passen, dass PP und EC kaum AhRR besitzen, dessen Level sich kaum (PP) oder nicht (EC) durch TCDD beeinflussen lässt. Im Vergleich exprimieren CD103⁺ DC bereits basal sehr viel AhRR, und die Menge lässt sich durch TCDD fast vervierfachen (Abb 3.3). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass AhR in Darm, PP und MLN aktivierbar ist, dass aber eine gleichzeitige hohe AhRR Expression wie in den CD103⁺ DC die Induktion von Zielgenen wie *cyp1a1* möglicherweise unterdrückt werden kann.

3.3 Effekte der Überaktivierung des AhR durch TCDD auf das GALT

3.3.1 Die Immunsuppressive Wirkung von TCDD wird durch wiederholte Immunisierung aufgehoben

Es ist bereits seit langem bekannt, dass TCDD die humorale Immunantwort unterdrückt (Kerkvliet und Brauner, 1990). Diesen Effekt konnte ich in Mäusen anhand der IgG1-Antwort bestätigen, die mit $10\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG gefüttert und 15 Tage später gegen OVA in CFA immunisiert wurden. Die 10 Tage später aus der Submandibularvene entnommenen Serumsproben zeigen einen deutlichen Anstieg der IgG1 Titer in unbehandelten Mäusen (weiße Balken, Abb. 3.4), während die Zunahme nach TCDD (graue Balken) signifikant schwächer ausfiel. Überraschenderweise existierte dieser Unterschied bereits nach der zweiten Immunisierung aber nicht mehr. Um die Effekte von TCDD auf die orale Toleranz zu untersuchen, wurde in zwei weitere Gruppen von Mäusen drei Tage nach der Fütterung mit TCDD oder Olivenöl durch dreimalige Fütterung mit 20mg OVA orale Toleranz induziert. Dadurch sollte sich durch Immunisierung systemisch keine Immunantwort mehr gegen dieses Antigen auslösen lassen (Fowler und Weiner, 1997). Ein Schema der Versuchsdurchführung findet sich in Abb. 2.5. In der toleranten, TCDD behandelten Gruppe stieg der Gesamt-IgG1 Titer nach der dritten Immunisierung stark an (gepunktete graue Balken), so dass kein Unterschied mehr zur unbehandelten, nicht toleranten Kontrollgruppe bestand. Tolerante, nicht TCDD behandelte Tiere zeigten lediglich einen sehr leichten Anstieg der Produktion von IgG1 Antikörpern nach der dritten Immunisierung.

3.3.2 Dioxin verhindert die Etablierung von oraler Toleranz

Orale Toleranz ist antigenspezifisch. Somit lässt sich eine bestehende orale Toleranz testen, indem man mit dem entsprechenden Antigen, in diesem Fall OVA, immunisiert und anschließend Blut und Kot auf das Vorkommen spezifischer Antikörper untersucht. Es wurden die gleichen Proben wie für die Bestimmung des Gesamt-IgG1 Titers im vorherigen Kapitel verwendet, die nach dem in Abbildung 2.5 gezeigten Schema generiert wurden.

Die Bestimmung der OVA-spezifischen Antikörper erfolgte mittels ELISA. Falls in den Serumsproben OVA-spezifische Antikörper enthalten waren, banden sie an das

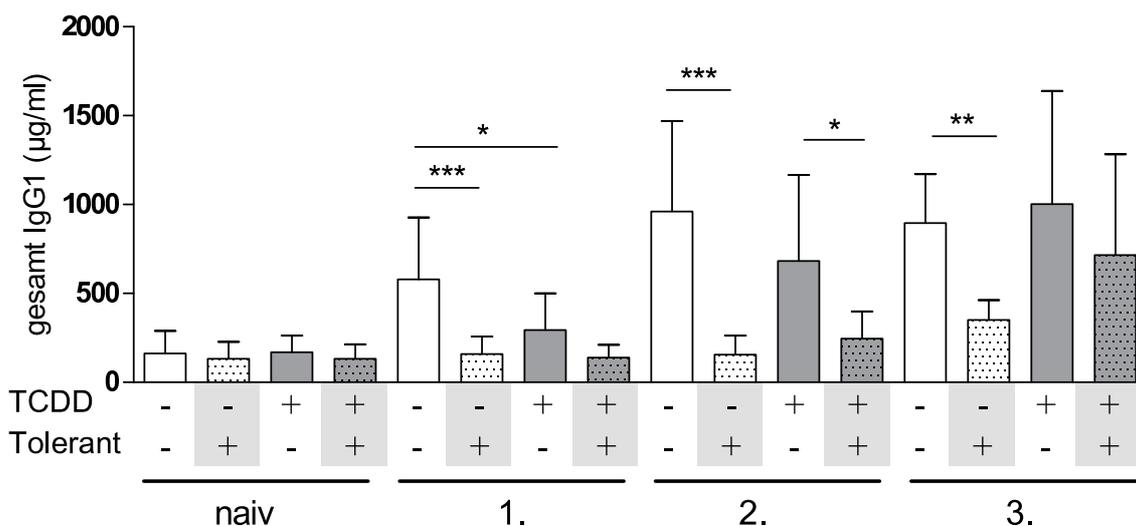


Abbildung 3.4: IgG1 Titer im Serum \pm SD von toleranten (gepunktete Balken) Kontrolltieren (weiße Balken) oder TCDD behandelten Mäusen (graue Balken) nach Immunisierung mit $10\mu\text{g}$ OVA in CFA (1. Immunisierung) oder IFA (2. und 3. Immunisierung). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt > 12 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

an der Platte haftende OVA und konnten durch anti-IgG1 Antikörper detektiert werden. Um die im ELISA erhaltenen Extinktionen miteinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse auf ein aus mehrfach mit OVA immunisierten Tieren eigens generiertes Standardserum bezogen. Eine relative Konzentration von 1 entspricht somit der Konzentration dieses Standards. Dieses Vorgehen war nötig, da kein kommerziell erhältlicher Standard existiert. Die Veränderungen der OVA-spezifischen Antikörper im Serum stimmten in ihrer Tendenz mit den Ergebnissen aus der Messung des Gesamt-IgG1 Titers überein. Wieder verhielten sich die Kontrollgruppen erwartungsgemäß: Während die Konzentration an OVA-spezifischen Antikörpern in den nicht toleranten Tieren mit jeder Immunisierung anstieg, konnten in keinem der toleranten Tiere spezifische Antikörper detektiert werden (Abb. 3.5, weiße Balken). Füttern mit TCDD bewirkte leicht niedrigere OVA-spezifische IgG1 Titer wiederum nur nach der ersten Immunisierung, danach war dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. TCDD-Gabe vor Induktion der OT verhinderte die dauerhafte Etablierung der oralen Toleranz. Bereits nach der ersten bzw. zweiten Immunisierung waren 5 bzw. 6 von 14 Tiere nicht mehr tolerant. Nach der dritten Immunisierung wurden in allen Tieren dieser Gruppe OVA-spezifische Antikörper nachgewiesen, wenngleich die Konzentration geringer war als in den nicht toleranten Gruppen. Sie entsprach in etwa den Titern, die in den Kontrollgruppen nach der zweiten Immunisierung gemessen wurden. Diese Beobachtung könnte die Tatsache widerspiegeln, dass TCDD die Entstehung der oralen Toleranz nicht von Anfang an komplett verhindert. Da-

durch würde die Immunantwort in den toleranten Tieren im Vergleich mit den nicht-toleranten Kontrollen verzögert einsetzen.

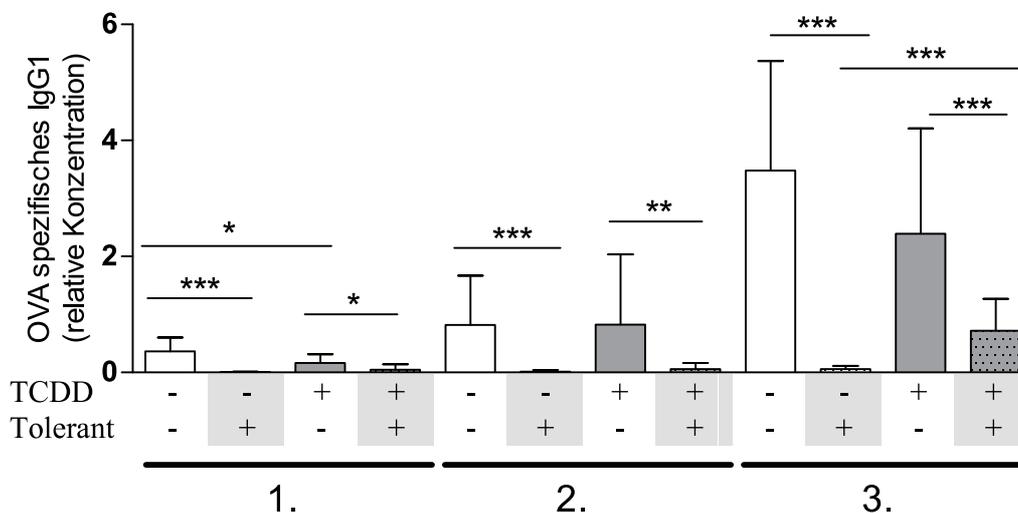


Abbildung 3.5: OVA spezifische IgG1 Titer im Serum \pm SD von toleranten (gepunktete Balken) Kontrolltieren (weiße Balken) oder TCDD behandelten Mäusen (graue Balken) nach Immunisierung mit $10\mu\text{g}$ OVA in CFA (1. Immunisierung) oder IFA (2. und 3. Immunisierung). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt > 12 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

Fehlende Etablierung der OT nach TCDD konnte ebenfalls anhand OVA-spezifischer Antikörper im Kot gezeigt werden. Auch hier sollten nach Entstehung der Toleranz keine spezifischen Antikörper vorkommen (Kato et al., 2001). Für die Messung wurden die Tiere nach der zweiten Immunisierung dreimal mit 1mg OVA gefüttert (IgA Boost), um die Ausschüttung von spezifischen AK in den Kot anzuregen, da diese nach intraperitonealer Immunisierung nicht in den Kot abgegeben werden (Daten nicht abgebildet). Wie in Abbildung 3.6 gezeigt, konnte in TCDD behandelten Tieren auch nach der Induktion von oraler Toleranz die gleiche Menge an OVA-spezifischem IgA nachgewiesen werden wie in der nicht toleranten Kontrollgruppe, so dass hier die Toleranz vollständig aufgehoben wurde. Fütterung von TCDD ohne anschließende Toleranzinduktion führte sogar zu einem Anstieg des sezernierten OVA-spezifischen IgA.

Anders als im Serum machen die OVA spezifischen Antikörper im Kot aber nur einen geringen Anteil an der gesamt IgA Menge aus, so dass diese im Gegensatz zum IgG1 im Serum während des gesamten Versuchs unverändert blieb. Die Werte schwankten unabhängig von der Behandlung relativ stark zwischen ca. 30 und $100\mu\text{g}$ pro 100mg Kot (Abb. 3.7).

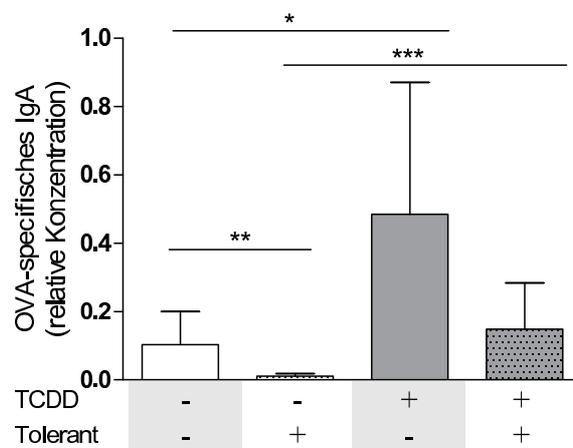


Abbildung 3.6: OVA spezifische IgA Titer \pm SD im Kot nach zweimaliger Immunisierung und erneuter OVA Fütterung (s. 2.5). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt > 12 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

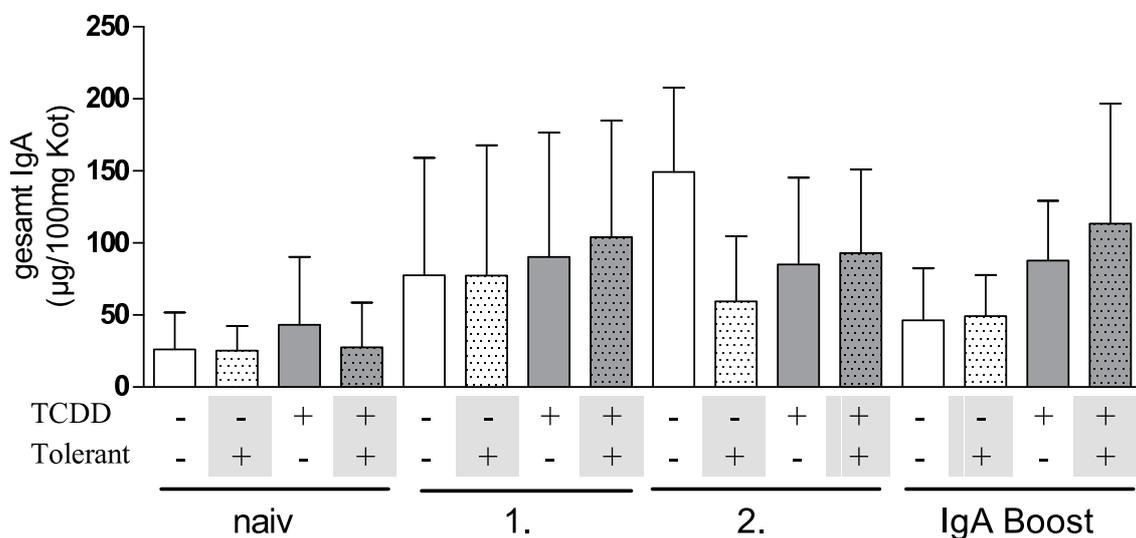


Abbildung 3.7: IgA Titer \pm SD im Kot von toleranten (gepunktete Balken) und/oder TCDD behandelten Mäusen (graue Balken) nach 1. und 2. Immunisierung und erneuter Fütterung mit OVA zur Induktion der spezifischen Antikörperausschüttung in den Kot (IgA Boost). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt > 12 Mäusen pro Gruppe. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (ANOVA).

Insgesamt verhindert TCDD die dauerhafte Etablierung oraler Toleranz, wie anhand OVA-spezifischer Antikörper im Serum und im Kot gezeigt werden konnte. Nach spätestens drei Immunisierungen konnten in allen TCDD behandelten, toleranten Mäusen OVA-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, wohingegen dies bei keinem der toleranten Kontrolltiere der Fall war.

3.3.3 Veränderung der Zellzusammensetzung des GALT durch TCDD

Die unvollständige Etablierung der OT kann verschiedene Ursachen haben: (1) Unspezifische zelltoxische Wirkung des TCDD, (2) Störung des Antigenverkehrs in die MLN, dem Ort der OT-Entstehung oder (3) Beeinflussung der Differenzierung von T-Zellen durch direkte Effekte auf naive T-Zellen oder Veränderung des Zytokinmilieus. Zunächst wurden die einzelnen GALT Kompartimente genauer untersucht. Eine erste makroskopische Betrachtung zeigte keine signifikanten Veränderungen bei Gewicht und Darmlänge 10 Tage nach Fütterung mit $10\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG. Die 8-10 Wochen alten Mäuse wogen ca. 19g bei einer Dünndarmlänge von $35,5 \pm 2,5\text{cm}$. MLN, PP, IEL und LPL wurden wie im Kapitel 2.2.1 - 2.2.3 beschrieben isoliert. Bei der Zellzahlbestimmung mit TrypanBlau konnte kein Unterschied zwischen TCDD behandelten und Kontrolltieren gefunden werden, so dass eine direkte zytotoxische Wirkung ausgeschlossen werden konnte.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Fütterung von $10\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG nach drei oder zehn Tagen die relativen Anteile der Leukozytenpopulationen in den verschiedenen Teilen des GALT verschiebt. Dazu wurden die IEL, LPL und Zellen der MLN und PP von TCDD behandelten oder Kontrolltieren isoliert für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Das Protokoll findet sich im Kapitel 2.2.4 und eine Liste der verwendeten Antikörper in Tabelle 2.1. Pro Probe wurden an einem FACS Calibur etwa 100.000 Zellen aufgenommen und mit FlowJo™ analysiert. Die dabei erhaltenen Frequenzen sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst und beziehen sich bei MLN, PP und lamina propria auf die anhand des Scatters identifizierten lebenden Zellen. In Abbildung 3.8 sind beispielhafte Streudiagramme für die einzelnen Gewebe gezeigt. Da bei den IEL die Trennung von Epithelzellen und Lymphozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität nicht immer exakt möglich war, wurden alle lebenden CD3^+ Lymphozyten als Referenz genommen. Da sich die Frequenzen drei und zehn Tage nach TCDD-Gabe meist nicht unterschieden, sind in diesen Fällen nur die Werte nach zehn Tagen angegeben.

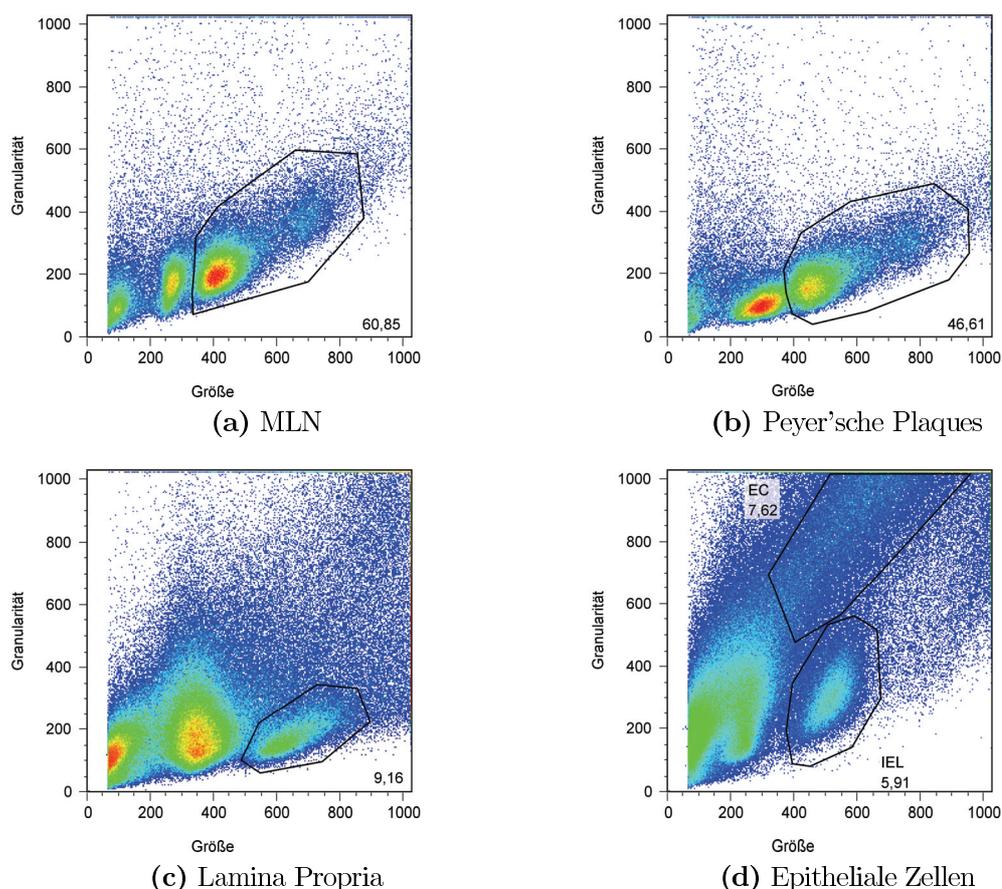


Abbildung 3.8: Scatter der aus den verschiedenen Teilen des GALT isolierten Zellen. Die umrandeten Bereiche umschließen die lebenden Leukozyten, im Epithel wurden zusätzlich die Epithelzellen markiert (s. "EC" in (d)). Die Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der umrandeten Zellen.

Die IEL enthalten weder B- noch dendritische Zellen, sondern bestehen hauptsächlich aus $CD8^+$ T-Zellen, die sich zum einen anhand der Expression von $CD8\alpha\alpha$ und $CD8\alpha\beta$, zum anderen anhand ihres T-Zell Rezeptors ($TCR\gamma\delta$ oder $TCR\alpha\beta$) unterscheiden lassen. Auch wenn die Funktion der einzelnen Populationen noch nicht abschließend geklärt ist, so handelt es sich bei den $CD8\alpha\beta^+TCR\alpha\beta^+$ T-Zellen vermutlich um konventionelle zytotoxische T-Zellen, wohingegen die $CD8\alpha\alpha^+TCR\alpha\beta^+$ Zellen vermutlich regulatorische Funktionen übernehmen (Cheroutre und Madakamutil, 2004). Neben ebenfalls regulatorischen und immunsuppressiven Aufgaben reagieren $CD8\alpha\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen auf Stresssignale des Epithels und sorgen über die Sekretion von GM-CSF und KGF für die Erhaltung der Epithelintegrität (Cheroutre und Madakamutil, 2004; Hämmänen und Harrison, 2000; Chen et al., 2002). Die vorgefundenen Frequenzen (Tab.3.1) entsprechen den Werten in den genannten Literaturangaben. Die Fütterung von $10\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG beeinflusste weder nach drei noch nach 10 Tagen die Frequenz oder die absolute Zellzahl. Wie bereits be-

Tabelle 3.1: Frequenzen der Lymphozytenpopulationen des Epithels 10 Tage nach Fütterung von 10 μ g TCDD^a

	DMSO	TCDD
CD4	4,07% \pm 2,47%	4,36% \pm 2,04%
CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\gamma\delta$	47,42% \pm 10,33%	49,01% \pm 10,84%
CD69 ^b	97,55% \pm 1,28%	97,01% \pm 2,11%
CD11c ^b	23,92% \pm 8,07%	26,44% \pm 7,81%
CD5 ^b	1,72% \pm 0,57%	2,11% \pm 1,02%
CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$	18,90% \pm 6,91%	20,45% \pm 6,08%
CD69 ^b	83,09% \pm 8,89%	64,17% \pm 18,35%
CD11c ^b	21,91% \pm 8,84%	23,34% \pm 7,45%
CD5 ^b	4,36% \pm 2,57%	3,47% \pm 1,13%
CD8 $\alpha\beta$ TCR $\gamma\delta$	2,03% \pm 1,23%	2,02% \pm 1,26%
CD69 ^b	91,93% \pm 7,94%	86,78% \pm 6,98%
CD11c ^b	66,84% \pm 20,72%	53,25% \pm 8,19%
CD5 ^b	4,58% \pm 2,49%	4,29% \pm 2,68%
CD8 $\alpha\beta$ TCR $\alpha\beta$	28,98% \pm 12,75%	25,66% \pm 11,66%
CD69 ^b	61,22% \pm 4,18%	60,32% \pm 17,76%
CD11c ^b	61,87% \pm 9,98%	57,91% \pm 16,40%
CD5 ^b	55,58% \pm 14,66%	52,46% \pm 14,39%

^a Die Frequenzen stammen von 6-20 Tieren aus ≥ 3 unabhängigen Experimenten \pm SD und sind bezogen auf alle lebenden CD3⁺ Zellen.

^b Prozentualer Anteil der durch die angegebenen Marker definierten Subpopulationen bezogen auf die jeweils übergeordnete Population (CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\gamma\delta$, CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$, CD8 $\alpha\beta$ TCR $\gamma\delta$ oder CD8 $\alpha\beta$ TCR $\alpha\beta$)

geschrieben ist, lagen die IEL in einem weitestgehend aktivierten Zustand vor (Wang et al., 2002). So trugen über 95% aller CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ und CD8 $\alpha\beta$ ⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ Zellen den Aktivierungsmarker CD69 auf ihrer Oberfläche. Bei den CD8 $\alpha\beta$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen waren es immerhin noch ca. 60%. Gleichzeitig prägen ca. 20% der CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ und 60% der CD8 $\alpha\beta$ ⁺ Zellen CD11c aus, ein Molekül, dass nach TCR-Aktivierung aufreguliert wird und auf T-Zellen der Milz und der peripheren Lymphknoten (pLN) nicht vorkommt (Huleatt und Lefrançois, 1995). Letztere sind alle positiv für das kostimulatorische Molekül CD5 (Alberola-Ila et al., 1992), das in den IEL nur auf etwa der Hälfte der CD8 $\alpha\beta$ ⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen vorkommt. Mäuse, denen CD5 fehlt, sind deutlich resistenter gegenüber der Entstehung von Colitis (Mizoguchi et al., 2003), so dass die niedrige CD5 Expression in IEL als Schutz gegenüber einer überschießenden Reaktion des Immunsystems in einem antigenreichen Milieu gewertet werden könnte. Der Aktivierungsstatus der IEL wurde durch TCDD aber ebenfalls nicht verändert (Tab. 3.1).

Wie in den Tabellen 3.2 und 3.3 zu sehen, führte die Fütterung von 10 μ g TCDD

pro kg KG nach drei und zehn Tagen ebenfalls zu keiner Änderung der Lymphozytenfrequenzen in der Lamina propria, den mesenterialen Lymphknoten oder den Peyer'schen Plaques. Auch die Expression von FoxP3 (als Marker für regulatorische T-Zellen), der Aktivierungsmarker CD69 (T-Zellen), CD25 (B-Zellen) und des Homing-Rezeptors CD103 blieb unverändert. In einem Pilotexperiment wurde ebenfalls kein Unterschied in der Expression von CD8 und des Aktivierungsmarkers CD80 auf dendritischen Zellen beobachtet. Hingegen fanden sich nach 10 Tagen TCDD etwa 15% mehr CD103⁺ DC in den MLN. Diese Population der dendritischen Zellen transportiert Antigene aus dem Darm in die MLN und beeinflusst dort die Differenzierung naiver T-Zellen und somit die Art der Immunantwort (Jaensson et al., 2008)

Tabelle 3.2: Frequenzen der Lymphozytenpopulationen der Lamina propria 10 Tage nach TCDD Fütterung (10µg/kg KG)^a

	DMSO	TCDD
CD4	20,15%± 7,90%	17,78%± 3,83%
FoxP3 ^b	11,31%± 0,44%	13,62%± 1,77%
CD8	4,25%± 1,87%	4,13%± 1,53%
CD19	26,73%±11,17%	32,26%±14,88%
DC ^c	3,89%± 1,40%	2,61%± 1,09%
CD103 ^b	44,78%± 6,35%	46,76%± 5,84%

^a Die Daten stammen von 6 Tieren aus 3 unabhängigen Experimenten ± SD.

^b Prozentualer Anteil der durch die angegebenen Marker definierten Subpopulationen bezogen auf die jeweils übergeordnete Population

^c DC wurden definiert als CD11c⁺MHCII⁺

3.3.4 Veränderung des Zytokinmilieus im GALT durch TCDD

Im Gegensatz zu den PP sind die MLN essentiell für die Entstehung von oraler Toleranz (Worbs et al., 2006). CD103⁺ DC aus der Lamina propria transportieren Antigen aus dem Darm in die MLN und sorgen dort unter nicht-inflammatorischen Bedingungen über die Sekretion von TGFβ und Retinsäure für die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (Treg) (Coombes et al., 2007). Die Ausschüttung von IL-6 durch diese DC hingegen begünstigt die Differenzierung von proinflammatorischen Th17 Zellen und hemmt die Entwicklung von Treg (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006) (eine Übersicht befindet sich in Abb. 1.5).

Um eine mögliche Ursache für die Durchbrechung der oralen Toleranz zu finden, wurde untersucht, ob TCDD die Zytokinproduktion verändert. Dazu wurden Mäuse wie in den vorherigen Versuchen mit 10µg TCDD bzw. DMSO in Olivenöl gefüttert

3.3. Effekte der Überaktivierung des AhR durch TCDD auf das GALT

Tabelle 3.3: Frequenzen der Zellpopulationen in MLN und PP 10 Tage nach Fütterung von 10µg TCDD pro kg KG^a

	MLN		PP	
	DMSO	TCDD	DMSO	TCDD
CD4	42,07%± 5,64%	40,85%± 7,81%	18,05%±6,67%	16,39%± 6,04%
CD69 ^b	15,84%± 2,71%	18,32%± 3,02%	50,26%±7,58%	53,17%± 6,38%
CD103 ^b	5,78%± 1,86%	7,15%± 2,96%	5,86%±2,62%	6,41%± 1,28%
FoxP3 ^b	11,54%± 3,71%	13,74%± 4,11%	15,92%±4,97%	17,03%±6,99%
CD8	29,30%± 4,46%	29,75%± 4,44%	6,49%±2,75%	5,67%± 1,88%
CD69 ^b	6,53%± 3,64%	6,78%± 2,69%	13,34%±4,51%	15,20%± 5,97%
CD103 ^b	77,90%± 3,35%	79,70%± 5,91%	76,94%±2,77%	79,67%±3,22%
CD19	21,64%± 6,13%	19,64%± 9,13%	64,43%±8,56%	67,91%± 8,05%
CD25 ^b	1,41%± 1,00%	1,54%± 0,72%	1,22%±0,67%	1,25%±0,56%
DC ^c	1,16%± 0,29%	1,07%± 0,29%	2,63%±1,35%	2,89%± 1,27%
CD103 ^b	^{***} 47,90%±4,20% ^d 46,70%± 9,40%	^{***} 61,20%±6,20% ^d 45,30%± 5,60%	37,09%±8,41%	33,76%± 7,87%

^a Die Daten stammen von 6-20 Mäusen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ± SD und sind bezogen auf anhand der Streuung identifizierte lebende Zellen

^b Prozentualer Anteil der durch die angegebenen Marker definierten Subpopulationen bezogen auf die jeweils übergeordnete Population (CD4, CD8, CD1 oder DC)

^c DC wurden definiert als CD11c⁺MHCII⁺

^d Anteil der CD103⁺ DC an allen DC 3 Tage nach TCDD Gabe

^{***} p<0,001 (Student t-Test)

und Toleranz durch die dreimalige Fütterung mit 20mg OVA ausgelöst. Drei Tage später wurden die Zellen der mesenterialen Lymphknoten und Peyer'schen Plaques entnommen, in Gegenwart von BrefeldinA mit Ionomycin und PMA aktiviert, die Zytokine intrazellulär angefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Nach Gabe von TCDD produzierten signifikant mehr DC in den MLN IL-6 (Abb. 3.9a). Entsprechend der Theorie, dass IL-5 die Differenzierung von Th17 Zellen fördert, fanden sich auch mehr IL17⁺ CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.9b), so dass davon ausgegangen werden kann, dass TCDD das Zytokinmilieu in den MLN in Richtung inflammatorische Th17 verschiebt und damit möglicherweise die Entstehung von spezifischen Treg behindert. Bei den für Th1 (IFN γ) und Treg-Zellen (IL-10) typischen Zytokinen bewirkte TCDD keine Änderung. In den für die Entstehung der OT nicht benötigten PP unterschied sich der Anteil IL-6 positiver DC und IL-17 produzierender T-Zellen nach TCDD-Gabe nicht von der Kontrollgruppe (Abb. 3.9c). In Abbildung 3.10 finden sich Beispiele der Streudiagramme der intrazellulären Färbungen. Mit DC wurden alle CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen bezeichnet. Die Grenze zwischen IL-6 negativen und IL-6 produzierenden DC wurde anhand der Isotypkontrolle bestimmt. Der Bereich, in dem 99,5% der Zellen der Isotypkontrolle lagen, wurde als IL-6 negativ gewertet. Zur besseren Veranschaulichung wurden die IL-6 gefärbten Zellen der DMSO

Kontrollen und der TCDD behandelten Mäuse in einem Histogramm (Abb. 3.10) übereinandergelegt. Bei den MLN (Abb. 3.10c) lässt sich im Gegensatz zu den PP (Abb. 3.10d) eine Verschiebung des Histogramms hin zu mehr IL-6 positiven Zellen bei den TCDD behandelten Tieren erkennen.

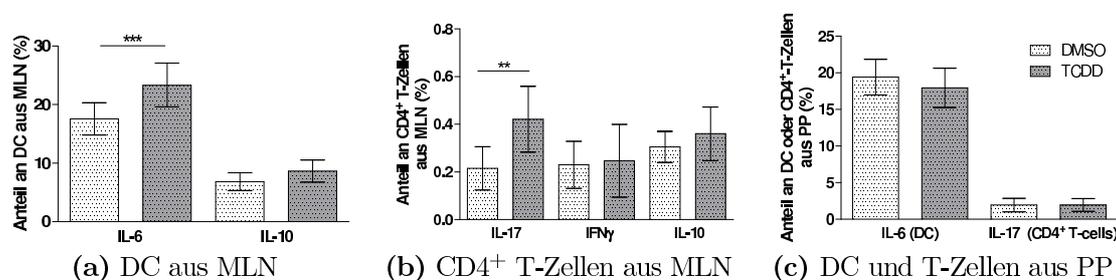


Abbildung 3.9: Prozentualer Anteil der zytokinproduzierenden DC und CD4⁺ T-Zellen in MLN (a)(b) und PP (c) \pm SD. DC wurden definiert als CD11c⁺ MHCII⁺. Die Daten der intrazellulären durchflusszytometrischen Färbung stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit zusammen 6-9 Tieren. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (Student t-Test)

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Sekretion von IL-6 mit einer Reduktion von Retinsäure einhergeht, wurden CD103⁺ DC mit einer Reinheit von ca. 90% aus den MLN von TCDD behandelten Mäusen durchflusszytometrisch sortiert und mittels RT-PCR auf die Expression des Gens *ald1a2* untersucht. *Ald1a2* kodiert das Enzym Retinaldehyde Dehydrogenase 2 (RALDH2), das die Umsetzung von Vitamin A zu Retinsäure katalysiert. Wie erwartet (Iwata et al., 2004) konnte in CD103⁺ DC eine starke *ald1a2* Expression nachgewiesen werden, die sich durch TCDD aber nicht veränderte (Abb. 3.11). Neben CD103⁺ DC prägen auch Stroma der MLN und Epithelzellen des Darms RALDH2 aus (Hammerschmidt et al., 2008; Lampen et al., 2000). Die Menge der in den MLN nachgewiesenen *ald1a2* mRNA wurde durch 10 μ g TCDD pro kg KG nicht beeinflusst. Im Vergleich mit den kompletten MLN fand sich CD103⁺ DC etwa 1000fach mehr *ald1a2* mRNA, so dass das Ergebnis der “nur” 90% reinen CD103⁺ DC durch Zellen der MLN nicht verfälscht wird. Vielmehr scheint ein Großteil der in den MLN nachgewiesenen *ald1a2* mRNA von den CD103⁺ DC zu stammen. Dünndarmepithelzellen wurden ebenfalls durchflusszytometrisch mit einer Reinheit von ca. 90% aus Mäusen sortiert, die drei Tage zuvor mit 10 μ g TCDD pro kg KG gefüttert wurden. Die Expression von *ald1a2* entsprach in etwa der in den MLN und lag somit deutlich unter der der CD103⁺ DC. Die Behandlung mit TCDD reduzierte in einem ersten Experiment die Menge an *ald1a2* mRNA aber um Faktor 10. Bislang wurden nur EC von 2 (TCDD) bzw. 3 (DMSO) Mäusen analysiert, so dass dieses Ergebnis noch verifiziert werden muss. Es liefert aber einen ersten Hinweis auf eine Modulation des Zytokinmiles im Darm in eine möglicherweise proinflammatorische Richtung.

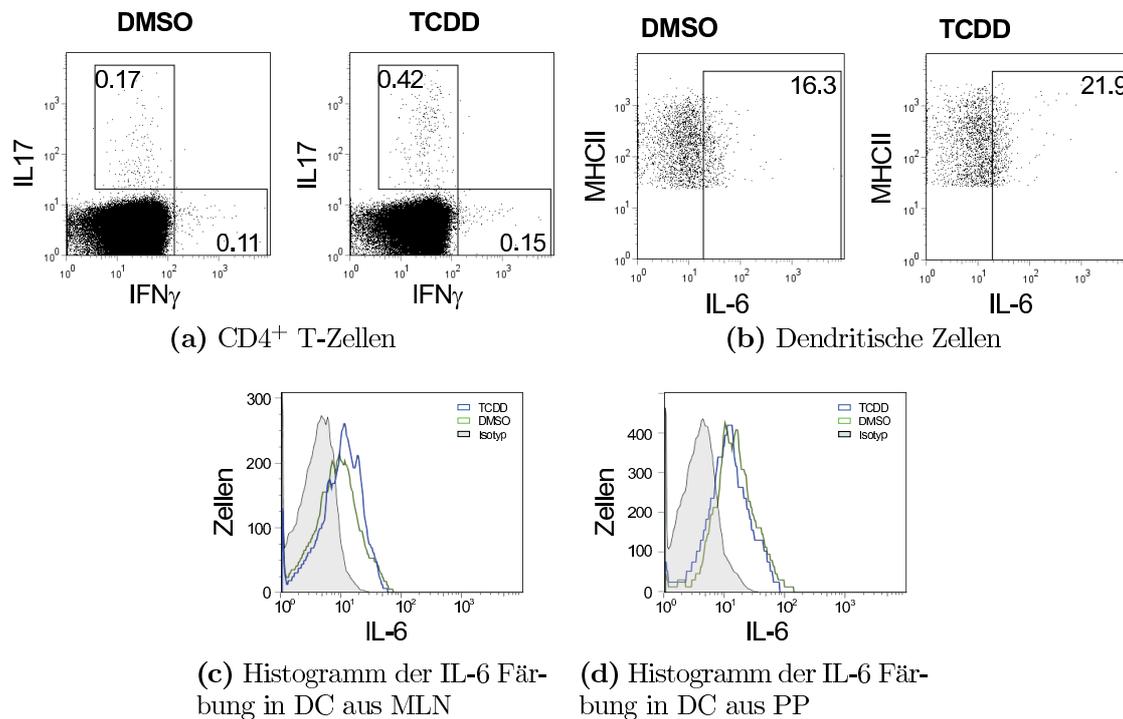


Abbildung 3.10: Beispiele für die intrazellulären Färbungen in MLN von IL-17 und IFN γ in CD4⁺ T-Zellen (a) und IL-6 in CD11c⁺ MHCII⁺ DC (b). Die Tiere wurden mit 10 μ g TCDD gefüttert und orale Toleranz, wie im Kapitel 2.2.15 beschrieben, durch dreimalige Fütterung von 20mg OVA ausgelöst. MLN und PP wurden drei Tage später entnommen und in Gegenwart von BrefeldinA mit Ionomycin und PMA für 5h zur Zytokinproduktion stimuliert. (c),(d) zeigen die übereinandergelegten Histogramme der IL-6 Färbung in DC und der zugehörigen Isotypkontrolle. Die DC stammen aus MLN (c) und PP (d)

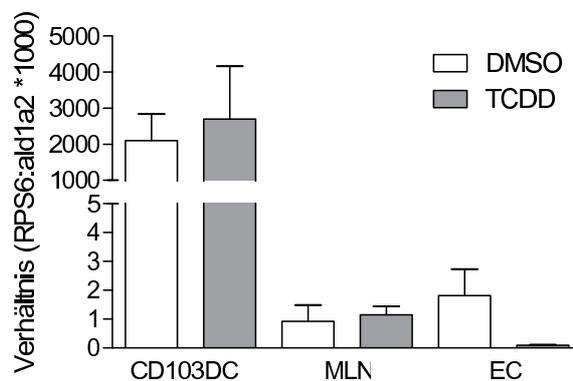


Abbildung 3.11: Expression von *ald1a2* in gereinigten CD103⁺ DC und EC \pm SD. Die Reinheit der EC und CD103⁺ DC betrug nach FACS-Sortierung annähernd 90%. Die Daten stammen von 2-3 Mäusen drei Tage nach Fütterung mit 10 μ g TCDD pro kg KG.

3.4 Veränderungen des GALT in AhR-KO Mäusen

3.4.1 Höhere Antikörpertiter im Blut von AhR-KO Mäusen

Im Vergleich von Wildtyp C57BL/6 (WT) mit AhR-KO Mäusen konnte bislang gezeigt werden, dass das Fehlen des AhR nicht zu schweren Immundefizienzen führt. Allerdings neigen die Tiere zu entzündlichen Darmerkrankungen und Hyperplasien, die möglicherweise auf Defizite bei der Immunregulation oder der Infektionsabwehr hinweisen (Fernandez-Salguero et al., 1997; Kawajiri et al., 2009). So können Th17 Zellen von AhR-KO Mäusen kein IL-22 produzieren, welches der Abwehr bakterieller Infektionen im Bereich der Epithelien dient (Veldhoen et al., 2008; Kimura et al., 2008). *In vitro* Stimulation von T-Zellen mit Concanavalin A oder Ovalbumin führt zu einer verstärkten Sekretion der Th1 Zytokine IFN γ und IL-12 ohne die Sekretion von Th2 Zytokinen zu verändern. Die adaptive humorale Immunantwort war aber nicht beeinträchtigt (Rodríguez-Sosa et al., 2005).

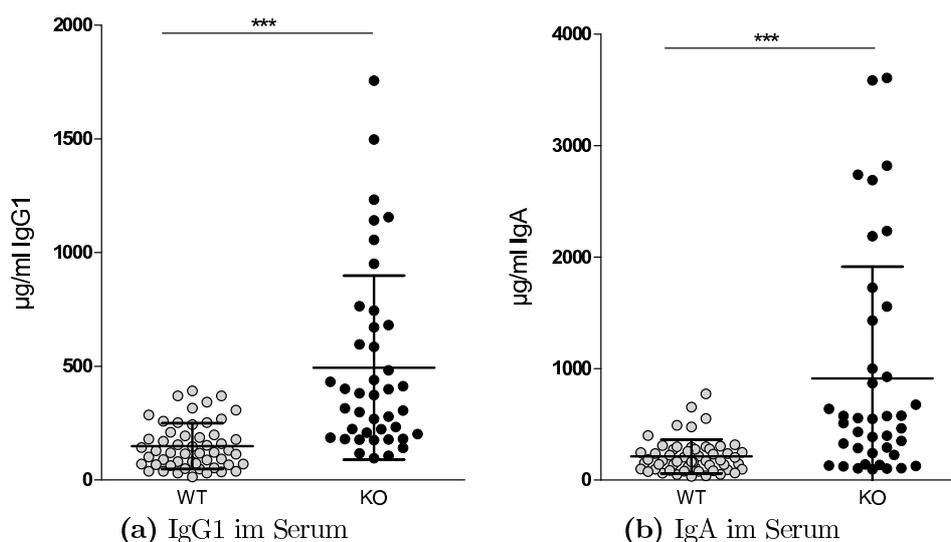


Abbildung 3.12: Antikörperkonzentration im Blut von gesunden, unbehandelten WT und AhR-KO Mäusen, gemessen mit ELISA \pm SD. Jeder Punkt entspricht einer Maus (3 unabhängige Experimente mit je 5-16 Tieren pro Gruppe). *** $p < 0,001$ (Student t-Test)

Wie in Kapitel 3.3.2 gezeigt, verhindert die Überaktivierung des AhR durch TCDD eine dauerhafte Etablierung von oraler Toleranz. Der AhR ist also in die Entstehung der OT involviert. Ob sich AhR Aktivierung nur negativ auswirkt oder ob der AhR für die Entstehung der oralen Toleranz sogar benötigt wird, wurde anhand von AhR-KO Mäusen untersucht.

Orale Toleranz wurde wie in den Versuchen mit TCDD durch dreimalige Fütterung

von 20mg OVA induziert und durch wiederholte Immunisierungen getestet (vgl. Schema in Abb. 2.5). Zu Beginn des Versuchs wurden die Konzentrationen von IgG1 und IgA Antikörpern in Serum- und Kotproben von noch unbehandelten WT und AhR-KO Mäusen im ELISA bestimmt und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Serumkonzentrationen beider Antikörperklassen in AhR-KO deutlich weiter streuen und signifikant über denen der WT Mäuse liegen. Dieser Unterschied konnte in drei Experimenten mit je 5-16 Mäusen pro Gruppe bestätigt werden. In Abb. 3.12 sind die gemessenen Titer für jede Maus aufgetragen. In den Faeces fand sich hingegen die gleiche Menge IgA in AhR-KO wie in WT Tieren (s. erster Zeitpunkt in Abb.3.13). Wie schon zuvor bei den TCDD-behandelten und Kontrolltieren veränderte sich die Gesamtmenge des in den Kot ausgeschütteten IgA nicht durch die im Verlauf des Versuchs durchgeführten Fütterungen und Immunisierungen mit OVA.

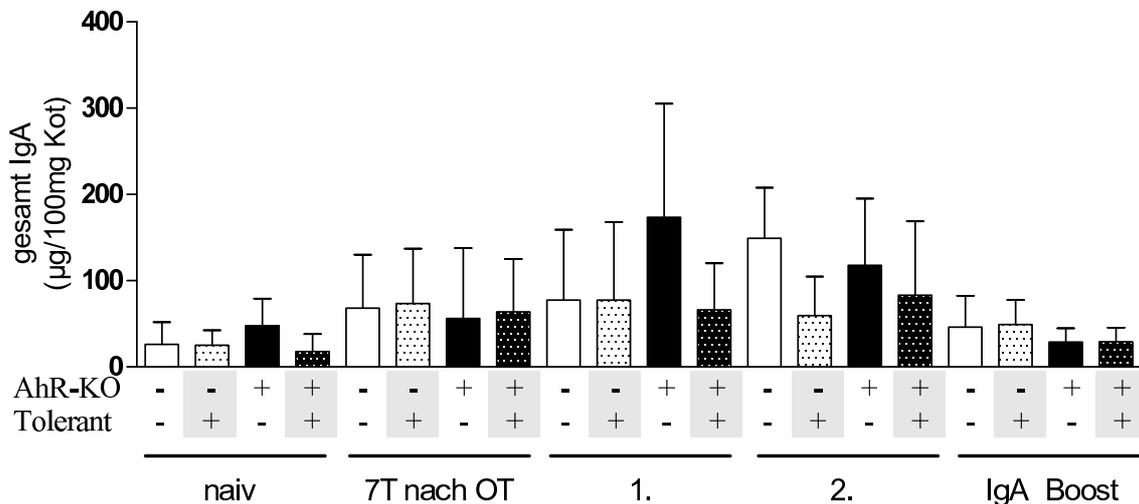


Abbildung 3.13: IgA Titer \pm SD im Kot von toleranten (gepunktete Balken) Kontrolltieren (weiße Balken) oder AhR-KO Mäusen (schwarze Balken) 7 Tage nach Induktion der OT, nach der 1. und 2. Immunisierung und nach erneuter Fütterung mit OVA zur Induktion der spezifischen Antikörperausschüttung in den Kot (IgA Boost). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt > 12 Mäusen pro Gruppe. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (ANOVA).

3.4.2 Geringe Ausschüttung von OVA-spezifischen AK in den Kot von AhR-KO Mäusen

Ob AhR-KO Mäuse orale Toleranz ausprägen, wurde zunächst anhand der Sekretion OVA-spezifischer IgA Antikörper in den Kot überprüft. Dazu wurden tolerante und zweimal immunisierte AhR-KO und WT Mäuse dreimal mit 1mg OVA gefüttert, um die Ausschüttung der Antikörper in den Darm zu stimulieren (vgl. Kap. 2.2.15).

Wie in Abbildung 3.14 gezeigt, ließ sich in den nicht-toleranten Kontrolltieren die Sekretion von spezifischen IgA Antikörpern in den Kot induzieren (Abb. 3.14). Bei den toleranten Kontrolltieren war dies erwartungsgemäß nicht der Fall. Dagegen konnten im Kot von AhR-KO Mäusen selbst in der nicht-toleranten Gruppe nur selten OVA-spezifischen Antikörpern gefunden werden, obwohl sich die Gesamt-IgA Menge zwischen AhR-KO und WT Mäusen nicht unterschied (Abb. 3.13). Lediglich bei vier von 21 Tieren aus drei Experimenten konnten geringe Mengen spezifischer IgAs detektiert werden. AhR-KO Mäuse können also IgA in ähnlichen Konzentrationen wie die WT-Mäuse produzieren, benötigen für eine spezifische Antwort aber entweder mehr Zeit oder einen stärkeren Stimulus.

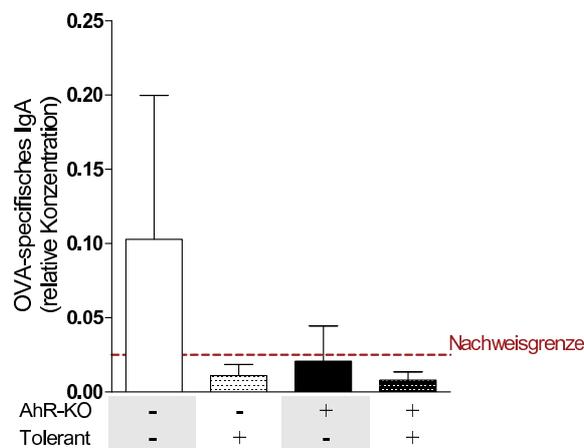


Abbildung 3.14: OVA spezifische IgA Titer \pm SD im Kot. In WT und AhR-KO Mäusen wurde durch Fütterung von 3x20mg OVA Toleranz induziert. Die Mäuse wurden anschließend gegen OVA immunisiert und mit 1mg OVA gefüttert, um die spezifische IgA Ausschüttung in den Kot zu stimulieren (s. 2.5). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt mehr als 15 Mäusen pro Gruppe.

3.4.3 AhR-KO Mäuse haben Defizite in der Entwicklung von OT

Wie bereits erwähnt, lässt sich die Etablierung von oraler Toleranz auch im Blut nachweisen. Nach Immunisierung steigt der Gesamt-IgG1 Titer im Blut toleranter Tiere nicht an, da keine spezifischen Antikörper produziert werden. Sowohl Gesamt-IgG1 als auch OVA-spezifisches IgG1 wurde im Blut von AhR-KO und WT Mäusen untersucht, die nach dem in Abb. 2.5 gezeigten Schema dreimal mit 20mg OVA zur Toleranzinduktion gefüttert und anschließend dreimal gegen OVA immunisiert wurden. Als Kontrolle für die Immunisierungen dienten nicht tolerante Tiere.

Wie bei den nicht-toleranten WT Mäusen stiegen die IgG1 Titer im Serum der nicht-toleranten AhR-KO Mäuse vor allem nach der ersten und zweiten Immunisierung

stark an (Abb.3.15). Da AhR-KO Mäuse bereits zu Beginn des Versuchs signifikant mehr IgG1 im Serum hatten (Abb.3.12a), wurde von allen folgenden Messwerten die Basalmenge an IgG1 subtrahiert, um die Änderung im Versuchsverlauf zwischen WT und AhR-KO Mäusen besser vergleichen zu können. In den nicht-toleranten Gruppen ist der durch die Immunisierung ausgelöste Anstieg des IgG1 Titers bei WT und AhR-KO identisch, so dass die Gesamtmenge in AhR-KO Mäusen im Verlauf des gesamten Experiments etwa gleich weit über den WT Mäusen lag (Abb. 3.15). Somit konnte bestätigt werden, dass die adaptive Immunantwort gegen OVA durch das Fehlen des AhR nicht beeinträchtigt wird (Rodríguez-Sosa et al., 2005). Anders als nach TCDD-Behandlung, die nach der dritten Immunisierung zu einem Anstieg des IgG1 Titers auf Kontrollniveau auch in den toleranten Tieren führte, bestand kein Unterschied zwischen den toleranten WT und AhR-KO Tieren.

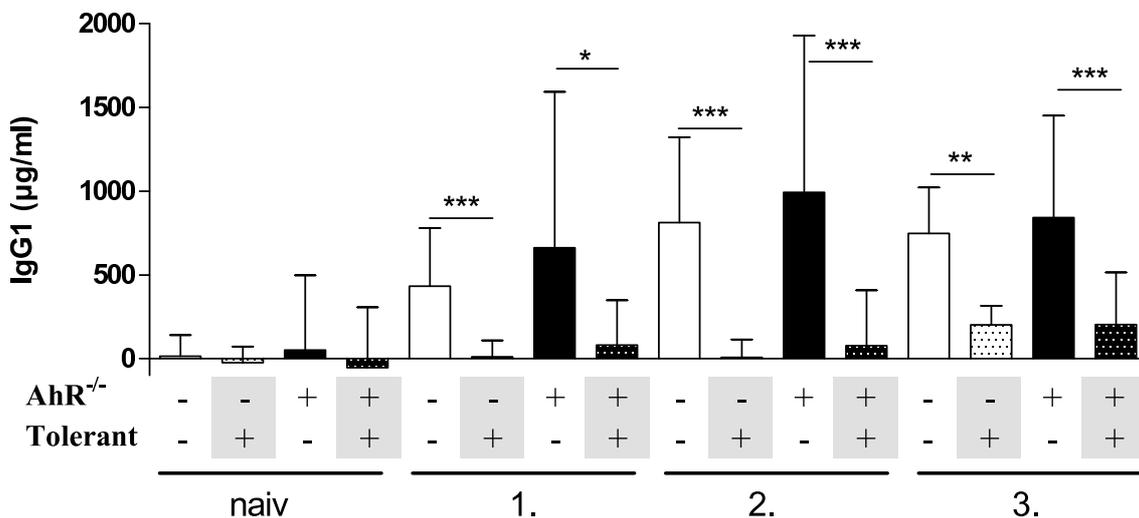


Abbildung 3.15: IgG1 Titer abzüglich der Konzentration am Tag 0 im Serum von WT (weiße Balken) oder AhR-KO Mäusen (schwarze Balken) \pm SD. Die Titer in toleranten (gepunktete Balken) und nicht toleranten Mäuse wurden nach 1., 2. und 3. Immunisierung bestimmt (vgl. 2.5). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt > 12 Mäusen pro Gruppe. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

Bei der Messung der OVA-spezifischen Antikörper im Blut zeigte sich, dass auch das Fehlen des AhR die Entstehung von OT behindert. Nach den ersten beiden Immunisierung haben bereits 9 der 20 Mäuse keine Toleranz ausgeprägt, nach der dritten Immunisierung ließen sich im Blut von 16 der 20 Tiere OVA spezifische Antikörper nachweisen (Abb. 3.16). Die Menge lag zwar deutlich unter der der nicht-toleranten Kontrollgruppen, entsprach aber in etwa der der Kontrolltiere nach der ersten Immunisierung und war vergleichbar mit dem Titer TCDD behandelte toleranter Mäuse (Abb. 3.5). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Überaktivierung

des AhR über TCDD als auch das Fehlen des AhR die dauerhafte Etablierung oraler Toleranz in ähnlichem Maße behindern. Da der Gendefekt in den AhR-KO Mäusen im Gegensatz zu der Gabe von TCDD bereits während der Entwicklung des Immunsystems zu Veränderungen und Defekten führt, ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten gleichen Effekte auf verschiedenen Ursachen beruhen.

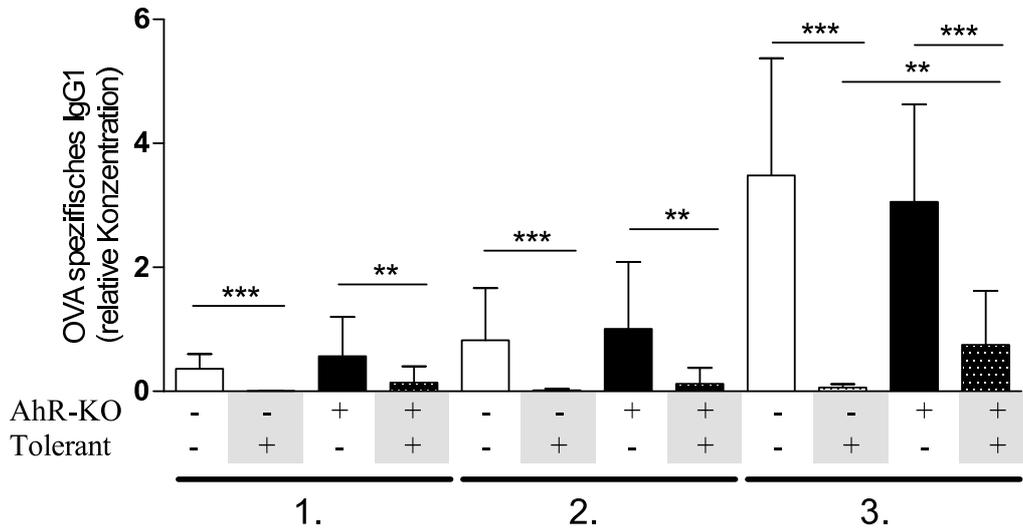


Abbildung 3.16: OVA spezifische IgG1 Titer im Serum \pm SD von toleranten (gepunktete Balken) WT (weiße Balken) oder AhR-KO Mäusen (schwarze Balken). $n > 12$ aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

3.4.4 Änderungen in der Zellzusammensetzung des GALT in AhR-KO Mäusen

Überaktivierung des AhR bewirkt in allen untersuchten Tierspezies Thymusathrophie und Immunsuppression (Vos et al., 1973; Holsapple et al., 1991; Chapman und Schiller, 1985). Fehlen des AhR führt in AhR-KO Mäusen zu einer verringerten Thymozytenzahl (Camacho et al., 2005) und verhindert die Entwicklung funktionaler Th17-Zellen (Veldhoen et al., 2008; Kimura et al., 2008). Damit scheint der AhR auch in der Lymphozytenentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen. Da das Immunsystem des Darms Antigene unserer Nahrung tolerieren und gleichzeitig schnell auf eindringende Erreger reagieren muss, benötigt es eine fein abgestimmte Zusammensetzung aus regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen. Ob das Fehlen des AhR die Lymphozytenzusammensetzung des GALT beeinflusst, wurde anhand von AhR-KO Mäusen betrachtet. Dazu wurden IEL und die Leukozyten der Lamina propria, MLN und PP durchflusszytometrisch auf die Merkmale von T-, B- und dendritischen Zellen untersucht.

Im Darmepithel von AhR-KO Mäusen kamen nur etwa halb so viele $CD8\alpha\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen vor wie bei WT Mäusen (Abb. 3.17). Diese vermutlich regulatorischen Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von oraler Toleranz (Ke et al., 1997) und unterstützen durch die Produktion von GM-CSF die Erneuerung und damit die Integrität des Epithels (Chen et al., 2002). Gleichzeitig verdoppelte sich der Anteil an $CD8\alpha\beta^+TCR\alpha\beta^+$ T-Zellen an den IEL von AhR-KO Mäusen (Abb. 3.17). Diese ähneln wahrscheinlich den zytotoxischen T-Zellen der Peripherie und übernehmen auch im Darm ähnliche Funktionen (Cheroutre und Madakamutil, 2004). Da die Anzahl der aus dem Epithel isolierten Zellen bei AhR-KO und WT Mäusen identisch war (vgl. Tab. 3.4), kann davon ausgegangen werden, dass auch zahlenmäßig - und nicht nur prozentual - weniger $CD8\alpha\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ Zellen im Epithel von AhR-KO Mäusen vorhanden sind, und diese durch $CD8\alpha\beta^+TCR\alpha\beta^+$ Zellen ersetzt werden. Dadurch könnte das Gleichgewicht im Darm aufgrund geringerer Regulation und Immunsuppression und der größeren Zahl zytotoxischer Zellen zu Gunsten einer Immunantwort verschoben werden. Bei den Aktivierungsmarkern CD69, CD5 und CD11c gab es keine Unterschiede zwischen WT und AhR-KO (nicht gezeigt).

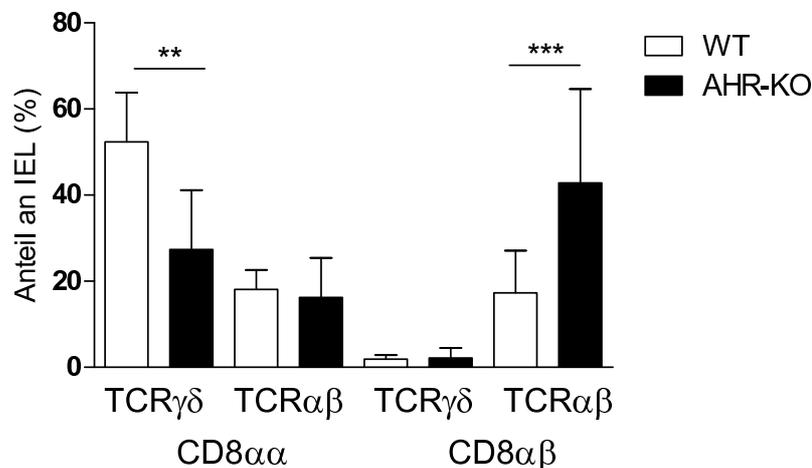


Abbildung 3.17: Frequenzen der Lymphozytenpopulationen des Epithels in WT und AhR-KO Mäusen \pm SD bezogen auf $CD3^+$ Zellen. $n=13$ aus 6 unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

Die Lymphozyten der PP, MLN und Lamina propria aus WT und AhR-KO Mäusen wurden wie im Methodenteil (Kap. 2.2.1-2.2.3) beschrieben isoliert. Es wurden die gleichen Immunzellpopulationen wie bei den TCDD behandelten Mäusen durchflusszytometrisch untersucht (s. Tabellen 3.2, 3.3). Die Zusammensetzung der PP

Tabelle 3.4: Anzahl der im Mittel \pm SD aus Dünndarm, MLN und PP isolierten Zellen.

	WT	AhR-KO
IEL	$2,2 \cdot 10^6 \pm 0,7 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6 \pm 0,8 \cdot 10^6$
LPL	$2,8 \cdot 10^6 \pm 0,9 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^6$
MLN	$10,0 \cdot 10^6 \pm 2,8 \cdot 10^6$	$10,7 \cdot 10^6 \pm 3,0 \cdot 10^6$
PP	$5,5 \cdot 10^6 \pm 2,2 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^6 \pm 2,5 \cdot 10^6$
pro PP ^a	$0,7 \cdot 10^6 \pm 0,4 \cdot 10^6$	$0,7 \cdot 10^6 \pm 0,4 \cdot 10^6$

^a “pro PP” bezeichnet die Zellzahl pro Peyer’schem Plaque. Die Anzahl an PP schwankte zwischen 2 und 11 pro Maus

aus T-, B- und dendritischen Zellen und die Ausprägung der Oberflächenmoleküle CD69, CD103 und CD25 war bei AhR-KO und WT Mäusen identisch. Ebenso gab es keine Unterschiede in Anzahl und Frequenz der T- und B-Zellen in den MLN und der Lamina propria. Allerdings veränderte das Fehlen des AhR die Expression von CD103 auf dendritischen Zellen der MLN und Lamina propria. Während der Anteil der CD103 exprimierenden DC, definiert als CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen, in den MLN von AhR-KO Mäusen signifikant niedriger war (Abb. 3.18a), lag der Anteil in der Lamina propria etwa 10% höher (Abb. 3.18b) als in WT-Mäusen. Auch bezogen auf alle lebenden Leukozyten der LPL (definiert wie in Abb. 3.8c) war die Frequenz der CD103⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen in AhR-KO Mäusen höher als in WT Mäusen, während sich der Anteil CD103⁻ Zellen nicht unterschied (Abb. 3.18c). Zwar lag der Prozentsatz aller CD11c⁺ MHCII⁺ bei einer Erhöhung um durchschnittlich 1,7% auf 3,9% nur tendenziell über dem der WT Mäuse (Abb. 3.18c), dennoch könnte man daraus schließen, dass die Lamina propria von AhR-KO Mäusen mehr CD103⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen enthält. Schulz et al. (2009) haben gezeigt, dass es sich bei den beobachteten CD103⁺ und CD103⁻ Zellen um zwei verschiedene Populationen handelt, von denen vermutlich nur die CD103⁺ zu den dendritischen Zellen gehören, während die CD103⁻ eher den Makrophagen ähneln. Des Weiteren sind nur die CD103⁺DC in der Lage, in die MLN zu wandern und Antigene aus dem Darm in die MLN zu transportieren (Schulz et al., 2009). Die beobachteten veränderten Frequenzen dieser Zellen in MLN und Lamina propria könnten demnach auf eine verminderte Migration zurückzuführen sein, welche den Transport und somit auch die Präsentation von Darmantigenen in den MLN und möglicherweise auch die Entstehung der OT beeinflussen könnte.

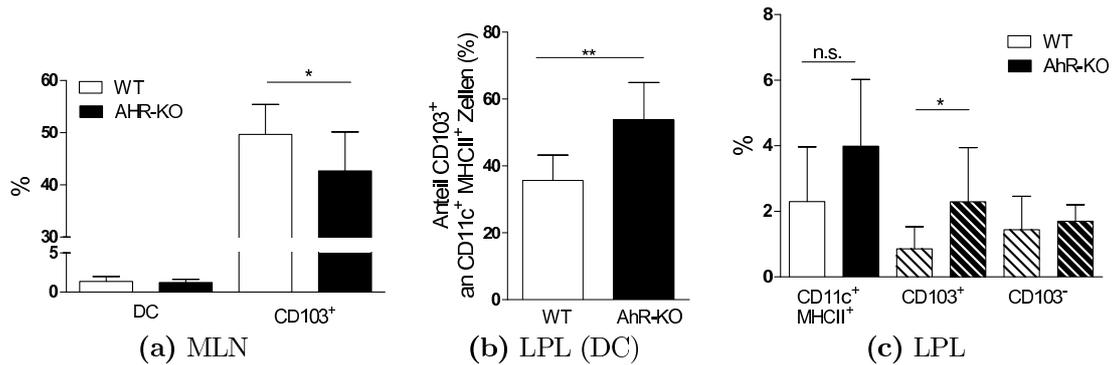


Abbildung 3.18: Frequenzen der DC und CD103⁺ DC in MLN und Lamina propria \pm SD. (a) Anteil DC (definiert als CD11c⁺MHCII⁺) in MLN bezogen auf alle lebenden Zellen und CD103⁺ DC bezogen auf alle DC. (b) Anteil CD103⁺ DC der Lamina propria an allen CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen (DC). (c) Anteil CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen (DC) bezogen auf lebende Zellen der Lamina propria (einfarbige Balken). Diese unterteilen sich in CD103⁺ und CD103⁻ DC (gestreifte Balken) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (Student t-Test)

3.4.5 Verringerte GM-CSF Sekretion im Darm von AhR-KO Mäusen

Durch eine defekte Epithelbarriere können Bakterien in den Darm eindringen und entzündliche Prozesse initiieren, die sich ebenfalls negativ auf die Etablierung von oraler Toleranz auswirken könnten (Garside et al., 1999). Neben KGF spielt auch GM-CSF eine wichtige Rolle bei der Heilung des Epithels und damit bei der Erhaltung der Barrierfunktion (Gennari et al., 1994). Hauptproduzenten von GM-CSF im Darm sind die CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ IEL (Abb. 3.19), die in AhR-KO Mäusen deutlich reduziert waren (Abb. 3.17). Deshalb wurden duodenale, jejunale und ileale Bereiche (s. Schema in Abb. 2.4) von Därmen aus AhR-KO und WT Mäusen für 6h in 1ml DMEM kultiviert und der Überstand im ELISA auf GM-CSF untersucht. Das Protokoll findet sich in Kapitel 2.2.13.

Duodenum und Ileum von AhR-KO Mäusen sezernierten die gleiche Menge GM-CSF wie die WT Mäuse (Abb. 3.20). Allerdings könnte dies auch daran gelegen haben, dass die von diesen Darmsegmenten abgegebene Menge im ELISA gerade noch detektierbar war. Unterschiede würden sich in diesem Bereiche nur schwer feststellen lassen. Des Weiteren sind die CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ T-Zellen nicht gleichmäßig über den Darm verteilt, sondern befinden sich vorwiegend im Duodenum und Jejunum. Im Ileum herrschen die CD8 α ⁺TCR α β ⁺ T-Zellen vor (Tamura et al., 2003). In den Überständen der Jejunumsproben von WT Mäusen befand sich hingegen deutlich mehr GM-CSF. Da auch Epithelzellen GM-CSF produzieren, bleibt zu klären, ob diese Differenz allein durch die verringerte Zahl von CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ Zellen zu-

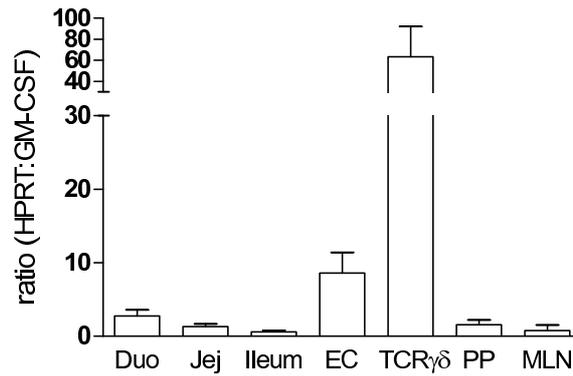


Abbildung 3.19: GM-CSF mRNA in verschiedenen Zellen und Geweben des GALT. Verwendet wurden Proben aus WT-Mäusen zur Identifikation der Hauptproduzenten für GM-CSF. EC und CD8 α^+ TCR $\gamma\delta^+$ IEL wurden durchflusszytometrisch sortiert (Reinheit $\geq 90\%$) und die RNA wie im Kapitel 2.2.10 beschrieben isoliert. Duo: Duodenum, Jej: Jejunum, n=2-8

stande kam.

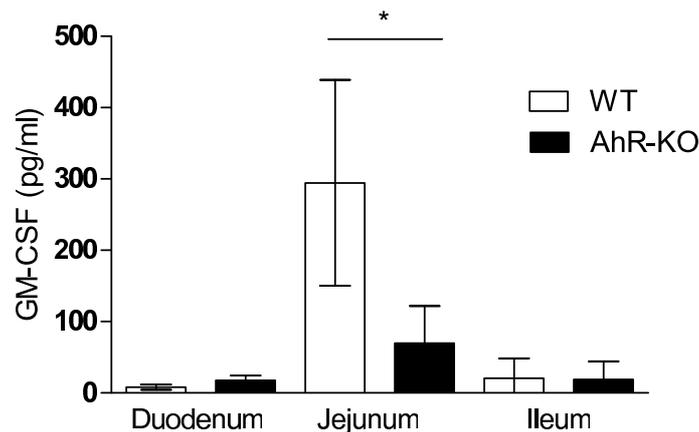


Abbildung 3.20: GM-CSF Konzentration \pm SD im Kulturüberstand. Darmstücke von WT (weiße Balken) und AhR-KO Mäusen (schwarze Balken) wurde für 6h in DMEM bei 5% CO₂ kultiviert. n=3 für Duodenum, n=6 für Jejunum und Ileum (2 Experimente) * $p = 0,017$ (Student t-Test)

3.4.6 Zellen der MLN aus AhR-KO Mäusen proliferieren schneller

Als einleitender Funktionstest für T-Zellen wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten von AhR-KO und WT Mäusen mit 10 μ g/ml ConA stimuliert, und die Proliferation über CFSE beobachtet. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE lagert sich in die Zellmembran ein, so dass bei jeder Zellteilung die Hälfte an jede Tochterzelle weitergegeben wird und sich somit auch die Fluoreszenzinten-

3.4. Veränderungen des GALT in AhR-KO Mäusen

sität mit jeder Zellteilung halbiert. Eine Beispielfärbung ist in der Abbildung 3.21 dargestellt. Abbildung 3.22 zeigt die Frequenzen der Zellen, die sich nach 3,5 Tagen nicht bis maximal 4mal geteilt haben. Sowohl bei den CD4⁺ (Abb. 3.22a) als auch bei den CD8⁺ (Abb. 3.22b) T-Zellen gab es bei den Ansätzen mit Zellen aus AhR-KO Mäusen weniger ungeteilte Zellen und dafür mehr Zellen, die sich bereits 1mal (CD4) oder sogar 3-4mal geteilt hatten (CD8). Insbesondere zytotoxische T-Zellen aus AhR-KO Mäusen scheinen also auf Kreuzvernetzung des TCR mit CD3 schneller oder stärker zu reagieren als T-Zellen aus WT Mäusen.

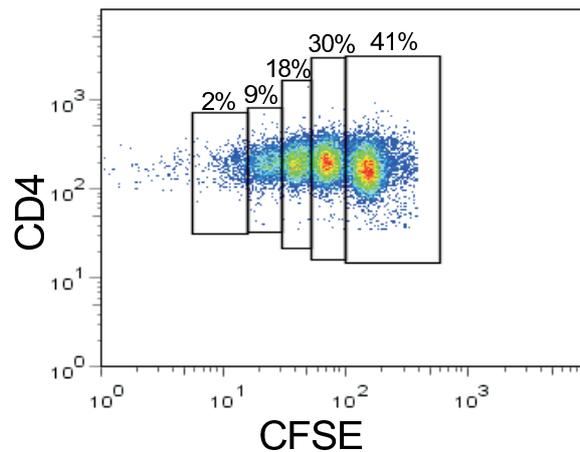


Abbildung 3.21: Beispiel einer CFSE Färbung von CD4⁺ T-Zellen nach 3,5 Tagen Stimulation mit ConA. Der Rahmen mit der höchsten CFSE Fluoreszenz entspricht dabei den ungeteilten Zellen. Die Zahlen geben den Anteil der jeweiligen Teilung an allen Zellen an.

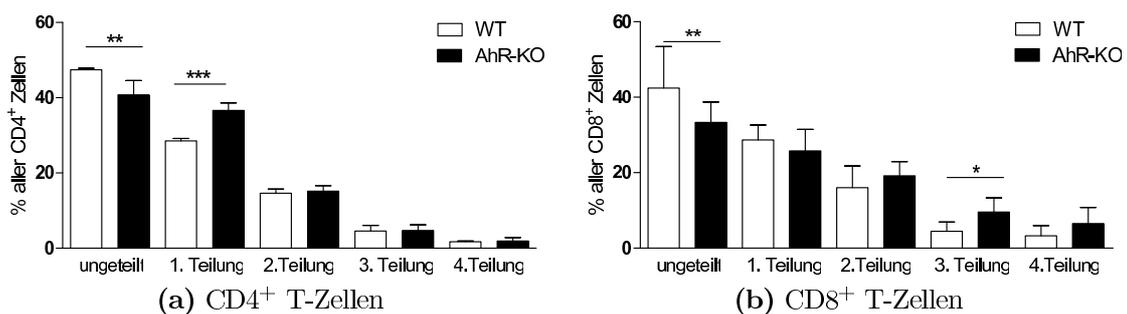


Abbildung 3.22: Anteil der 0-4 mal geteilten CD4⁺ (a) oder CD8⁺ (b) Zellen an der jeweiligen T-Zell-Population \pm SD. Die Zellen wurden mit CFSE markiert und 3,5 Tage mit ConA stimuliert. Die Anzahl der Teilungen wurde am FACS anhand der CFSE-Intensität bestimmt. n=4 (CD4⁺), n> 7 (CD8⁺) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA)

4 Diskussion

4.1 Überaktivierung mit TCDD

Trotz deutlicher Reduktion der Emissionen liegt die Exposition mit PCDDs und PCDFs, insbesondere mit ihrem giftigsten Vertreter 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD), immer noch im Bereich der von der Weltgesundheitsorganisation empfohlenen Maximalmenge von 1-4pg/kg KG und Tag (WHO, 1998). TCDD gehört zu den schwer abbaubaren, bioakkumulativen und lipophilen Umweltgiften und reichert sich in tierischem Fettgewebe an. Dadurch ist unsere Nahrung die Hauptexpositionsquelle für TCDD. Davis und Safe (1988) zeigten, dass die Immunantwort in Mäusen gegen Schafserythrozyten bereits ab einer Dosis von 0,7µg/kg KG beeinträchtigt war. Damit ist das Immunsystem ein empfindliches Ziel einer TCDD induzierten Überaktivierung des AhR. Bisherige Studien konzentrieren sich auf die toxischen Wirkungen auf das periphere Immunsystem wie humorale und zellvermittelte Immunsuppression, Thymusatrophie und Veränderungen der Zytokinmilieus (Vos et al., 1973; Holsapple et al., 1991; Chapman und Schiller, 1985; Ito et al., 2002). Im Gegensatz zum peripheren Immunsystem muss das darmassoziierte Immunsystem nicht nur in der Lage sein, Infektionen effizient abzuwehren, sondern es muss auch harmlose Antigene der Nahrung tolerieren. Da im Darm außerdem 90% der Aufnahme von TCDD stattfindet (den Berg et al., 1994), wurde untersucht, ob die orale Gabe von TCDD die Immunantwort und die Entstehung von oraler Toleranz im Darm beeinflusst.

4.1.1 Keine Unterdrückung der sekundären Immunantwort durch TCDD

Um den Einfluss von TCDD auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurden zunächst einmalig mit TCDD behandelte Mäuse bis zu dreimal gegen das Protein OVA immunisiert und die resultierende IgG1 Antwort im Serum untersucht. Wie erwartet reduzierte die orale Gabe von 10µg TCDD pro kg KG die spezifische

Immunantwort gegen OVA. Ich konnte erstmals zeigen, dass dieser Effekt durch eine zweite Immunisierung wieder aufgehoben wird. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die fehlende Immunsuppression nach der zweiten Immunisierung auf eine zu geringe TCDD Belastung zurückzuführen ist. Trotz der kurzen Halbwertszeit von 11 Tagen für TCDD in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu 7 Jahren beim Menschen (den Berg et al., 1994) lag die berechnete Restmenge an TCDD zum Zeitpunkt der zweiten Immunisierung immer noch bei $1,9\mu\text{g}$ pro kg KG. Immunsuppressive Wirkungen wurden hingegen bereits für Konzentrationen ab $0,7\mu\text{g}$ pro kg KG beschrieben (Davis und Safe, 1988; Kerkvliet und Brauner, 1990). Dennoch wird in meiner Arbeitsgruppe zur Zeit ein Experiment mit einer TCDD Erhaltungsdosis bis zur zweiten Immunisierung durchgeführt. Eine realistischere Erklärung für die Aufhebung der TCDD induzierten Immunsuppression durch eine zweite Immunisierung ergibt sich aus den Unterschieden bei der primären und sekundären Immunantwort. Nach der ersten Immunisierung erfolgt die Primärantwort, bei der naive B-Zellen aktiviert werden, die nach Wechsel der Antikörperklasse zu Plasmazellen und Gedächtniszellen differenzieren. Der Klassenwechsel von IgM zum Beispiel zu IgG1 benötigt etwa 5-7 Tage nach Immunisierung. Hingegen werden bei erneutem Antigenkontakt im Zuge der sekundären Immunantwort vorrangig die während der Primärantwort generierten Gedächtniszellen aktiviert. Dadurch lassen sich bereits nach 1-3 Tagen deutlich höhere IgG1 Titer messen als bei der Primärantwort. In dem von mir durchgeführten Versuch habe ich die Serumproben drei Tage nach der zweiten Immunisierung genommen. Diese Zeitspanne wäre für die Aktivierung naiver B-Zellen zu klein. Da sich im Blut von TCDD behandelten Tieren zu diesem Zeitpunkt die gleiche IgG1-Konzentration messen ließ, muss es sich auch bei diesen Tieren um eine sekundäre Immunantwort gehandelt haben. Es stellte sich also die Frage, welche Faktoren während der Primärantwort durch TCDD beeinflusst werden, die für die Sekundärantwort nicht mehr benötigt werden. Kürzlich wurde beschrieben, dass die immunsuppressive Wirkung von TCDD auf B-Zellen auf eine verringerte Ausschüttung der Th2 Zytokinen Il-4, Il-5 und Il-2 von CD4^+ T-Zellen zurückzuführen sein könnte (Shepherd et al., 2000; Nohara et al., 2002). Bei dem Vergleich von primärer und sekundärer Immunantwort konnten Duffy et al. (2006) zeigen, dass nur die Stimulation naiver B-Zellen Il-2 abhängig ist, wohingegen die Aktivierung von B-Gedächtniszellen auch in IL2-KO Mäusen funktionierte. Eine verringerte IL-2 Sekretion durch TCDD würde demnach zunächst weniger naive B-Zellen stimulieren. Die entstehenden Gedächtniszellen könnten nach der zweiten Immunisierung ähnlich den Zellen der unbelasteten Mäuse zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper sekretieren. Die Vermutung, dass nach TCDD Behandlung

weniger Gedächtniszellen gebildet werden, ist wahrscheinlich aufgrund der starken Proliferation dieser Zellen während der sekundären Immunantwort von untergeordneter Bedeutung. Die Beobachtung der fehlenden Immunsuppression nach wiederholtem Antigenkontakt könnte auch die gegensätzlichen Beobachtungen bezüglich der Immunsuppression und Antikörpertiter in TCDD belasteten Menschen erklären (Neubert et al., 1991; Reggiani, 1978; Lang et al., 1994).

4.1.2 Beeinflussung der OT durch TCDD

Die in unseren Versuchen verwendete Dosis von $10\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG entspricht etwa 10% der LD_{50} in C57BL/6 Mäusen. Bereits geringere Dosen von $0,7\mu\text{g}$ und $5\mu\text{g}$ pro kg KG bewirken Immunsuppression und Thymusatrophie (Davis und Safe, 1988; Weber et al., 1985), $10\mu\text{g}$ TCDD pro kg KG führen aber noch nicht zu Auszehrung (Vos et al., 1973, eigene Beobachtung). Wie in dieser Arbeit gezeigt, führte die verwendete Dosis weder zu einer Veränderung der Gesamtzellzahl noch der T- und B-Zellfrequenzen in Epithel, Lamina propria, MLN oder PP, so dass eine unspezifische zytotoxische Wirkung im GALT als Ursache für die Aufhebung der oralen Toleranz ausgeschlossen werden kann. Allerdings stieg die Frequenz der CD103^+ DC in den MLN nach TCDD-Gabe, was auf eine verstärkte Migration aus der Lamina propria schließen lässt. Gleichzeitig könnte dies als erster Hinweis auf einen proinflammatorischen Prozess gewertet werden, da eine beschleunigte Migration auch durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren erreicht werden kann (Schulz et al., 2009).

Orale Toleranz richtet sich spezifisch gegen einzelne Antigene und verhindert systemisch auch nach Immunisierung jegliche Immunantworten gegen diese Antigene. Für die Etablierung von oraler Toleranz muss zunächst Antigen aus dem Darm aufgenommen und in die mesenterialen Lymphknoten transportiert werden (Worbs et al., 2006). Dieser Transport wird von den in der Lamina propria ansässigen CD103^+ DC übernommen (Schulz et al., 2009), die unter physiologischen Bedingungen über Retinsäure und $\text{TGF}\beta$ effizient die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen stimulieren (Coombes et al., 2007; Jaensson et al., 2008). Unter inflammatorischen Bedingungen sind diese Zellen aber auch in der Lage, eine adaptive Immunantwort auszulösen (Johansson-Lindbom et al., 2005); sie bilden somit ein sehr wichtiges Glied bei der Entscheidung zwischen Toleranz und Immunantwort.

Kinoshita et al. (2006) konnten zeigen, dass bereits eine Dosis von $1\mu\text{g}$ pro kg KG

TCDD nach zweimaliger Immunisierung mit 100 μ g OVA in CFA eine orale Toleranz aufhebt. In unseren Experimenten mit einer Dosis von 10 μ g TCDD waren drei OVA Immunisierungen - allerdings nur die erste in CFA - erforderlich, bis bei allen toleranten, TCDD behandelten Mäusen OVA-spezifische Antikörper im Serum nachgewiesen werden konnten. Die gewonnenen Daten nach den ersten Immunisierungen lassen zudem darauf schließen, dass TCDD weniger die Entstehung von oraler Toleranz komplett blockiert, sondern, vielleicht durch Konkurrenz mit den vorhandenen tolerogenen Mechanismen, die dauerhafte Etablierung verhindert. Ausserdem ließ sich die fehlende Toleranz anhand der Sekretion OVA spezifischer Antikörper in den Darm bestätigen. Anders als bei Kinoshita et al. (2006) konnten wir keine Verringerung der Gesamtmenge an IgA im Darm feststellen, was möglicherweise an den späteren Messzeitpunkten liegt.

4.1.3 Verschiebung des Treg/Th17 Gleichgewichts

Ein zentraler Punkt in der Entstehung oraler Toleranz ist die Entwicklung antigenspezifischer Treg, die in den Darm und die Strukturen des peripheren Immunsystems einwandern und dort z.B. über die Sekretion von IL-10 und TGF β die Immunantwort zu unterdrücken (Tsuji et al., 2003). Im Gegensatz zu den PP werden die MLN für die Entstehung der OT unbedingt benötigt (Worbs et al., 2006). Die Differenzierung von Treg und Th17 Zellen inhibiert sich gegenseitig. Während Retinsäure und TGF β zur Entstehung von Treg führen, wird dieser Prozess durch IL-6 inhibiert, welches, ebenfalls im Zusammenspiel mit TGF β , die Differenzierung von Th17 Zellen stimuliert (von Boehmer, 2007). Dabei behindert Retinsäure sowohl die Ausschüttung als auch die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen, während IL-6 die Expression des Retinsäurerezeptors (RAR α) unterdrückt und somit als Gegenspieler agieren kann (Nolting et al., 2009). Nach Fütterung von TCDD und Induktion oraler Toleranz konnten wir in den MLN vermehrt IL-6 produzierende DC nachweisen. Entsprechend der Annahme, dass IL-6 die Differenzierung von Th17 Zellen fördert, fanden wir ebenfalls eine höhere Frequenz IL-17 positiver CD4⁺ T-Zellen. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass vor allem Th17 Zellen und zu einem deutlich geringeren Teil auch Treg Zellen den AhR exprimieren (Veldhoen et al., 2008). Behandlung naiver CD4⁺ T-Zellen *in vitro* mit FICZ (6-Formylindolo[3,2-b]karbazol), einem hochaffinen aber kurzlebigen AhR-Liganden, verstärkte die Differenzierung von Th17 Zellen und verschlimmerte die Symptome von EAE (experimentelle Autoimmunenzephalitis) (Veldhoen et al., 2008). 50 μ g pro kg KG TCDD förderten hingegen die Differenzierung von Treg und linderten die Symptome von EAE (Quin-

tana et al., 2008). Da in dieser Studie nur die prozentuale Erhöhung von Treg in den Lymphknoten untersucht wurden, können bei einer Dosis, die der Hälfte der LD₅₀ entspricht, toxische Effekt auf andere, insbesondere AhR⁺ Zellpopulationen, wie Th17 Zellen, nicht ausgeschlossen werden. Falls z.B. Th17 Zellen selektiv durch TCDD getötet würden, käme es nur scheinbar zu einer Vermehrung von Treg. Auch die *in vitro* Differenzierung naiver T-Zellen liefert dosisabhängig widersprüchliche Ergebnisse. Kimura et al. (2008) konnten naive T-Zellen mit der hohen Dosis von 160nM TCDD und Zugabe von TGF β , welches auch allein die Treg Entwicklung auslöst, vermehrt zu Treg differenzieren. Dagegen weisen erste Daten von Marshall und Kerkvliet (2010) mit 20nM auf eine Reduzierung der Treg hin. In Kombination mit der Beobachtung, dass in AhR-KO Mäusen die Funktion von Th17 Zellen, nicht aber die von Treg beeinträchtigt, scheint der AhR zwar eine wichtige Rolle in der Th17 Differenzierung zu spielen, aber maximal eine untergeordnete Bedeutung in der Treg Entwicklung zu haben. Hingegen gibt es andere Ergebnisse, nach denen die immunsuppressive Wirkung von TCDD nicht auf einer direkten Beeinflussung von T-Zellen beruht. DC produzieren nach TCDD Exposition vermehrt Indolamine 2,3-dioxygenase (IDO), welches Treg Zellen aktiviert und somit die Unterdrückung der Immunantwort bewirken könnte (Puccetti und Grohmann, 2007; Vogel et al., 2008). TCDD scheint hauptsächlich auf die AhR exprimierenden Th17 Zellen direkt zu wirken. Immunsuppression und Effekte auf andere T-Zellen werden dagegen vermutlich indirekt über z.B. DC vermittelt.

4.1.4 Möglichkeiten der Beeinflussung dendritischer Zellen durch TCDD

Voraussetzung für eine Wirkung von TCDD auf dendritische Zellen ist die funktionelle Ausprägung des AhR. Zwar konnten wir in den CD103⁺ DC des Darms AhR nachweisen, gleichzeitig fanden wir in diesen Zellen aber auch eine hohe Expression des AhR Repressors. Überraschenderweise ließ sich das AhR-Zielgens *cyp1a1* durch TCDD in CD103⁺ DC nicht induzieren. Dies lässt darauf schließen, dass der "klassische" Weg der AhR Aktivierung durch den AhRR blockiert sein könnte. Klassisch beschreibt in diesem Zusammenhang Bindung des AhR an ARNT und die daraus resultierende Genexpression (s. Abb 1.2). Keine *cyp1a1* Induktion bei gleichzeitiger hoher AhRR Expression wurde in unserer Arbeitsgruppe auch für Langerhanszellen gezeigt, spezialisierten DC der Haut (Jux et al., 2009).

Neben ARNT kann der AhR auch mit RelA und RelB des Nf κ B Signalwegs interagie-

ren (alternativer Signalweg, Abb. 1.2). Dabei scheint der klassische, RelA vermittelte Weg gehemmt zu werden, wohingegen die Dimerisierung mit RelB zur Induktion der Genexpression führt (Ruby et al., 2002; Marshall und Kerkvliet, 2010; Vogel et al., 2007). Somit könnte die Synthese von GM-CSF, einem Zielgen des RelA Signalwegs durch TCDD gehemmt werden. Zumindest für DC konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens *ald1a2* durch GM-CSF induziert wird (Yokota et al., 2009). *Ald1a2* kodiert für das Enzym Retinaldehyde Dehydrogenase 2 (RALDH2), eines der Enzyme, die Vitamin A in Retinsäure umwandeln. Im Gegensatz zu anderen lymphatischen Geweben spielt das Vorhandensein von Retinsäure im Darm eine essentielle Rolle bei der Treg Differenzierung und damit bei der Entstehung von oraler Toleranz. Neben DC exprimieren auch EC *ald1a2*. Es bleibt also zu klären, ob die beobachteten Veränderungen der Zytokinexpression durch direkte Effekte auf DC oder indirekt über die EC, Zellen mit hoher AhR- und Cyp1a1-Expression, verursacht werden. Mittels RT-PCR konnten wir in gereinigten CD103⁺ DC keine Verringerung der *ald1a2* Expression feststellen. Dies könnte aber auch daran gelegen haben, dass diese Zellen aus den MLN isoliert wurden. So könnte nur der nach TCDD Behandlung aus dem Darm eingewanderte Teil betroffen gewesen sein. Es mehren sich aber Hinweise darauf, dass dem Darmepithel eine wichtige Rolle bei der Entscheidung zukommt, ob die CD103⁺ DC tolerogen oder inflammatorisch wirken (Shale und Ghosh, 2009). Nach TCDD ließ sich in den EC eine signifikante Reduktion der *ald1a2* Expression beobachten. In einem Pilotexperiment konnten wir auf mRNA Ebene zeigen, dass TCDD die Expression von IL-10 in EC und von GM-CSF in CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ Zellen verringerte (Abb. 4.1). Sowohl *ald1a2* als auch IL-10 scheinen neben TGF β und TSLP (*thymic stroma lymphopoetin*) für die Regulation von Immunantworten im Darm bedeutsam zu sein (Shale und Ghosh, 2009). Ob dabei von den EC produzierte Retinsäure eine Bedeutung bei der Programmierung der DC und somit der Differenzierung von Treg spielt oder nur bei der Kontrolle der Immunantwort im Darm selbst, ist bislang nicht bekannt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass TCDD vermutlich über Veränderungen des Zytokinmilieus im Darm die Etablierung von oraler Toleranz verhindert. Dies wirft vor allem vor dem Hintergrund von hochkonzentrierten Nahrungsergänzungsmitteln die Frage auf, ob auch verstoffwechselbare AhR Liganden wie Quercetin die orale Toleranz beeinträchtigen und somit zur Entstehung von Nahrungsmittelunverträglichkeiten beitragen könnten. Über frei verkäufliche Nahrungsergänzungsmittel lassen sich ernährungstypische Dosen um mehr als das 1000x überschreiten. Dadurch könnten besonders im Darmepithel trotz der Metabolisie-

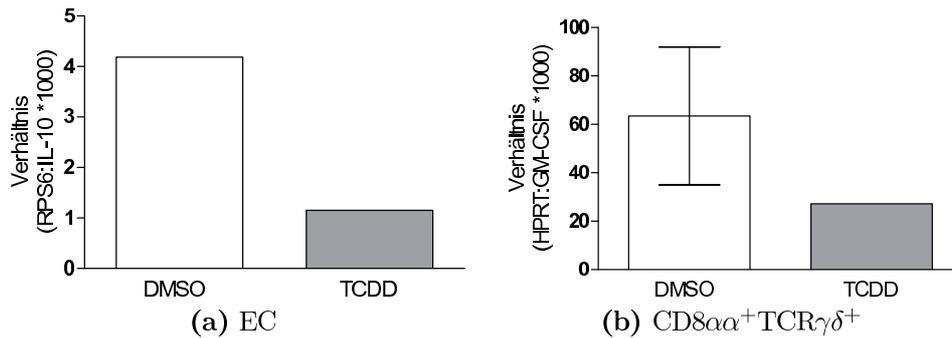


Abbildung 4.1: mRNA Expression von (a) IL10 in Darmepithelzellen und (b) GM-CSF in CD8αα⁺TCRγδ⁺ T-Zellen drei Tage nach Fütterung mit 10μg TCDD pro kg KG. n=1-2, Reinheit der sortierten Zellen > 90%

nung Konzentrationen erreicht werden, die TCDD ähnliche Wirkungen entfalten. Interessant wäre auch die Beantwortung der Frage, ob eine bereits bestehende Toleranz durch AhR Liganden wieder aufgehoben werden kann. Zur Klärung laufen in unserer Arbeitsgruppe bereits erste Experimente.

4.2 AhR-Defizienz

Die Durchbrechung der oralen Toleranz nach TCDD Gabe läßt auf eine zentrale Rolle des AhR bei der Regulierung der Zytokinhomöostase im GALT schließen. Um die physiologische Funktion des AhR besser untersuchen zu können, wurden im zweiten Teil dieser Doktorarbeit AhR-KO Mäuse verwendet. Im Gegensatz zur Behandlung mit TCDD, die erst im adulten Tier erfolgte, wirkte sich das Fehlen des AhR bereits während der Entwicklung aus. Microarray Analysen haben gezeigt, dass der AhR sowohl die Genexpression fördern, als auch Unterdrücken kann (Frericks et al., 2007). Beide Funktionen fehlen in AhR-KO Mäusen, die zahlreiche phänotypische Veränderungen aufweisen. Insbesondere an Herz, Leber und Darm zeigen sie Gefäßveränderungen und Hyperplasien (Fernandez-Salguero et al., 1997), die zu einer erhöhten Tumorzinzidenz beitragen (Kawajiri et al., 2009). Veränderungen im Immunsystem äußern sich in der Neigung zu chronischen Entzündungen und der Unfähigkeit zur Differenzierung von Th17 Zellen (Kimura et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Somit eignet sich das Modell der AhR-KO Mäuse gut zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung des AhR. Es unterscheidet sich aber grundlegend von der TCDD induzierten Überaktivierung. Anhand der AhR-KO Mäuse bin ich den Fragen nachgegangen, wie sich erstens das Fehlen des AhR auf die OVA spezifische Immunantwort in Blut und Kot auswirkt und zweitens, ob

der AhR die Zusammensetzung der Immunzellen im GALT verändert und für Etablierung der oralen Toleranz benötigt wird.

4.2.1 Untersuchung der IgG1 und IgA Immunantwort in AhR-KO Mäusen

Für die Untersuchung der spezifischen IgG1 Antwort wurden AhR-KO und WT-Mäuse dreimal mit OVA immunisiert. Um OVA spezifisches IgA im Darm messen zu können, wurden die Mäuse zwischen der zweiten und dritten Immunisierung dreimal mit 1mg OVA gefüttert (vgl. das Schema in Abb 2.5. Ich konnte Literaturangaben bestätigen, nach denen die OVA-spezifische IgG1 Immunantwort dieser Mäuse nicht beeinträchtigt ist (Rodríguez-Sosa et al., 2005). Im Serum fanden wir die gleiche Konzentration an OVA spezifischen IgG1 Antikörpern wie in WT Mäusen. Überraschenderweise konnten wir aber zusätzlich zeigen, dass die Basallevel von IgG1 und IgA Antikörpern im Blut bei AhR-KO Mäusen signifikant über denen der WT Mäuse lagen. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: 1. erhöhte Antikörpersekretion der B-Zellen nach Aktivierung, 2. verringerte Apoptose der Plasmazellen oder 3. Störungen bei der Beendigung der Immunantwort.

Da die OVA spezifische Antwort nicht verstärkt war, kommt es vermutlich nicht zu einer im Vergleich zum WT verstärkten Stimulation der B-Zellen nach der Immunisierung. Einen weiteren Hinweis liefern wieder die Ergebnisse von Rodríguez-Sosa et al. (2005), nach denen in AhR-KO Mäusen nach Immunisierung mit OVA zwar vermehrt Th1 Zytokine ausgeschüttet wurden, die Th2 Zytokine, welche die humorale Antwort stimulieren, und Anzahl der B-Zellen aber unverändert war. Die Erhöhung der IgG1 und IgA Titer im Serum der AhR-KO Mäuse könnte auch auf eine verringerte Apoptose von Plasmazellen am Ende der Immunantwort zurückzuführen sein. Zumindest in B-Vorläuferzellen ist der AhR an der Regulation der Apoptose beteiligt (Near et al., 1999). Sollte das Fehlen des AhR die Apoptose von Plasmazellen behindern, müssten folglich mehr dieser Zellen in AhR-KO Mäusen zu finden sein. Allerdings konnten wir im GALT keine Erhöhung von B- oder Plasmazellen messen und es gibt keine Berichte über Änderungen der Frequenzen im Knochenmark bei AhR-KO Mäusen. Eine weitere Möglichkeit, die höheren Serumstiter zu erklären, wäre, dass AhR-KO Mäuse Defizite in der Regulation der Beendigung der Immunantwort aufweisen. Bei der Erhaltung der Antikörperproduktion scheinen zwei Proteine eine wichtige Rolle zu spielen: Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein) wird für die Differenzierung von langlebigen Antikörper-sezernierenden B-

Zellen benötigt (Kallies et al., 2004), und CD93 ist essentiell für eine Fortsetzung der Antikörpersekretion von Plasmazellen (Chevrier et al., 2009). Von Blimp1 ist bekannt, dass TCDD Exposition zu einer Herunterregulation führt (Schneider et al., 2009). Bei der Erörterung der Rolle des AhR in der Regulation adaptiver Immunantworten, könnte die Expressionsanalyse dieser beiden Proteine in AhR-KO Mäusen weitere Erkenntnisse bringen. Möglicherweise liegt die Ursache aber auch ganz einfach in einem später diskutierten Defekt der Epithelbarriere in AhR-KO Mäusen, da die Serumkonzentrationen von IgG1 und IgA auch durch Darmbakterien und ihr Eindringen in die Lamina propria beeinflusst werden (Hooijkaas et al., 1984). Die Untersuchung von keimfrei gehaltenen AhR-KO Mäusen könnte klären, ob diese Theorie zutrifft.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Serum entsprach der IgA Titer im Kot von AhR-KO Mäusen denen der WT Mäuse, während die OVA spezifische Reaktion nur bei wenigen AhR-KO Tieren überhaupt messbar war. Die in den Darm sezernierten Antikörper werden von den B-Zellen der Lamina propria und der PP gebildet. Da ich zeigen konnte, dass AhR-KO Mäuse in diesen Kompartimenten genauso viele B-Zellen besitzen wie WT-Mäuse, kann die fehlende spezifische Reaktion nicht auf einen Mangel an B-Zellen zurückzuführen sein. Dafür spricht auch, dass der Basallevel an IgA im Kot von AhR-KO Mäusen mit dem der WT-Mäuse vergleichbar war. Wahrscheinlicher ist, dass dieser Unterschied durch mangelnder Aktivierung der B-Zellen durch T-Zellen hervorgerufen wurde. Der Hauptunterschied in der zellulären Zusammensetzung des GALT bei AhR-KO Mäusen bestand in der starken Verminderung der $CD8\alpha\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen im Darmepithel. Interessanterweise findet sich im Kot von TCR γ -KO Mäuse kaum IgA, was vermutlich an der stark verringerten Anzahl an B-Zellen in der Lamina propria liegt (Fujihashi et al., 1996). Demnach scheint diesen Zellen neben Immunregulation und Stärkung der Epithelbarriere auch eine wichtige Funktion bei der IgA Produktion zuzukommen. Die halbierte Anzahl an $CD8\alpha\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen wäre vermutlich langfristig in der Lage, die IgA Produktion auf einem dem Wildtyp vergleichbarem Niveau zu halten. Möglicherweise reichen diese Zellen aber in AhR-KO Mäusen nicht aus, um direkt nach der Stimulation durch Fütterung mit 1mg die Sekretion von OVA-spezifischem IgA in den Darm anzuregen. Insbesondere da in einigen Tieren geringe Spiegel OVA-IgA spezifischer Antikörper im Kot nachgewiesen werden konnten, bleibt zu klären, ob die Produktion in AhR-KO Mäusen nur verspätet einsetzt, dann aber das Niveau der WT Mäuse erreichen kann.

4.2.2 Keine OT Etablierung in AhR-KO Mäusen

Ich konnte als erste zeigen, dass nicht nur die Überaktivierung des AhR die Etablierung der oralen Toleranz verhindert, sondern dass dies auch in AhR-KO Mäusen der Fall war. Die dreimalige Fütterung von 20mg OVA (Induktion der OT) führte in AhR-KO Mäusen spätestens nach der dritten Immunisierung gegen OVA zur Produktion spezifischer IgG1-Antikörper im Serum, während dies bei toleranten Tieren nicht der Fall war. Die Gründe hierfür werden vermutlich nicht, wie nach TCDD Gabe, in einer Fehlregulation der Th17 / Treg Balance liegen. Die Frequenz von Treg Zellen in AhR-KO und WT Mäusen unterscheidet sich nicht. Außerdem wird der AhR in der Differenzierung von Th17 Zellen benötigt, so dass CD4⁺ T-Zellen aus AhR-KO Mäusen weniger IL-17 und kein IL-22 produzieren (Kimura et al., 2008). Eine verstärkte Differenzierung zu Th17 Zellen kann in AhR-KO Mäusen also nicht stattfinden. Vielmehr dürften Defekte in der Zellentwicklung und Besiedelung des Darms mit Immunzellen für die nicht erfolgreiche Toleranzinduktion verantwortlich sein. Mögliche Folgen könnten reduzierter Antigentransport in die MLN oder eine veränderte Zytokinproduktion im Darm sein, die entweder die Unterdrückung von Immunantworten behindern oder durch Schädigung der Epithelbarriere zu Entzündungen führen könnte. Beides würde die Entstehung von OT verhindern.

Beim Vergleich der Immunzellzusammensetzung der verschiedenen Kompartimente des GALT (MLN, PP, Lamina propria und Epithel) zwischen AhR-KO und WT-Mäusen fanden sich gravierende Unterschiede. Zum einen war im Epithel von AhR-KO Mäusen etwa die Hälfte der regulatorischen CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ T-Zellen durch zytotoxische CD8 α β ⁺TCR α β ⁺ T-Zellen ersetzt, zum anderen befanden sich, vermutlich aufgrund einer gestörten Migration, mehr CD103⁺ DC in der Lamina propria und weniger in den MLN.

Die in AhR-KO Mäusen stark reduzierten intraepithelialen CD8 α ⁺TCR γ δ ⁺ T-Zellen spielen eine direkte Rolle in der oralen Toleranz. So lässt sich in TCR δ -KO Mäusen keine orale Toleranz induzieren, diese aber durch den Transfer von TCR γ δ ⁺ Zellen aus toleranten Tieren übertragen (Ke et al., 1997). TCR γ δ T-Zellen übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation der Immunantwort und Erhaltung der Epithelintegrität im Darm. Die Produktion von GM-CSF verstärkt die Expression von *ald1a2* und somit die Umsetzung von Vitamin A zu Retinsäure (Yokota et al., 2009). Die immunsuppressive Wirkung von Retinsäure beruht auf der gesteigerten Differenzierung von Treg Zellen (Nolting et al., 2009). Gleichzeitig reagieren die

CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\gamma\delta^+$ IEL auf Stresssignale der Epithelzellen und sorgen nach Verletzungen über KGF und GM-CSF für eine schnelle Regeneration des Epithels, wie anhand des Beispiels der DSS induzierten Colitis gezeigt werden konnte (Chen et al., 2002). Eine beschädigte Barriere erlaubt das Eindringen von Bakterien in die Lamina propria und kann zu chronischen Entzündungen führen (Suenart et al., 2010), welche die Entstehung von OT behindern würden. Entsprechend der Verringerung der CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\gamma\delta^+$ Frequenz im Epithel von AhR-KO Mäusen ließ sich im Jejunum weniger GM-CSF nachweisen.

In den MLN von AhR-KO Mäusen fanden sich im Vergleich zu WT Mäusen weniger CD103 $^+$ DC, wohingegen deren Frequenz in der Lamina propria erhöht war. Somit könnte die Migration dieser Zellen in AhR-KO Mäusen gestört sein. Ein verminderter Transport von OVA in die MLN würde die Entstehung der OT negativ beeinflussen (Worbs et al., 2006). Laut Schulz et al. (2009) führt eine Aktivierung von TLRs zu einer verstärkten Migration von CD103 $^+$ Zellen in die MLN, wobei nicht geklärt ist, ob diese Rezeptoren auch die basale Wanderung der DC steuern. Aufgrund der verringerten Zahl an CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen würde, wie oben erklärt, die Epithelbarriere eher durchlässiger für Bakterien, so dass eher mehr als weniger TLR Liganden in der Lamina propria vorhanden sein sollten. Möglich wären aber Defizite in der TLR Signaltransduktion oder der Expression des Chemokin Rezeptors 7 (CCR7), der für die Migration in die MLN essentiell ist (Jang et al., 2006). Es wäre nicht unwahrscheinlich, dass der AhR in die Expression von CCR7 auf DC involviert ist, da die Aktivierung durch TCDD zu mehr CCR7 $^+$ DC in der Milz und den peripheren Lymphknoten führt (Bankoti et al., 2010).

4.2.3 Mögliche Ursachen für die verringerte TCR $\gamma\delta^+$ T-Zell-Anzahl in AhR-KO Mäusen

Das Fehlen der CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\gamma\delta^+$ T-Zellen im Epithel von AhR-KO Mäusen kann verschiedene Ursachen haben: (1) Probleme bei der Entstehung oder Selektion im Thymus, (2) gestörte Migration in das Darmepithel oder (3) verkürztes Überleben oder fehlende Proliferation im Epithel. AhR vermittelte Effekte auf den Thymus wurden bislang hauptsächlich anhand der Überaktivierung untersucht. Der AhR vermittelt die toxischen Wirkungen des TCDD, so dass AhR-KO Mäuse resistent gegenüber durch TCDD ausgelöste Thymus Atrophie oder der Emigration von unreifen T-Zellen sind. Der AhR wird im Thymus vieler Spezies stark exprimiert (Esser, 2009), so dass eine endogene Rolle bei der Entwicklung der Thymozyten wahrschein-

lich erscheint. Zwar wurden die Entstehung von $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Zellen im Thymus von AhR-KO Mäusen bislang nicht betrachtet, bekannt ist aber, dass TCDD Exposition von trächtigen Mäusen in den Nachkommen zu mehr $\text{TCR}\gamma\delta^+$ und weniger $\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-Zellen führt (Blaylock et al., 1992). Die durch TCDD ausgelösten Effekte sind zwar selten spiegelbildlich zu den in AhR-KO Mäusen beobachteten Veränderungen. Eine TCDD Exposition bereits während der Entwicklung könnte aber eher komplementär zu dem Fehlen des AhR sein.

Zusätzlich zu einer verringerten Entstehung im Thymus wäre es auch möglich, dass die $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen im Epithel schlechter überleben können. Für das Überleben benötigen $\text{TCR}\gamma\delta^+$ Zellen von den Epithelzellen produziertes IL-15 (Kennedy et al., 2000). Auf mRNA Ebene zeigte sich in einem Vorversuch eine Reduktion der IL-15 Expression im Jejunum um etwa 50% (Abb. 4.2). Somit könnte hier ebenfalls eine Ursache für das Fehlen der $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen liegen. Anders als die zuvor angesprochenen möglichen Verschiebung im Thymus von $\text{TCR}\gamma\delta$ zu $\text{TCR}\alpha\beta$ kann eine verringerte IL-15 Sekretion nur die geringere Anzahl an $\text{TCR}\gamma\delta$ T-Zellen begründen. Sie erklärt aber nicht das gleichzeitig vermehrte Vorkommen von $\text{TCR}\alpha\beta^+$ T-Zellen im Epithel von AhR-KO Mäusen.

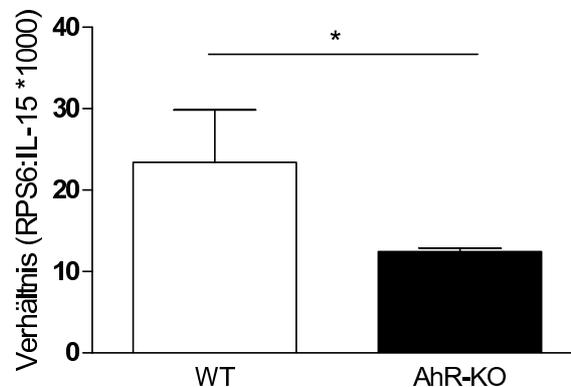


Abbildung 4.2: IL-15 mRNA Expression im Jejunum von AhR-KO vs WT Mäusen. n=2-3
* $p < 0,05$ (Student t-Test)

Zusammenfassend könnte das Zusammenspiel von geringerer Migration und Antigentransport in die MLN durch die $\text{CD}103^+$ DC und dem Fehlen der immunregulatorischen $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen die Etablierung der oralen Toleranz in AhR-KO Mäusen verhindern. Dabei könnte die verringerte Anzahl an $\text{TCR}\gamma\delta^+$ T-Zellen auch die Stabilität der Epithelbarriere beeinflussen und somit indirekt zu einem proinflammatorischem Milieu im Darm führen, das die Entstehung der OT behindern könnte.

Der AhR besitzt somit wichtige Funktionen bei der Regulation von Immunantworten. Dabei scheint er sowohl proinflammatorische Prozesse, wie nach der Überaktivierung mit TCDD, wie auch immunsupprimierende Prozesse zu beeinflussen. Neben der weiteren Aufklärung der beteiligten Zellen und Zytokine, wäre es auch interessant, ob die durch TCDD vermittelten Effekte ebenfalls durch abbaubare Liganden wie Flavonoide hervorgerufen werden könnten. Die beobachteten Effekte in den AhR-KO Mäusen lassen auch den Schluss zu, dass AhR-Liganden unserer Nahrung möglicherweise einen wichtigen Beitrag für das Überleben der $CD8\alpha^+TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen und der Sekretion antiinflammatorischer Zytokine leisten. Regelmäßige Einnahme der 1000x Dosis im Vergleich zu unserer Nahrung, wie sie in Nahrungsergänzungsmitteln zu finden ist, könnte dagegen ähnlich TCDD in einer übermäßigen Aktivierung des AhR resultieren und damit möglicherweise zu Nahrungsmittelunverträglichkeiten führen.

Literaturverzeichnis

- [Alberola-Ila et al. 1992] ALBEROLA-ILA, J. ; PLACES, L. ; CANTRELL, D. A. ; VIVES, J. ; LOZANO, F.: Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. In: *J Immunol* 148 (1992), Mar, Nr. 5, S. 1287–1293
- [Andersson et al. 1979] ANDERSSON, J. ; GRÖNVIK, K. O. ; LARSSON, E. L. ; COUTINHO, A.: Studies on T lymphocyte activation. I. Requirements for the mitogen-dependent production of T cell growth factors. In: *Eur J Immunol* 9 (1979), Aug, Nr. 8, S. 581–587
- [Ardizzone und Porro 2005] ARDIZZONE, S. ; PORRO, G. B.: Biologic therapy for inflammatory bowel disease. In: *Drugs* 65 (2005), Nr. 16, S. 2253–2286
- [Bankoti et al. 2010] BANKOTI, J. ; BURNETT, A. ; NAVARRO, S. ; MILLER, A. K. ; RASE, B. ; SHEPHERD, D. M.: Effects of TCDD on the fate of naive dendritic cells. In: *Toxicol Sci* (2010), Mar
- [Bell und Poland 2000] BELL, D. R. ; POLAND, A.: Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nov, Nr. 46, S. 36407–36414
- [den Berg et al. 1998] BERG, M. V. den ; BIRNBAUM, L. ; BOSVELD, A. T. ; BRUNSTRÖM, B. ; COOK, P. ; FEELEY, M. ; GIESY, J. P. ; HANBERG, A. ; HASEGAWA, R. ; KENNEDY, S. W. ; KUBIAK, T. ; LARSEN, J. C. ; LEEUWEN, F. X. van ; LIEM, A. K. ; NOLT, C. ; PETERSON, R. E. ; POELLINGER, L. ; SAFE, S. ; SCHRENK, D. ; TILLITT, D. ; TYSKLIND, M. ; YOUNES, M. ; WAERN, F. ; ZACHAREWSKI, T.: Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. In: *Environ Health Perspect* 106 (1998), Dec, Nr. 12, S. 775–792
- [den Berg et al. 1994] BERG, M. V. den ; JONGH, J. D. ; POIGER, H. ; OLSON, J. R.: The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. In: *Crit Rev Toxicol* 24 (1994), Nr. 1, S. 1–74

- [Bergander et al. 2004] BERGANDER, L. ; WINCENT, E. ; RANNUG, A. ; FOROOZESH, M. ; ALWORTH, W. ; RANNUG, U.: Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. In: *Chem Biol Interact* 149 (2004), Oct, Nr. 2-3, S. 151–164
- [Bettelli et al. 2006] BETTELLI, E. ; CARRIER, Y. ; GAO, W. ; KORN, T. ; STROM, T. B. ; OUKKA, M. ; WEINER, H. L. ; KUCHROO, V. K.: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. In: *Nature* 441 (2006), May, Nr. 7090, S. 235–238
- [Blaylock et al. 1992] BLAYLOCK, B. L. ; HOLLADAY, S. D. ; COMMENT, C. E. ; HEINDEL, J. J. ; LUSTER, M. I.: Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte maturation. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 112 (1992), Feb, Nr. 2, S. 207–213
- [von Boehmer 2007] BOEHMER, H. von: Oral tolerance: is it all retinoic acid? In: *J Exp Med* 204 (2007), Aug, Nr. 8, S. 1737–1739
- [Bruegel et al. 2009] BRUEGEL, M. ; CEGLAREK, U. ; THIERY, J.: Eicosanoids: essential mediators in health and disease. In: *LaboratoriumsMedizin* 33/6 (2009), S. 333–339
- [Camacho et al. 2005] CAMACHO, I. A. ; SINGH, N. ; HEGDE, V. L. ; NAGARKATTI, M. ; NAGARKATTI, P. S.: Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin leads to aryl hydrocarbon receptor-dependent nuclear translocation of NF-kappaB and expression of Fas ligand in thymic stromal cells and consequent apoptosis in T cells. In: *J Immunol* 175 (2005), Jul, Nr. 1, S. 90–103
- [Chapman und Schiller 1985] CHAPMAN, D. E. ; SCHILLER, C. M.: Dose-related effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57BL/6J and DBA/2J mice. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 78 (1985), Mar, Nr. 1, S. 147–157
- [Chen et al. 2002] CHEN, Y. ; CHOU, K. ; FUCHS, E. ; HAVRAN, W. L. ; BOISMENU, R.: Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Oct, Nr. 22, S. 14338–14343
- [Cheon et al. 2007] CHEON, H. ; WOO, Y.-S. ; LEE, J. Y. ; KIM, H. S. ; KIM, H. J. ; CHO, S. ; WON, N. H. ; SOHN, J.: Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF-alpha production in differentiated THP-1 human macrophages. In: *Exp Mol Med* 39 (2007), Aug, Nr. 4, S. 524–534

- [Cheroutre und Lambolez 2008] CHEROUTRE, H. ; LAMBOLEZ, F.: The thymus chapter in the life of gut-specific intra epithelial lymphocytes. In: *Curr Opin Immunol* 20 (2008), Apr, Nr. 2, S. 185–191
- [Cheroutre und Madakamutil 2004] CHEROUTRE, H. ; MADAKAMUTIL, L.: Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. In: *Nat Rev Immunol* 4 (2004), Apr, Nr. 4, S. 290–300
- [Chevrier et al. 2009] CHEVRIER, S. ; GENTON, C. ; KALLIES, A. ; KARNOWSKI, A. ; OTTEN, L. A. ; MALISSEN, B. ; MALISSEN, M. ; BOTTO, M. ; CORCORAN, L. M. ; NUTT, S. L. ; ACHA-ORBEA, H.: CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Mar, Nr. 10, S. 3895–3900
- [Chieppa et al. 2006] CHIEPPA, M. ; RESCIGNO, M. ; HUANG, A. Y. C. ; GERMAIN, R. N.: Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. In: *J Exp Med* 203 (2006), Dec, Nr. 13, S. 2841–2852
- [Coombes et al. 2007] COOMBES, J. L. ; SIDDIQUI, K. R. R. ; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C. V. ; HALL, J. ; SUN, C.-M. ; BELKAID, Y. ; POWRIE, F.: A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. In: *J Exp Med* 204 (2007), Aug, Nr. 8, S. 1757–1764
- [CREAMER et al. 1961] CREAMER, B. ; SHORTER, R. G. ; BAMFORTH, J.: The turnover and shedding of epithelial cells. I. The turnover in the gastrointestinal tract. In: *Gut* 2 (1961), Jun, S. 110–118
- [Cumano und Rajewsky 1985] CUMANO, A. ; RAJEWSKY, K.: Structure of primary anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in normal and idiotypically suppressed C57BL/6 mice. In: *Eur J Immunol* 15 (1985), May, Nr. 5, S. 512–520
- [Davis und Safe 1988] DAVIS, D. ; SAFE, S.: Immunosuppressive activities of polychlorinated dibenzofuran congeners: quantitative structure-activity relationships and interactive effects. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 94 (1988), Jun, Nr. 1, S. 141–149
- [Denning et al. 2007] DENNING, T. L. ; GRANGER, S. W. ; GRANGER, S. ; MUCIDA, D. ; GRADDY, R. ; LECLERCQ, G. ; ZHANG, W. ; HONEY, K. ; RASMUSSEN,

- J. P. ; CHEROUTRE, H. ; RUDENSKY, A. Y. ; KRONENBERG, M.: Mouse TCR α -ph β +CD8 α intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. In: *J Immunol* 178 (2007), Apr, Nr. 7, S. 4230–4239
- [di Domenico und Zapponi 1986] DOMENICO, A. di ; ZAPPONI, G. A.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the environment: human health risk estimation and its application to the Seveso case as an example. In: *Regul Toxicol Pharmacol* 6 (1986), Sep, Nr. 3, S. 248–260
- [Duffy et al. 2006] DUFFY, D. ; YANG, C.-P. ; HEATH, A. ; GARSIDE, P. ; BELL, E. B.: Naive T-cell receptor transgenic T cells help memory B cells produce antibody. In: *Immunology* 119 (2006), Nov, Nr. 3, S. 376–384
- [Esser 2009] ESSER, C.: The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. In: *Biochem Pharmacol* 77 (2009), Feb, Nr. 4, S. 597–607
- [Fernandez-Salguero et al. 1996] FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. ; HILBERT, D. M. ; RUDIKOFF, S. ; WARD, J. M. ; GONZALEZ, F. J.: Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 140 (1996), Sep, Nr. 1, S. 173–179
- [Fernandez-Salguero et al. 1997] FERNANDEZ-SALGUERO, P. M. ; WARD, J. M. ; SUNDBERG, J. P. ; GONZALEZ, F. J.: Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. In: *Vet Pathol* 34 (1997), Nov, Nr. 6, S. 605–614
- [Fowler und Weiner 1997] FOWLER, E. ; WEINER, H. L.: Oral tolerance: elucidation of mechanisms and application to treatment of autoimmune diseases. In: *Biopolymers* 43 (1997), Nr. 4, S. 323–335
- [Frericks und Esser 2008] FRERICKS, M. ; ESSER, C.: A toolbox of novel murine house-keeping genes identified by meta-analysis of large scale gene expression profiles. In: *Biochim Biophys Acta* 1779 (2008), Dec, Nr. 12, S. 830–837
- [Frericks et al. 2007] FRERICKS, M. ; MEISSNER, M. ; ESSER, C.: Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 220 (2007), May, Nr. 3, S. 320–332
- [Frericks et al. 2006] FRERICKS, M. ; TEMCHURA, V. V. ; MAJORA, M. ; STUTTE, S. ; ESSER, C.: Transcriptional signatures of immune cells in aryl hydrocarbon

- receptor (AHR)-proficient and AHR-deficient mice. In: *Biol Chem* 387 (2006), Sep, Nr. 9, S. 1219–1226
- [Fujihashi et al. 1996] FUJIHASHI, K. ; MCGHEE, J. R. ; KWEON, M. N. ; COOPER, M. D. ; TONEGAWA, S. ; TAKAHASHI, I. ; HIROI, T. ; MESTECKY, J. ; KIYONO, H.: gamma/delta T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. In: *J Exp Med* 183 (1996), Apr, Nr. 4, S. 1929–1935
- [Funatake et al. 2005] FUNATAKE, C. J. ; MARSHALL, N. B. ; STEPPAN, L. B. ; MOURICH, D. V. ; KERKVLIT, N. I.: Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. In: *J Immunol* 175 (2005), Oct, Nr. 7, S. 4184–4188
- [Gangadharan und Cheroutre 2004] GANGADHARAN, D. ; CHEROUTRE, H.: The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. In: *Curr Opin Immunol* 16 (2004), Jun, Nr. 3, S. 264–270
- [Garside et al. 1999] GARSIDE, P. ; MOWAT, A. M. ; KHORUTS, A.: Oral tolerance in disease. In: *Gut* 44 (1999), Jan, Nr. 1, S. 137–142
- [Gennari et al. 1994] GENNARI, R. ; ALEXANDER, J. W. ; GIANOTTI, L. ; EAVES-PYLES, T. ; HARTMANN, S.: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor improves survival in two models of gut-derived sepsis by improving gut barrier function and modulating bacterial clearance. In: *Ann Surg* 220 (1994), Jul, Nr. 1, S. 68–76
- [Golde et al. 2005] GOLDE, W. T. ; GOLLOBIN, P. ; RODRIGUEZ, L. L.: A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. In: *Lab Anim (NY)* 34 (2005), Oct, Nr. 9, S. 39–43
- [Guengerich et al. 2004] GUENGERICH, F. P. ; MARTIN, M. V. ; MCCORMICK, W. A. ; NGUYEN, L. P. ; GLOVER, E. ; BRADFIELD, C. A.: Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. In: *Arch Biochem Biophys* 423 (2004), Mar, Nr. 2, S. 309–316
- [Hammerschmidt et al. 2008] HAMMERSCHMIDT, S. I. ; AHRENDT, M. ; BODE, U. ; WAHL, B. ; KREMMER, E. ; FÖRSTER, R. ; PABST, O.: Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. In: *J Exp Med* 205 (2008), Oct, Nr. 11, S. 2483–2490

- [Hayday und Gibbons 2008] HAYDAY, A. ; GIBBONS, D.: Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. In: *Mucosal Immunol* 1 (2008), May, Nr. 3, S. 172–174
- [Hoffman et al. 1986] HOFFMAN, R. E. ; STEHR-GREEN, P. A. ; WEBB, K. B. ; EVANS, R. G. ; KNUTSEN, A. P. ; SCHRAMM, W. F. ; STAAKE, J. L. ; GIBSON, B. B. ; STEINBERG, K. K.: Health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In: *JAMA* 255 (1986), Apr, Nr. 15, S. 2031–2038
- [Holsapple et al. 1991] HOLSAPPLE, M. P. ; SNYDER, N. K. ; WOOD, S. C. ; MORRIS, D. L.: A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. In: *Toxicology* 69 (1991), Nr. 3, S. 219–255
- [Hooijkaas et al. 1984] HOOIJKAAS, H. ; BENNER, R. ; PLEASANTS, J. R. ; WESTMANN, B. S.: Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered antigen-free diet. In: *Eur J Immunol* 14 (1984), Dec, Nr. 12, S. 1127–1130
- [Huleatt und Lefrançois 1995] HULEATT, J. W. ; LEFRANÇOIS, L.: Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. In: *J Immunol* 154 (1995), Jun, Nr. 11, S. 5684–5693
- [Hänninen und Harrison 2000] HÄNNINEN, A. ; HARRISON, L. C.: Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model. In: *Immunol Rev* 173 (2000), Feb, S. 109–119
- [Ito et al. 2002] ITO, T. ; INOUE, K. ; FUJIMAKI, H. ; TOHYAMA, C. ; NOHARA, K.: Mechanism of TCDD-induced suppression of antibody production: effect on T cell-derived cytokine production in the primary immune reaction of mice. In: *Toxicol Sci* 70 (2002), Nov, Nr. 1, S. 46–54
- [Iwata et al. 2004] IWATA, M. ; HIRAKIYAMA, A. ; ESHIMA, Y. ; KAGECHIKA, H. ; KATO, C. ; SONG, S.-Y.: Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. In: *Immunity* 21 (2004), Oct, Nr. 4, S. 527–538
- [Jaensson et al. 2008] JAENSSON, E. ; URONEN-HANSSON, H. ; PABST, O. ; EKSTEEN, B. ; TIAN, J. ; COOMBES, J. L. ; BERG, P.-L. ; DAVIDSSON, T. ; POWRIE, F. ; JOHANSSON-LINDBOM, B. ; AGACE, W. W.: Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. In: *J Exp Med* 205 (2008), Sep, Nr. 9, S. 2139–2149
- [Jang et al. 2006] JANG, M. H. ; SOUGAWA, N. ; TANAKA, T. ; HIRATA, T. ; HIROI, T. ; TOHYA, K. ; GUO, Z. ; UMEMOTO, E. ; EBISUNO, Y. ; YANG, B.-G. ; SEOH,

- J.-Y. ; LIPP, M. ; KIYONO, H. ; MIYASAKA, M.: CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. In: *J Immunol* 176 (2006), Jan, Nr. 2, S. 803–810
- [Johansson-Lindbom et al. 2005] JOHANSSON-LINDBOM, B. ; SVENSSON, M. ; PABST, O. ; PALMQVIST, C. ; MARQUEZ, G. ; FÖRSTER, R. ; AGACE, W. W.: Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. In: *J Exp Med* 202 (2005), Oct, Nr. 8, S. 1063–1073
- [Jux et al. 2009] JUX, B. ; KADOW, S. ; ESSER, C.: Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. In: *J Immunol* 182 (2009), Jun, Nr. 11, S. 6709–6717
- [Kallies et al. 2004] KALLIES, A. ; HASBOLD, J. ; TARLINTON, D. M. ; DIETRICH, W. ; CORCORAN, L. M. ; HODGKIN, P. D. ; NUTT, S. L.: Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. In: *J Exp Med* 200 (2004), Oct, Nr. 8, S. 967–977
- [Kato et al. 2001] KATO, H. ; FUJIHASHI, K. ; KATO, R. ; YUKI, Y. ; MCGHEE, J. R.: Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses. In: *J Immunol* 166 (2001), Mar, Nr. 5, S. 3114–3121
- [Kawajiri et al. 2009] KAWAJIRI, K. ; KOBAYASHI, Y. ; OHTAKE, F. ; IKUTA, T. ; MATSUSHIMA, Y. ; MIMURA, J. ; PETTERSSON, S. ; POLLENZ, R. S. ; SAKAKI, T. ; HIROKAWA, T. ; AKIYAMA, T. ; KUROSUMI, M. ; POELLINGER, L. ; KATO, S. ; FUJII-KURIYAMA, Y.: Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Aug, Nr. 32, S. 13481–13486
- [Kay 1991] KAY, J. E.: Mechanisms of T lymphocyte activation. In: *Immunol Lett* 29 (1991), Jul, Nr. 1-2, S. 51–54
- [Ke et al. 1997] KE, Y. ; PEARCE, K. ; LAKE, J. P. ; ZIEGLER, H. K. ; KAPP, J. A.: Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. In: *J Immunol* 158 (1997), Apr, Nr. 8, S. 3610–3618
- [Kennedy et al. 2000] KENNEDY, M. K. ; GLACCUM, M. ; BROWN, S. N. ; BUTZ, E. A. ; VINEY, J. L. ; EMBERS, M. ; MATSUKI, N. ; CHARRIER, K. ; SEDGER, L. ; WILLIS, C. R. ; BRASEL, K. ; MORRISSEY, P. J. ; STOCKING, K. ; SCHUH, J. C. ; JOYCE, S. ; PESCHON, J. J.: Reversible defects in natural killer and memory CD8

- T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. In: *J Exp Med* 191 (2000), Mar, Nr. 5, S. 771–780
- [Kerkvliet 1995] KERKVLiet, N. I.: Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 9 (1995), Dec, S. 47–53
- [Kerkvliet und Brauner 1990] KERKVLiet, N. I. ; BRAUNER, J. A.: Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus of mice exposed to an acute immunosuppressive dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). In: *Environ Res* 52 (1990), Aug, Nr. 2, S. 146–154
- [Kimura et al. 2008] KIMURA, A. ; NAKA, T. ; NOHARA, K. ; FUJII-KURIYAMA, Y. ; KISHIMOTO, T.: Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008), Jul, Nr. 28, S. 9721–9726
- [Kinoshita et al. 2006] KINOSHITA, H. ; J. ABE, K. ; AKADEGAWA ; YURINO, H. ; UCHIDA, T. ; IKEDA, S. ; MATSUSHIMA, K. ; ISHIKAWA, S.: Breakdown of Mucosal Immunity in Gut by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). In: *Environmental Health and Preventive Medicine* 11 (2006), S. 256–263
- [Kobayashi et al. 2008] KOBAYASHI, S. ; OKAMOTO, H. ; IWAMOTO, T. ; TOYAMA, Y. ; TOMATSU, T. ; YAMANAKA, H. ; MOMOHARA, S.: A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology (Oxford)* 47 (2008), Sep, Nr. 9, S. 1317–1322
- [Kolluri et al. 1999] KOLLURI, S. K. ; WEISS, C. ; KOFF, A. ; GÖTTLICHER, M.: p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. In: *Genes Dev* 13 (1999), Jul, Nr. 13, S. 1742–1753
- [Lahvis et al. 2005] LAHVIS, G. P. ; PYZALSKI, R. W. ; GLOVER, E. ; PITOT, H. C. ; MCELWEE, M. K. ; BRADFIELD, C. A.: The aryl hydrocarbon receptor is required for developmental closure of the ductus venosus in the neonatal mouse. In: *Mol Pharmacol* 67 (2005), Mar, Nr. 3, S. 714–720
- [Lakshmanan et al. 1986] LAKSHMANAN, M. R. ; CAMPBELL, B. S. ; CHIRTEL, S. J. ; EKAROHITA, N. ; EZEKIEL, M.: Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. In: *J Pharmacol Exp Ther* 239 (1986), Dec, Nr. 3, S. 673–677

- [Lambolez und Rocha 2001] LAMBOLEZ, F. ; ROCHA, B.: Immunology. A molecular gut reaction. In: *Science* 294 (2001), Nov, Nr. 5548, S. 1848–1849
- [Lampen et al. 2000] LAMPEN, A. ; MEYER, S. ; ARNHOLD, T. ; NAU, H.: Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes. In: *J Pharmacol Exp Ther* 295 (2000), Dec, Nr. 3, S. 979–985
- [Lang et al. 1994] LANG, D. S. ; BECKER, S. ; CLARK, G. C. ; DEVLIN, R. B. ; KOREN, H. S.: Lack of direct immunosuppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on human peripheral blood lymphocyte subsets in vitro. In: *Arch Toxicol* 68 (1994), Nr. 5, S. 296–302
- [Lauterslager und Hilgers 2002] LAUTERSLAGER, T. G. ; HILGERS, L. A.: A Multiple Dose Immunisation Protocol Suitable For Edible Vaccines. In: *The Internet Journal of Asthma, Allergy and Immunology* 2 (2002)
- [Ma 2001] MA, Q.: Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. In: *Curr Drug Metab* 2 (2001), Jun, Nr. 2, S. 149–164
- [Ma und Baldwin 2000] MA, Q. ; BALDWIN, K. T.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Mar, Nr. 12, S. 8432–8438
- [Marshall und Kerkvliet 2010] MARSHALL, N. B. ; KERKVLIELT, N. I.: Dioxin and immune regulation: emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. In: *Ann N Y Acad Sci* 1183 (2010), Jan, S. 25–37
- [McGhee 1999] MCGHEE, H. K. ; PAUL, W. E. (Hrsg.): *Fundamental Immunology*, Academic Press, San Diego. 4. Auflage. 1999. – The Mucosal Immune System
- [McKay 28 April 2002] MCKAY, G.: Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review. In: *Chemical Engineering Journal* 86 (28 April 2002), S. 343–368
- [Miltenyi et al. 1990] MILTENYI, S. ; MÜLLER, W. ; WEICHEL, W. ; RADBRUCH, A.: High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry* 11 (1990), Nr. 2, S. 231–238

- [Mimura et al. 1999] MIMURA, J. ; EMA, M. ; SOGAWA, K. ; FUJII-KURIYAMA, Y.: Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. In: *Genes Dev* 13 (1999), Jan, Nr. 1, S. 20–25
- [Mizoguchi et al. 2003] MIZOGUCHI, A. ; MIZOGUCHI, E. ; JONG, Y. P. de ; TAKEDATSU, H. ; PREFFER, F. I. ; TERHORST, C. ; BHAN, A. K.: Role of the CD5 molecule on TCR gammadelta T cell-mediated immune functions: development of germinal centers and chronic intestinal inflammation. In: *Int Immunol* 15 (2003), Jan, Nr. 1, S. 97–108
- [Nau und Bass 1981] NAU, H. ; BASS, R.: Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the mouse embryo and fetus. In: *Toxicology* 20 (1981), Nr. 4, S. 299–308
- [Near et al. 1999] NEAR, R. I. ; MATULKA, R. A. ; MANN, K. K. ; GOGATE, S. U. ; TROMBINO, A. F. ; SHERR, D. H.: Regulation of preB cell apoptosis by aryl hydrocarbon receptor/transcription factor-expressing stromal/adherent cells. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 221 (1999), Jul, Nr. 3, S. 242–252
- [Nebert und Karp 2008] NEBERT, D. W. ; KARP, C. L.: Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Dec, Nr. 52, S. 36061–36065
- [Neubert et al. 1991] NEUBERT, R. ; JACOB-MÜLLER, U. ; HELGE, H. ; STAHL-MANN, R. ; NEUBERT, D.: Polyhalogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 2. In vitro effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on lymphocytes of venous blood from man and a non-human primate (*Callithrix jacchus*). In: *Arch Toxicol* 65 (1991), Nr. 3, S. 213–219
- [Nguyen und Bradfield 2008] NGUYEN, L. P. ; BRADFIELD, C. A.: The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. In: *Chem Res Toxicol* 21 (2008), Jan, Nr. 1, S. 102–116
- [Nohara et al. 2002] NOHARA, K. ; FUJIMAKI, H. ; TSUKUMO, S. ichi ; INOUE, K. ; SONE, H. ; TOHYAMA, C.: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice. In: *Toxicology* 172 (2002), Mar, Nr. 1, S. 49–58
- [Nolting et al. 2009] NOLTING, J. ; DANIEL, C. ; REUTER, S. ; STUELTEN, C. ; LI, P. ; SUCOV, H. ; KIM, B.-G. ; LETTERIO, J. J. ; KRETSCHMER, K. ; KIM,

- H.-J. ; BOEHMER, H. von: Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. In: *J Exp Med* 206 (2009), Sep, Nr. 10, S. 2131–2139
- [Pahl 1999] PAHL, H. L.: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. In: *Oncogene* 18 (1999), Nov, Nr. 49, S. 6853–6866
- [Parish 1999] PARISH, C. R.: Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. In: *Immunol Cell Biol* 77 (1999), Dec, Nr. 6, S. 499–508
- [Perdew 1988] PERDEW, G. H.: Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Sep, Nr. 27, S. 13802–13805
- [Poland und Knutson 1982] POLAND, A. ; KNUTSON, J. C.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22 (1982), S. 517–554
- [Puccetti und Grohmann 2007] PUC CETTI, P. ; GROHMANN, U.: IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. In: *Nat Rev Immunol* 7 (2007), Oct, Nr. 10, S. 817–823
- [Quintana et al. 2008] QUINTANA, F. J. ; BASSO, A. S. ; IGLESIAS, A. H. ; KORN, T. ; FAREZ, M. F. ; BETTELLI, E. ; CACCAMO, M. ; OUKKA, M. ; WEINER, H. L.: Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. In: *Nature* 453 (2008), May, Nr. 7191, S. 65–71
- [Reggiani 1978] REGGIANI, G.: Medical problems raised by the TCDD contamination in Seveso, Italy. In: *Arch Toxicol* 40 (1978), Jun, Nr. 3, S. 161–188
- [Rocha et al. 1994] ROCHA, B. ; VASSALLI, P. ; GUY-GRAND, D.: Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. In: *J Exp Med* 180 (1994), Aug, Nr. 2, S. 681–686
- [Roche 2009]
- [Rodríguez-Sosa et al. 2005] RODRÍGUEZ-SOSA, M. ; ELIZONDO, G. ; LÓPEZ-DURÁN, R. M. ; RIVERA, I. ; GONZALEZ, F. J. ; VEGA, L.: Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice. In: *FEBS Lett* 579 (2005), Nov, Nr. 28, S. 6403–6410
- [Ross und Kasum 2002] ROSS, J. A. ; KASUM, C. M.: Dietary flavonoids: bio-availability, metabolic effects, and safety. In: *Annu Rev Nutr* 22 (2002), S. 19–34

- [Ruby et al. 2002] RUBY, C. E. ; LEID, M. ; KERKVLIT, N. I.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses tumor necrosis factor-alpha and anti-CD40-induced activation of NF-kappaB/Rel in dendritic cells: p50 homodimer activation is not affected. In: *Mol Pharmacol* 62 (2002), Sep, Nr. 3, S. 722–728
- [Schaldach et al. 1999] SCHALDACH, C. M. ; RIBY, J. ; BJELDANES, L. F.: Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. In: *Biochemistry* 38 (1999), Jun, Nr. 23, S. 7594–7600
- [Schmidt et al. 1996] SCHMIDT, J. V. ; SU, G. H. ; REDDY, J. K. ; SIMON, M. C. ; BRADFIELD, C. A.: Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Jun, Nr. 13, S. 6731–6736
- [Schneider et al. 2009] SCHNEIDER, D. ; MANZAN, M. A. ; YOO, B. S. ; CRAWFORD, R. B. ; KAMINSKI, N.: Involvement of Blimp-1 and AP-1 dysregulation in the 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated suppression of the IgM response by B cells. In: *Toxicol Sci* 108 (2009), Apr, Nr. 2, S. 377–388
- [Schulz et al. 2009] SCHULZ, O. ; JAENSSON, E. ; PERSSON, E. K. ; LIU, X. ; WORBS, T. ; AGACE, W. W. ; PABST, O.: Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. In: *J Exp Med* 206 (2009), Dec, Nr. 13, S. 3101–3114
- [Seiderer et al. 2008] SEIDERER, J. ; ELBEN, I. ; DIEGELMANN, J. ; GLAS, J. ; STALLHOFER, J. ; TILLACK, C. ; PFENNIG, S. ; JÜRGENS, M. ; SCHMECHEL, S. ; KONRAD, A. ; GÖKE, B. ; OCHSENKÜHN, T. ; MÜLLER-MYHSOK, B. ; LOHSE, P. ; BRAND, S.: Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. In: *Inflamm Bowel Dis* 14 (2008), Apr, Nr. 4, S. 437–445
- [Shale und Ghosh 2009] SHALE, M. ; GHOSH, S.: How intestinal epithelial cells tolerise dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. In: *Gut* 58 (2009), Sep, Nr. 9, S. 1291–1299
- [Shepherd et al. 2000] SHEPHERD, D. M. ; DEARSTYNE, E. A. ; KERKVLIT, N. I.: The effects of TCDD on the activation of ovalbumin (OVA)-specific DO11.10 transgenic CD4(+) T cells in adoptively transferred mice. In: *Toxicol Sci* 56 (2000), Aug, Nr. 2, S. 340–350

- [Shimba et al. 2002] SHIMBA, S. ; KOMIYAMA, K. ; MORO, I. ; TEZUKA, M.: Overexpression of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Accelerates the Cell Proliferation of A549 Cells¹. In: *J. Biochem.* 132 (2002), S. 795–802
- [Siekevitz et al. 1987] SIEKEVITZ, M. ; KOCKS, C. ; RAJEWSKY, K. ; DILDROP, R.: Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. In: *Cell* 48 (1987), Mar, Nr. 5, S. 757–770
- [Steinkamp et al. 1999] STEINKAMP, J. A. ; LEHNERT, B. E. ; LEHNERT, N. M.: Discrimination of damaged/dead cells by propidium iodide uptake in immunofluorescently labeled populations analyzed by phase-sensitive flow cytometry. In: *J Immunol Methods* 226 (1999), Jun, Nr. 1-2, S. 59–70
- [Strober 2008] STROBER, W.: Vitamin A rewrites the ABCs of oral tolerance. In: *Mucosal Immunol* 1 (2008), Mar, Nr. 2, S. 92–95
- [Suenart et al. 2010] SUENAERT, P. ; MAERTEN, P. ; ASSCHE, G. V. ; DRIESSCHE, W. V. ; GEBOES, K. ; BULTEEL, V. ; SIMAELS, J. ; AUGUSTIJNS, P. ; CEUPPENS, J. L. ; RUTGEERTS, P. ; PERRIER, C.: Effects of T cell-induced colonic inflammation on epithelial barrier function. In: *Inflamm Bowel Dis* (2010), Feb
- [Sun et al. 2007] SUN, C.-M. ; HALL, J. A. ; BLANK, R. B. ; BOULADOUX, N. ; OUKKA, M. ; MORA, J. R. ; BELKAID, Y.: Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. In: *J Exp Med* 204 (2007), Aug, Nr. 8, S. 1775–1785
- [Svensson et al. 2008] SVENSSON, M. ; JOHANSSON-LINDBOM, B. ; ZAPATA, F. ; JAENSSON, E. ; AUSTENAA, L. M. ; BLOMHOF, R. ; AGACE, W. W.: Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells. In: *Mucosal Immunol* 1 (2008), Jan, Nr. 1, S. 38–48
- [Takamura et al. 2010] TAKAMURA, T. ; HARAMA, D. ; MATSUOKA, S. ; SHIMOKAWA, N. ; NAKAMURA, Y. ; OKUMURA, K. ; OGAWA, H. ; KITAMURA, M. ; NAKAO, A.: Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. In: *Immunol Cell Biol* (2010), Mar
- [Tamura et al. 2003] TAMURA, A. ; SOGA, H. ; YAGUCHI, K. ; YAMAGISHI, M. ; TOYOTA, T. ; SATO, J. ; OKA, Y. ; ITOH, T.: Distribution of two types of

- lymphocytes (intraepithelial and lamina-propria-associated) in the murine small intestine. In: *Cell Tissue Res* 313 (2003), Jul, Nr. 1, S. 47–53
- [Tonn et al. 1996] TONN, T. ; ESSER, C. ; SCHNEIDER, E. M. ; STEINMANN-STEINER-HALDENSTÄTT, W. ; GLEICHMANN, E.: Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In: *Environ Health Perspect* 104 (1996), Apr, Nr. 4, S. 422–426
- [Tsuji et al. 2003] TSUJI, N. M. ; MIZUMACHI, K. ; KURISAKI, J.-I.: Antigen-specific, CD4+CD25+ regulatory T cell clones induced in Peyer's patches. In: *Int Immunol* 15 (2003), Apr, Nr. 4, S. 525–534
- [Umweltbundesamt 2009] UMWELTBUNDESAMT: Tägliche Aufnahme von Dioxin und dioxinähnlichen PCB eines Erwachsenen in Deutschland über die Nahrung. In: <http://www.umweltbundesamt.de/chemikalien/dioxine.htm> (2009)
- [Veldhoen et al. 2008] VELDHOEN, M. ; HIROTA, K. ; WESTENDORF, A. M. ; BUER, J. ; DUMOUTIER, L. ; RENAULD, J.-C. ; STOCKINGER, B.: The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. In: *Nature* 453 (2008), May, Nr. 7191, S. 106–109
- [Veldhoen et al. 2006] VELDHOEN, M. ; HOCKING, R. J. ; ATKINS, C. J. ; LOCKSLEY, R. M. ; STOCKINGER, B.: TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. In: *Immunity* 24 (2006), Feb, Nr. 2, S. 179–189
- [Vogel et al. 2008] VOGEL, C. F. A. ; GOTH, S. R. ; DONG, B. ; PESSAH, I. N. ; MATSUMURA, F.: Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Biochem Biophys Res Commun* 375 (2008), Oct, Nr. 3, S. 331–335
- [Vogel et al. 2007] VOGEL, C. F. A. ; SCIULLO, E. ; LI, W. ; WONG, P. ; LAZENNEC, G. ; MATSUMURA, F.: RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. In: *Mol Endocrinol* 21 (2007), Dec, Nr. 12, S. 2941–2955
- [Vorderstrasse und Kerkvliet 2001] VORDERSTRASSE, B. A. ; KERKVLIELT, N. I.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 171 (2001), Mar, Nr. 2, S. 117–125

- [Vorderstrasse et al. 2001] VORDERSTRASSE, B. A. ; STEPPAN, L. B. ; SILVERSTONE, A. E. ; KERKVLiet, N. I.: Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice generate normal immune responses to model antigens and are resistant to TCDD-induced immune suppression. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 171 (2001), Mar, Nr. 3, S. 157–164
- [Vos et al. 1973] VOS, J. G. ; MOORE, J. A. ; ZINKL, J. G.: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals. In: *Environ Health Perspect* 5 (1973), Sep, S. 149–162
- [Walisser et al. 2004] WALISSER, J. A. ; BUNGER, M. K. ; GLOVER, E. ; BRADFIELD, C. A.: Gestational exposure of Ahr and Arnt hypomorphs to dioxin rescues vascular development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Nov, Nr. 47, S. 16677–16682
- [Wang et al. 2002] WANG, H.-C. ; ZHOU, Q. ; DRAGOO, J. ; KLEIN, J. R.: Most murine CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes are partially but not fully activated T cells. In: *J Immunol* 169 (2002), Nov, Nr. 9, S. 4717–4722
- [Webb et al. 1989] WEBB, K. B. ; EVANS, R. G. ; KNUTSEN, A. P. ; ROODMAN, S. T. ; ROBERTS, D. W. ; SCHRAMM, W. F. ; GIBSON, B. B. ; ANDREWS, J. S. ; NEEDHAM, L. L. ; PATTERSON, D. G.: Medical evaluation of subjects with known body levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In: *J Toxicol Environ Health* 28 (1989), Nr. 2, S. 183–193
- [Weber et al. 1985] WEBER, H. ; HARRIS, M. W. ; HASEMAN, J. K. ; BIRNBAUM, L. S.: Teratogenic potency of TCDD, TCDF and TCDD-TCDF combinations in C57BL/6N mice. In: *Toxicol Lett* 26 (1985), Aug, Nr. 2-3, S. 159–167
- [Wei et al. 1998] WEI, Y. D. ; HELLEBERG, H. ; RANNUG, U. ; RANNUG, A.: Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. In: *Chem Biol Interact* 110 (1998), Mar, Nr. 1-2, S. 39–55
- [Weiner 1994] WEINER, H. L.: Oral tolerance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), Nov, Nr. 23, S. 10762–10765
- [Worbs et al. 2006] WORBS, T. ; BODE, U. ; YAN, S. ; HOFFMANN, M. W. ; HINTZEN, G. ; BERNHARDT, G. ; FÖRSTER, R. ; PABST, O.: Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. In: *J Exp Med* 203 (2006), Mar, Nr. 3, S. 519–527

-
- [Yokota et al. 2009] YOKOTA, A. ; TAKEUCHI, H. ; MAEDA, N. ; OHOKA, Y. ; KATO, C. ; SONG, S.-Y. ; IWATA, M.: GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. In: *Int Immunol* 21 (2009), Apr, Nr. 4, S. 361–377
- [Zhang et al. 2003] ZHANG, S. ; QIN, C. ; SAFE, S. H.: Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. In: *Environ Health Perspect* 111 (2003), Dec, Nr. 16, S. 1877–1882

Danksagung

Ich danke Prof. Charlotte Esser für Betreuung dieser Arbeit und die stete Erreichbarkeit bei Fragen und Problemen.

Ebenfalls danke ich Prof. Peter Proksch für die Beurteilung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich Stephanie Kadow und Markus Frericks für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Für die Hilfe bei allen Fragen des Laboralltags danke ich Ninon Schoelzel, Babette Martiensen und Swantje Steinwachs.

Danke auch an alle Mitglieder des Graduiertenkollegs 1427. Wir hatten eine tolle Zeit! Auch neben der Arbeit.

Ich möchte mich auch bei meinem Lebensgefährten für die Nahrungsversorgung während der Schreibphase und die Unterstützung bei der graphischen Gestaltung bedanken

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit “Die Bedeutung des Arylhydrocarbonrezeptors für das darmassoziierte Immunsystem” selbständig verfasst und neben den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe.