

Der Arylhydrocarbonrezeptor ist in T-Zellen notwendig für die Aufrechterhaltung der oralen Toleranz

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Daniel Biljes
aus Ostercappeln

Düsseldorf, Juli 2017

Angefertigt am Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH
in der Immunologie-Arbeitsgruppe von Professor Charlotte Esser und
eingereicht an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Frau Prof. Dr. Charlotte Esser

Korreferent: Herr Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem des Darms.....	1
1.1.1. Aufbau des Darms	2
1.1.2. Aufnahme von Antigenen vom Darmlumen ins Darmgewebe.....	3
1.2. Orale Toleranz	4
1.2.1. Mikromilieus im Darmgewebe und in den MLN führen zur Induktion einer OT.....	4
1.2.2. Mechanismen der OT	6
1.3. Der Arylhydrocarbonrezeptor.....	9
1.3.1. AhR-Expression im Körper und in Immunzellen	12
1.3.2. AhR-abhängige Toleranz-Regulation.....	13
1.4. Untersuchung der oralen Toleranz im Mausmodell.....	14
1.4.1. Mausmodell mit zellspezifischer <i>ahr</i> -Deletion.....	16
1.5. Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Materialien.....	18
2.1.1. Versuchstiere.....	18
2.1.2. Geräte.....	19
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.4. Antikörper	20
2.1.5. Primer	21
2.1.6. Puffer	22

2.1.7.	Programme	23
2.2.	Methoden	24
2.2.1.	Induktion der oralen Toleranz	24
2.2.2.	Gewinnung von Blutproben aus der submandibulären Vene.....	25
2.2.3.	Isolation von Immunzellen aus der Milz.....	26
2.2.4.	Aufreinigung von Lymphzellen aus den mesenterialen Lymphknoten	26
2.2.5.	Präparation des Dünndarms.....	26
2.2.6.	Auftrennung von der intestinalen Epithelschicht und Lamina propria.....	27
2.2.7.	Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung von Immunzellen.....	27
2.2.8.	Oberflächenfärbung der gewonnenen Immunzellen.....	28
2.2.9.	<i>in vitro</i> Stimulation und intrazelluläre Färbung	29
2.2.10.	Analyse der Immunzellen am Durchflusszytometer.....	29
2.2.11.	<i>ex vivo</i> Kultivierung von Dünndarmabschnitten	31
2.2.12.	RNS-Isolation aus Gewebe und Zellen.....	32
2.2.13.	cDNS-Synthese und semi-quantitative-Polymerasekettenreaktion	32
2.2.14.	Behandlung von Mäusen mit TCDD	33
2.2.15.	Orale Toleranz unter AhR-ligandenfreier Nahrung.....	35
2.2.16.	OVA-spezifischer-IgG1 ELISA	37
2.2.17.	Stimulation von T-Zellen aus der Milz von AhR-Ko	38
2.2.18.	Statistik.....	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1.	Etablierung eines Protokolls für eine stabile orale Toleranz	40
3.1.1.	Eine hohe Antigenosis führt zu einer stabilen oralen Toleranz.....	40
3.1.2.	Eine mittlere oder geringe Antigenosis induziert keine stabile OT.....	41
3.2.	TCDD-Belastung verursacht eine Destabilisierung der OT	44
3.3.	AhR-ligandenfreie Diät verändert die Stabilität der OT nicht.....	46
3.4.	Auswirkungen einer systemischen AhR-Defizienz.....	49
3.4.1.	Untersuchung von naiven AhR-Ko Tieren.....	49

3.4.1.1.	Die Frequenz OT relevanter $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmepithel oder den CD103 DCs in der Lamina Propria wird durch AhR-Defizienz verändert	49
3.4.1.2.	KGF und Teile dessen Signalweges werden nicht unterschiedlich in AhR-Ko Dünndarmgewebe exprimiert.....	53
3.4.1.3.	<i>ex vivo</i> GM-CSF Produktion der verschiedenen Darmabschnitte zeigt keinen Unterschied zwischen AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern	55
3.4.1.4.	Genexpressionsanalyse von Zytokinen im Dünndarmgewebe.....	56
3.4.1.5.	T-Zellen werden durch AhR-Defizienz nur gering beeinflusst.....	58
3.4.2.	systemische AhR-Defizienz führt zu einer instabilen OT	59
3.4.2.1.	DCs und CD103 DCs sind am Ende eines OT-Versuch nur noch tendenziell in AhR-Ko Mäusen erhöht	61
3.4.2.2.	Treg und Th17 Zellen sind am Ende eines OT-Versuches im AhR-Ko verringert.....	62
3.4.2.3.	Bei AhR-Ko Mäusen führt der OT-Versuch zur Erhöhung der Frequenz von DCs und Th17 Zellen, aber nicht von Treg.....	63
3.5.	Analyse der oralen Toleranz bei zellspezifischer <i>ahr</i> -Deletion.....	65
3.5.1.	Nachweis der AhR-Defizienz bei AhR ^{ΔVillin} Mäusen.....	65
3.5.1.2.	OT-Versuch mit AhR ^{fllox} x Villin ^{Cre} Tieren	66
3.5.2.	Nachweis der AhR-Defizienz bei AhR ^{ΔCD11c} Tieren.....	67
3.5.2.1.	OT-Versuch mit AhR ^{fllox} x CD11c ^{Cre} Tieren	69
3.5.3.	Nachweis der AhR-Defizienz bei AhR ^{ΔLck} Tieren.....	71
3.5.3.2.	OT-Versuch mit AhR ^{fllox} x Lck ^{Cre} Tieren	73
3.5.4.	Zusammenfassung über OT-Versuche mit zellspezifischer <i>ahr</i> -Deletion.....	74
3.6.	Stimulation von AhR-defizienten T-Zellen.....	75
4.	Diskussion	78
4.1.	Eine systemische oder T-Zell-spezifische AhR-Defizienz führt zu einer instabilen OT	78
4.1.1.	Induktion und Stabilität der OT wird nicht von AhR-Defizienz im Darmepithel, DCs oder einer AhR-ligandenfreien Diät beeinflusst.....	82
4.2.	TCDD verursacht Destabilisierung der OT, aber gleichzeitig eine Immunsuppression	83

4.3.	Die Analyse der oralen Toleranz im Mausmodell.....	85
4.3.1.	Modelle der OT sind nur Annäherungen an die natürliche Situation.....	85
4.3.2.	Beim OT-Modell wird keine Lebensmittelallergie ausgelöst	86
4.4.	Reduzierte Antikörperproduktion bei verändertem AhR-Signalweg?	87
5.	Referenzen	90
6.	Anhang	99
7.	Danksagung	109
8.	Erklärung	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Induktion von oraler Toleranz durch das Mikromilieu im Darm und MLN	7
Abbildung 1-2	AhR-Signalweg	10
Abbildung 2-1	Zeitlicher Ablauf für Toleranzinduktion und Immunisierung	24
Abbildung 2-2	Schema einer Gradientenzentrifugation.....	28
Abbildung 2-3	Zell-Auswahl-Strategie (<i>gating strategy</i>) einer durchflusszytometrischen Messung.....	30
Abbildung 2-4	Zeitlicher Ablauf eines OT-Versuchs mit TCDD-Behandlung.....	34
Abbildung 2-5	Futtermittel für die Diätstudie.....	36
Abbildung 2-6	Zeitschema der OT-Induktion unter AhR-ligandenfreier Diät.....	36
Abbildung 3-1	OVA-gefütterte Tiere zeigen eine stabile orale Toleranz	41
Abbildung 3-2	Fütterung einer mittleren oder geringen Antigenosis führt zu einer instabilen OT	42
Abbildung 3-3	TCDD-Behandlung destabilisiert OT und führt gleichzeitig zur Immunsuppression.....	45
Abbildung 3-4	ALFD beeinflusst die Genexpression von <i>cyp1a1</i> und <i>ahr</i>	47
Abbildung 3-5	OT wird durch fehlende AhR-Liganden in der Nahrung nicht beeinflusst	48
Abbildung 3-6	AhR-Defizienz führt zur Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen in der IEL-Fraktion	50
Abbildung 3-7	Bestimmung der Zellanzahl von CD103 DCs in LP und MLN bei AhR-Wt und AhR-Ko	51
Abbildung 3-8	Erhöhung der CD103 DC-Anzahl in der LP von AhR-Ko Mäusen.....	52
Abbildung 3-9	Expression von <i>kgf</i> und <i>fgfr2IIIB</i> ist durch AhR-Defizienz nicht verändert.. ..	53
Abbildung 3-10	<i>gm-csf</i> Expression wird durch AhR-Defizienz nicht beeinflusst	54
Abbildung 3-11	GM-CSF Sezernierung in <i>ex vivo</i> Kultur zeigt keinen Unterschied bei AhR-Defizienz.....	55
Abbildung 3-12	Gendeletion des AhR führt zur Änderung der Zytokin-Genexpression	56
Abbildung 3-13	AhR-Defizienz verändert weder die Treg noch die Th17 Zellanzahl in LP und MLN	58
Abbildung 3-14	AhR-Ko Mäuse zeigen eine destabilisierte orale Toleranz.....	60
Abbildung 3-15	Verteilung der DCs und CD103 DCs am Ende eines OT-Experimentes bei AhR-Ko Tieren	61
Abbildung 3-16	Analyse von T-Zellen am Ende des OT-Versuchs bei AhR-Ko	63
Abbildung 3-17	Nur AhR ^{ΔVillin} Tiere zeigen eine zellspezifische <i>ahr</i> -Deletion in IECs.	66
Abbildung 3-18	Keine Destabilisierung der OT in AhR ^{ΔVillin} Mäusen.....	67

Abbildung 3-19	CD11c-sortierte Zellen von AhR ^{ΔCD11c} Mäusen zeigen nur partielle Rekombination.....	68
Abbildung 3-20	AhR ^{flox} x CD11c ^{Cre} Tiere zeigen keinen Unterschied in der OT	70
Abbildung 3-21	In AhR ^{ΔLck} Tieren sind T-Zellen AhR-defizient.....	71
Abbildung 3-22	γδ T-Zellen in AhR ^{flox} x Lck ^{Cre} Tieren.....	72
Abbildung 3-23	Zellspezifische AhR-Deletion in T-Zellen führt zur Destabilisierung der OT	73
Abbildung 3-24	CD4 und CD8 Zellanzahl bei <i>in vitro</i> Stimulation	76
Abbildung 3-25	Zellanalyse per Durchflusszytometer von der <i>in vitro</i> T-Zell-Stimulation für CD4 Zellen.....	76
Abbildung 3-26	Expression von Aktivierungsmarkern, FoxP3 und IL17a bei T-Zell Stimulation.....	77
Abbildung 4-1	AhR-Deletion in Immunzellen führt zu einer tendenziell geringeren Antikörperproduktion.....	88
Abbildung 6-1	CD8a Zellen am Ende eines OT-Versuches in LP und MLN	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der drei Fütterungsprotokolle	43
Tabelle 6-1 zu Abbildung 3-1	99
Tabelle 6-2 zu Abbildung 3-2	99
Tabelle 6-3 zu Abbildung 3-3	99
Tabelle 6-4 zu Abbildung 3-4	100
Tabelle 6-5 zu Abbildung 3-5	100
Tabelle 6-6 zu Abbildung 3-6	100
Tabelle 6-7 zu Abbildung 3-8	101
Tabelle 6-8 zu Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10	101
Tabelle 6-9 zu Abbildung 3-11	101
Tabelle 6-10 zu Abbildung 3-12	102
Tabelle 6-11 zu Abbildung 3-13	102
Tabelle 6-12 zu Abbildung 3-14	102
Tabelle 6-13 zu Abbildung 3-15	103
Tabelle 6-14 zu Abbildung 3-16	104
Tabelle 6-15 zu Abbildung 3-18	105
Tabelle 6-16 zu Abbildung 3-20	105
Tabelle 6-17 zu Abbildung 3-22-A	105
Tabelle 6-18 zu Abbildung 3-23	106
Tabelle 6-19 zu Abbildung 3-24	106
Tabelle 6-20 zu Abbildung 3-26	107
Tabelle 6-21 zu Abbildung 4.1	108
Tabelle 6-22 zu Abbildung 6-1	108

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AhR-Ko	AhR <i>full knockout</i>
AhR-Wt	AhR wildtyp (Wurfgeschwister von AhR-Ko Mäusen)
ALFD	AhR-ligandenfreie Diät
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNS	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CFA	komplettes Freund's Adjuvans
DCs	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Du	Duodenum
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.g.	intrastral, in den Magen
i.p.	intraperitoneal, in den Bauchraum
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
IL	Ileum oder Interleukin
ILF	isolierte lymphatische Follikel
Je	Jejunum
kg	Kilogramm
Ko	<i>Knockout</i>
Lck	<i>Lymphocyte specific protein tyrosine kinase</i>
LP	Lamina propria
mg	Milligramm
MHCII	<i>Major histocompatibility complex II</i>
mL	Milliliter
MLN	mesenteriale Lymphknoten
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ND	normale Diät
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte

OVA	Ovalbumin, Albumin des Hühnereiweißes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
qPCR	quantitative Polykettenreaktion
RA	Retinsäure (<i>Retinoic acid</i>)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor β
TMB	3, 3', 5, 5' - Tetramethyl-Benzidine
Wt	Wildtyp
μg	Mikrogramm

Zusammenfassung

Orale Toleranz (OT) bezeichnet das Ausbleiben einer systemischen Immunreaktion auf ein Antigen. Für die Induktion der OT muss der Erstkontakt mit dem Antigen über die Nahrung erfolgen, also über den Gastrointestinaltrakt. Die Immunzellen des *gut associated lymphoid tissue* (GALT) induzieren und erhalten die OT einerseits gegenüber den Antigenen aus der Nahrung, aber können andererseits mit einer Immunantwort auf infektiöse Organismen und Toxine reagieren. Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) wird in Darmepithelzellen und ebenfalls in vielen Darmimmunzellen, die an der Induktion der OT beteiligt sind, exprimiert. Als Sensor für niedermolekulare Substanzen beeinflusst der AhR die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Funktion von Immunzellen. Ein Zusammenhang zwischen AhR und OT wurde im Mausmodell gezeigt, denn die Aktivierung des AhR durch das Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) durchbricht eine induzierte OT.

Die Hauptfragestellung dieser Dissertation war, wie sich eine AhR-Deletion auf die Induktion bzw. Aufrechterhaltung der OT auswirkt und welche Zellpopulation dafür verantwortlich ist. In Mäusen mit systemischer *ahr*-Deletion (AhR-Ko) wurde eine experimentelle OT ausgelöst und diese auf Induktion und Stabilität getestet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass bei AhR-Ko Mäusen eine OT induziert werden kann, diese aber im Vergleich zur Kontrolle durch Immunisierungen destabilisiert wird. Um bestimmen zu können, in welcher Zellpopulation der AhR für eine stabile OT notwendig ist, wurden Mäuse mit zellspezifischer *ahr*-Deletion verwendet. Die untersuchten Zellpopulationen wurden aufgrund ihrer Beteiligung an der OT und weil sie den AhR exprimieren ausgewählt. Deswegen wurden Mäuse mit einer *ahr*-Deletion in den intestinalen Epithelzellen (AhR^{ΔVillin}), den dendritischen Zellen (AhR^{ΔCD11c}) oder den T-Zellen (AhR^{ΔLck}) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass für die Aufrechterhaltung der OT der AhR in T-Zellen notwendig ist. Bei dem verwendeten Protokoll für die experimentelle OT zeigte die *ahr*-Deletion in den intestinalen Epithelzellen oder den dendritischen Zellen keine Auswirkung auf die OT.

Weiterhin wurde geklärt, ob AhR-Liganden aus der Nahrung einen Einfluss auf die OT haben. Durch die Gabe einer AhR-ligandenfreien Diät wurde aber keine destabilisierte oder schlechter induzierte OT nachgewiesen.

Durch die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit wurde das Phänomen der OT in einem Teilbereich besser verstanden. Die OT ist ein vielversprechender Mechanismus, um Immunerkrankungen zu behandeln, wie z.B. die orale Immuntherapie bei Allergien verdeutlicht. Denn eine ungewollte systemische Immunantwort gegen Allergene oder Autoantigene kann mit Hilfe der Toleranzinduktion durch die Nahrung gemindert oder unterdrückt werden.

Summary

Oral tolerance (OT) is the absence of a systemic immune response to an antigen. For induction of OT, the first contact with the antigen must take place via food, means through the gastrointestinal tract. The immune cells of the gut associated lymphoid tissue (GALT) induce and maintain the OT against the antigens from the food, but can react with an immune response to infectious organisms and toxins. The arylhydrocarbon receptor (AhR) is expressed in epithelial cells of the intestine and also in many intestinal immune cells, which are involved in the induction of OT. As a sensor for low molecular mass chemicals, the AhR influences cell proliferation, cell differentiation and the function of immune cells. A relationship between AhR and OT was shown in a mouse model. The activation of the AhR by the dioxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) destabilized an induced OT.

The question of this dissertation was how an AhR-deletion affects the induction or maintenance of OT. Also, the responsible cell population for the observed effects was analysed. In mice with systemic *ahr* deletion (AhR-Ko), an experimental OT was induced and tested for induction and maintenance. It was shown that, OT can be induced in AhR-Ko mice, but is destabilized after immunization in comparison to control mice. To determine the responsible cell population, mice with cell specific *ahr* deletion were used. Cell populations, which are involved in OT and expressing AhR, were chosen. For this purpose, mice with an *ahr* deletion in the intestinal epithelial cells (AhR^{ΔVillin}), the dendritic cells (AhR^{ΔCD11c}) or the T-cells (AhR^{ΔLck}) were examined. The new findings are, that AhR in T-cells is necessary for maintaining the OT. The *ahr* deletion in intestinal epithelial cells or dendritic cells did not affect OT with the used protocol for experimental OT.

Furthermore, the influence of AhR ligands in the diet to OT was studied. However, by feeding an AhR-ligand-free diet, no destabilized or poorly induced OT was detected.

The findings of this study can help to better understand the phenomenon of OT and to improve therapies for immune diseases. The systemic immune response against both, allergens and autoantigens, can be prevented or reduced by the tolerance induction via the gastrointestinal tract. OT is a promising mechanism for treating diseases like allergies by oral immunotherapy.

1. Einleitung

Das Immunsystem eines Organismus begrenzt sich nicht auf ein Organ oder nur einige wenige Gewebe im Körper, sondern es bildet über den gesamten Organismus verteilt ein sehr komplexes System aus vielen verschiedenen Zellarten und lymphatischen Organen. Diese stehen miteinander in Kommunikation und auch gegenseitiger Regulation. Pathogene und toxische Proteine werden zum Schutz des Organismus vom Immunsystem eliminiert. Doch gleichzeitig werden kommensale Bakterien, Nahrungsantigene und noch viele weitere körperfremde Stoffe von demselben Immunsystem toleriert. Die Eigenschaft des Immunsystems, keine Abwehrreaktion gegen Nahrung bzw. die Nahrungsproteine auszulösen, wird als orale Toleranz bezeichnet (Weiner et al., 2011).

Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) wird von vielen Immunzellen exprimiert und dient insbesondere in Grenzflächenorganen wie dem Darm als xenobiotischer Sensor. Als Transkriptionsfaktor verändert er die Reaktionen der Zelle und vermag so, die komplexen Regulationswege des Immunsystems zu beeinflussen (Esser & Rannug, 2015). Inwieweit der AhR einen Einfluss auf die orale Toleranz hat und auf welche Zellen dies zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht.

1.1. Das Immunsystem des Darms

Das Immunsystem von Barriere-Organen wie dem Darm, ist vor eine besondere Herausforderung gestellt. Es soll den Körper vor eindringenden Pathogenen schützen, aber nicht gegen harmlose Antigene reagieren, die durchgehend aus der Umwelt auf die Barriere einwirken. Das Darmimmunsystem ist für die Induktion der oralen Toleranz notwendig und wird deswegen im Weiteren genauer beschrieben.

Beim Immunsystem von Säugetieren haben sich unterschiedliche Mechanismen entwickelt, die in das angeborene und adaptive Immunsystem unterteilt werden (Flajnik & Kasahara, 2010). Mikroorganismen, die in den Körper eingedrungen sind, werden zuerst vom angeborenen Immunsystem direkt bekämpft. Dabei werden konservierte Erkennungsmuster der Pathogene genutzt (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, PAMPs) und es tritt bei erfolgreicher Eliminierung keine Entzündungsreaktion auf (Schütt & Bröker, 2011, Seite 64).

Bei Nahrungsmittelantigenen kommen solche PAMPs nicht vor, weshalb die orale Toleranz unabhängig vom angeborenen Immunsystem entsteht. In dieser Arbeit wird die Toleranz gegen Nahrungsmittelantigene untersucht, die durch das adaptive Immunsystem vermittelt wird, weswegen nur noch dessen Funktionen im Weiteren betrachtet werden.

1.1.1. Aufbau des Darms

Der Darm beginnt direkt am Ausgang des Magens und wird in Dünndarm und Dickdarm unterschieden. Der Dünndarm wird dabei weiter in die drei Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt. Auf der gesamten Länge ist die zelluläre Abgrenzung zum Darmlumen aus einem nur einschichtigen Epithel aufgebaut, welches zum Schutz durch eine Mukusschicht bedeckt ist. Unter dieser Epithelschicht liegt die Lamina propria, ein Bindegewebe, welches Raum für Nerven, Blut- und Lymphgefäße bildet und auch viele Immunzellen beherbergt (Mowat & Agace, 2014).

Dabei stellt das Darmgewebe aufgrund der vielen Falten, Villi und Mikrovilli die größte Oberfläche des Körpers zur Außenwelt dar. Es umfasst beim Menschen eine Fläche von 200-300m², im Vergleich zu den kleineren Oberflächen der Lunge (ca. 70m²) oder die der Haut (ca. 1,5-2m²) (Faria & Weiner, 2005; Notter, 2000, S.120; Schütt & Bröker, 2011, S.107).

Die große Fläche des Darmgewebes ist notwendig, um die Nährstoffe aus der Nahrung aufzunehmen. Aufgrund des einschichtigen Epithels besitzt dieses Gewebe die dafür nötige Permeabilität. Allerdings bietet diese große Fläche auch eine Möglichkeit für Pathogene in den Körper einzudringen. Die Eigenschaft, eine große Permeabilität für Nahrung, aber gleichzeitig einen ausreichenden Schutz gegen Pathogene zu bieten, wird durch ein besonders komplexes Immunsystem erreicht. Entsprechend ist der Großteil der Immunzellen im Körper mit dem Darm assoziiert (Mowat & Agace, 2014).

Das Immunsystem des Darms kann in Induktiv- und Effektorgewebe unterteilt werden. Dem Induktivgewebe entspricht das darmassoziierte lymphatische Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT), welches aus den Peyer'schen Plaques (PP), den isolierten lymphatischen Follikeln (ILFs) und dem Appendix besteht (Brandtzaeg et al., 2008).

Zu den Effektorgeweben gehört die Lamina propria (LP) und auch das einschichtige Darmepithel bzw. die darin eingelagerten Immunzellen (intraepithelialen Lymphozyten, IELs). Die IELs und die LP liegen morphologisch eng beieinander, stellen aber zwei unterschiedliche immunologische Kompartimente dar. Darüber hinaus besitzen sie auch induktive Eigenschaften, weshalb sie besonders interessant sind. Die mesenterialen Lymphknoten (MLN) stellen die Verbindung des Darmimmunsystems zum restlichen Körper dar, werden aber nach der Terminologie von Brandtzaeg (2008) nicht zum GALT gezählt (Brandtzaeg et al., 2008; Mowat & Agace, 2014).

Zwischen Dünndarm und Dickdarm bestehen klare funktionelle Unterschiede. Der Dickdarm besitzt eine viel dickere Mukusschicht und beherbergt deutlich mehr Bakterien, die unverdaute Nahrung weiter aufspalten und dem Körper zur Verfügung stellen. Im Dickdarm ist die lokale Toleranz gegen Bakterien wichtiger als die gegen Nahrungsmittel (Mowat & Agace, 2014). Der Dünndarm hingegen enthält wichtige Kompartimente des GALTs, die LP

und die IELs, welche notwendig für die Induktion einer oralen Toleranz sind. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit ein besonderer Schwerpunkt auf die Immunzellen des Dünndarms gelegt, wobei seine Kompartimente (IEL, LP, PP) bei Zellanalysen bzw. seine drei Abschnitte bei Genexpressionsanalysen einzeln betrachtet wurden. Der Dünndarm verändert seiner Länge nach seine Morphologie und Funktion. So findet im Duodenum und Jejunum eine stärkere Sezernierung von Verdauungsenzymen und Aufnahme von Nährstoffen statt. Diese Funktion ist im Ileum deutlich reduziert, wofür aber die Anzahl der PPs in diesem Abschnitt erhöht ist (Mowat & Agace, 2014).

1.1.2. Aufnahme von Antigenen vom Darmlumen ins Darmgewebe

Das Darmgewebe ist einer Vielzahl von verschiedenen Antigenen ausgesetzt. Zum einen den Bestandteilen der Nahrung, die nicht nur lokal im Darm, sondern auch im gesamten Körper keine Immunreaktion auslösen und zum anderen beherbergt der Darm eine große Menge an Bakterien, Hefen oder sogar Würmer. Kommensale Bakterien sind für eine gesunde Verdauung notwendig und verhindern durch Verdrängung die Besiedlung von möglicherweise pathogenen Keimen (Mowat & Agace, 2014). Aber die Toleranz gegen die kommensalen Bakterien bezieht sich nur lokal auf den Darm. Dementsprechend entstehen im Darmgewebe zwei verschiedene Toleranzen. Einerseits eine lokale, die mikrobielle Antigene toleriert und andererseits eine systemische, die Nahrungsantigene umfasst und als orale Toleranz beschrieben wird (Pabst & Mowat, 2012).

Der Großteil der Nahrungsproteine wird bis hin zu den kleinsten Bausteinen, den Aminosäuren oder Di- und Tripeptide, verdaut, bevor diese dann vom Darmepithel aufgenommen werden. Aber einige Proteine sind nahezu unverdaut im Darmlumen vorhanden z.B. aufgrund einer Säureunempfindlichkeit oder Pepsinresistenz. Solche Proteine können eine Immunreaktion auslösen, wie z.B. β -Lactoglobulin aus Kuhmilch (Ménard et al., 2010).

Der Transport vom Darmlumen durch das Epithel kann als parazelluläre Diffusion oder durch einen transzellulären Transport stattfinden, wodurch Immunzellen, die unterhalb der Epithelzellen liegen, die Antigene aufnehmen und eine Toleranz auslösen können (Ménard et al., 2010).

In den PPs und ILFs befinden sich besondere Zellen im Epithel, die auf der zum Darmlumen gerichteten (apikalen) Seite eine mikrogefaltete bis glatte Membran anstatt Mikrovilli aufweisen. Diese M-Zellen besitzen Einstülpungen auf der zur LP gerichteten (basolateralen) Seite, wo sie mit Immunzellen, wie z.B. dendritischen Zellen, interagieren (Owen & Jones, 1974). Die M-Zellen nehmen Bestandteile aus dem Darmlumen auf und geben sie nach transzellulärem Transport an die angelagerten Immunzellen weiter. Diese

Bestandteile können nicht nur Nahrungsantigene, sondern auch Mikroorganismen sein (Mabbott et al., 2013).

In die LP gelangen größere Antigene aus dem Darmlumen durch einen transzellulären Transport der Epithelzellen in das Gewebe, wohingegen kleinere, inaktive Moleküle auch parazellulär das Epithel durchqueren können. Beim transzellulären Transport werden die Antigene entweder unverändert an Immunzellen weitergegeben oder erst in Exosomen prozessiert und schon in den Epithelzellen auf MHCII Komplexe geladen, bevor die Immunzellen diese aufnehmen (Ménard et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass die PPs nicht notwendig sind, um eine orale Toleranz auszulösen (Kraus et al., 2005; Spahn et al., 2001) und in der Literatur wird vermutet, dass die Antigenaufnahme im GALT hauptsächlich zu der lokalen Toleranz gegen die kommensale Mikrobiota führt (Pabst & Mowat, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung der oralen Toleranz die PPs dementsprechend nicht weiter betrachtet. Es wurde ein Schwerpunkt auf Immunzellen in den MLN und der LP, also den IELs, gelegt.

1.2. Orale Toleranz

Aufgenommene Nahrungsantigene, die durch den Darm in den Körper gelangen, werden vom Immunsystem toleriert, sodass keine Immunreaktion gegen diese Antigene induziert wird. Dieses nicht Auslösen einer Immunreaktion betrifft sowohl lokal das Darmgewebe, als auch systemisch den ganzen Körper. Dieses Phänomen wird als orale Toleranz (OT) bezeichnet und stellt eine Besonderheit des Immunsystems des Darms dar (Weiner et al., 2011).

Ein wichtiger Faktor der Toleranz von oral aufgenommenem Antigen ist, dass im Darmgewebe ein antiinflammatorisches Milieu vorherrscht, wodurch die Immunzellen auf eine besondere Art geprägt werden.

1.2.1. Mikromilieus im Darmgewebe und in den MLN führen zur Induktion einer OT

Das umgebende Milieu eines Gewebes spielt eine entscheidende Rolle bei der Antigenaufnahme von dendritischen Zellen (DCs) und auch bei der Antigenpräsentation für T-Zellen. Im Darmgewebe und in den MLN liegt ein Milieu vor, welches vorwiegend entzündungshemmende Zytokine aufweist, was in der Abbildung 1-1 als Übersicht dargestellt wird (Weiner et al., 2011).

Die im Darmepithel liegenden $\gamma\delta$ T-Zellen sezernieren den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF), der auf die intestinalen Epithelzellen (IECs) proliferationsfördernd wirkt, wodurch die Integrität der Barriere gestärkt wird (Yaping Chen et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass KGF die Produktion des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) bei Lungenepithelzellen fördert (Wu et al., 2011) und dass Stromazellen des Darms GM-CSF sezernieren (Vicente-Suarez et al., 2015).

GM-CSF wiederum beeinflusst die Ausbildung des Phänotyps von DCs und induziert die Produktion der entzündungshemmenden Retinsäure in diesen Zellen (Vicente-Suarez et al., 2015; Yokota et al., 2009).

Es gibt vielerlei Subgruppen von DCs, die unterschiedliche Funktionen haben können, z.B. bezüglich ihrer Tolerogenität (Banchereau et al., 2000; Denning et al., 2011). DC-Subgruppen werden durch ihre unterschiedlichen Oberflächenmoleküle wie CD11b, CD11c, MHCII-Expressionsstärke oder CD103 charakterisiert. Im Darm üben CD103 DCs besondere Funktionen aus, wie im Folgenden beschrieben wird.

CD103 ist ein α -Integrin, welches unter anderem an E-cadherin auf der Oberfläche von Epithelzellen bindet. Eine genauere Funktion ist aber noch nicht bekannt (Scott et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass CD103 DCs entscheidend für die Induktion einer OT sind. Zum einen nehmen sie Antigene direkt von Epithelzellen aber auch von besonderen CX3CR1 Makrophagen auf (Mazzini et al., 2014) und zum anderen produzieren sie Retinsäure. Sie können von der LP in die MLN wandern (vgl. Abbildung 1-1, gepunkteter Pfeil), wo sie effektiv die Antigene präsentieren und T-Zellen stimulieren (Cerovic et al., 2013).

Neben Retinsäure sezernieren CD103 DCs auch TGF β . Diese beiden Moleküle induzieren zusammen die Differenzierung von naiven T-Zellen hin zu regulatorischen T-Zellen (Treg) im MLN (Coombes et al., 2007). Zusätzlich wirkt Retinsäure bei schon ausdifferenzierten Treg förderlich auf deren supprimierende Funktion (Menning et al., 2010) und Retinsäure ist entscheidend für eine TGF β abhängige T-Zellstimulation. Denn ohne Retinsäure induziert TGF β zusammen mit IL6 die inflammatorischen Th17 Zellen (Mucida et al., 2007). Dementsprechend bestimmt das Mikromilieu im MLN, ob supprimierende oder entzündliche T-Zellen gebildet werden. Die im Darm generierten CD103 DCs tragen stark zu diesem Milieu bei und können daher die Induktion einer OT beeinflussen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ohne MLN eine OT Induktion nicht möglich ist (Worbs et al., 2006).

Bei naiven T-Zellen im MLN regt Retinsäure auch die Expression des Chemokinrezeptors CCR9 und von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin an (Iwata et al., 2004). Durch CCR9 und $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf der Oberfläche der T-Zellen werden diese nach dem Auswandern aus dem MLN in das Gewebe des Darms geleitet (*homing*). Weil das Antigen, welches die DCs im MLN präsentierten, ursprünglich im Darmgewebe vorkam, wird durch das *homing* die Chance erhöht, dass die T-Zellen wieder auf das gleiche Antigen treffen und sie ihre Funktion erfüllen können (Johansson-Lindbom & Agace, 2007).

Wenn im MLN naive T-Zellen zu Treg ausdifferenziert sind und sie aufgrund ihrer *homing*-Faktoren ins Darmgewebe einwandern, können sie dort eine Immunreaktion gegen ihr spezifisches Antigen supprimieren. Die Aufrechterhaltung der Treg Funktion ist dabei abhängig von IL10, welches unter anderem von CX3CR1 Makrophagen sezerniert wird (vgl. Abbildung 1-1, brauner Pfeil) (Hadis et al., 2011).

Zusätzlich zum Darm sind die antigenspezifischen Treg 5-7 Tage nach ihrer Entstehung auch in der Milz nachweisbar. Durch die Auswanderung vom Darm in andere Bereiche des Körpers wird die Toleranz systemisch (Schütt & Bröker, 2011, S. 110). Eine weitere Möglichkeit für die Induktion der systemischen Toleranz stellt die Leber dar. Kurz nach der Nahrungsaufnahme sind die Nahrungsantigene schon im Blut nachweisbar, wobei sie vom Darm kommend, zuerst die Leber passieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Antigeninjektion direkt in die Lebervene zu einer antigenspezifischen Toleranz führt (Pabst & Mowat, 2012; Thomson & Knolle, 2010).

1.2.2. Mechanismen der OT

Bei der Induktion von OT kommt neben der Entstehung von Treg (vgl. Kapitel 1.2.1) noch ein weiterer Mechanismus zum Tragen: die Anergie bzw. Deletion von T-Zellen. Dieser Mechanismus wurde bei der Erforschung der OT schon sehr früh gezeigt (Y Chen et al., 1995; Friedman & Weiner, 1994), aber in der Literatur wird bis heute diskutiert, wie wichtig Treg auf der einen Seite oder Anergie/Deletion auf der anderen Seite für die OT sind (a M. Faria et al., 1998; Pabst & Mowat, 2012). Im Folgenden wird dieser Aspekt genauer beschrieben.

Die Bedeutung von Treg für die Induktion einer OT zeigt sich darin, dass das Darmgewebe, die MLN und CD103 DCs großes Potenzial darin besitzen, Treg zu generieren. Außerdem ist die Induktion einer OT nicht mehr möglich, wenn diese Treg bildenden Komponenten (CD103 DCs oder MLN) fehlen (Pabst & Mowat, 2012).

In Experimenten zur Untersuchung der OT haben Friedman und Weiner 1994 gezeigt, dass die beiden Mechanismen in Zusammenhang mit der verabreichten Dosis stehen. Sie konnten zeigen, dass eine hohe Dosis (1x20mg HEL, Hühnerei Lysozym) zu Anergie bzw. Deletion von T-Zellen führt und eine niedrige Dosis (5x1mg HEL über 10 Tage) eher zur Bildung von regulatorischen T-Zellen. Sie zeigten, dass beide Protokolle eine OT induzieren, aber dass bei einer niedrigen Dosis mehr Zellen mit supprimierenden Eigenschaften generiert werden. Hingegen war es nach einer hohen Dosis möglich, die Proliferations-Blockade der Lymphknotenzellen durch eine IL2-Inkubation aufzuheben. Dies ist charakteristisch für in Anergie versetzte T-Zellen (Friedman & Weiner, 1994).

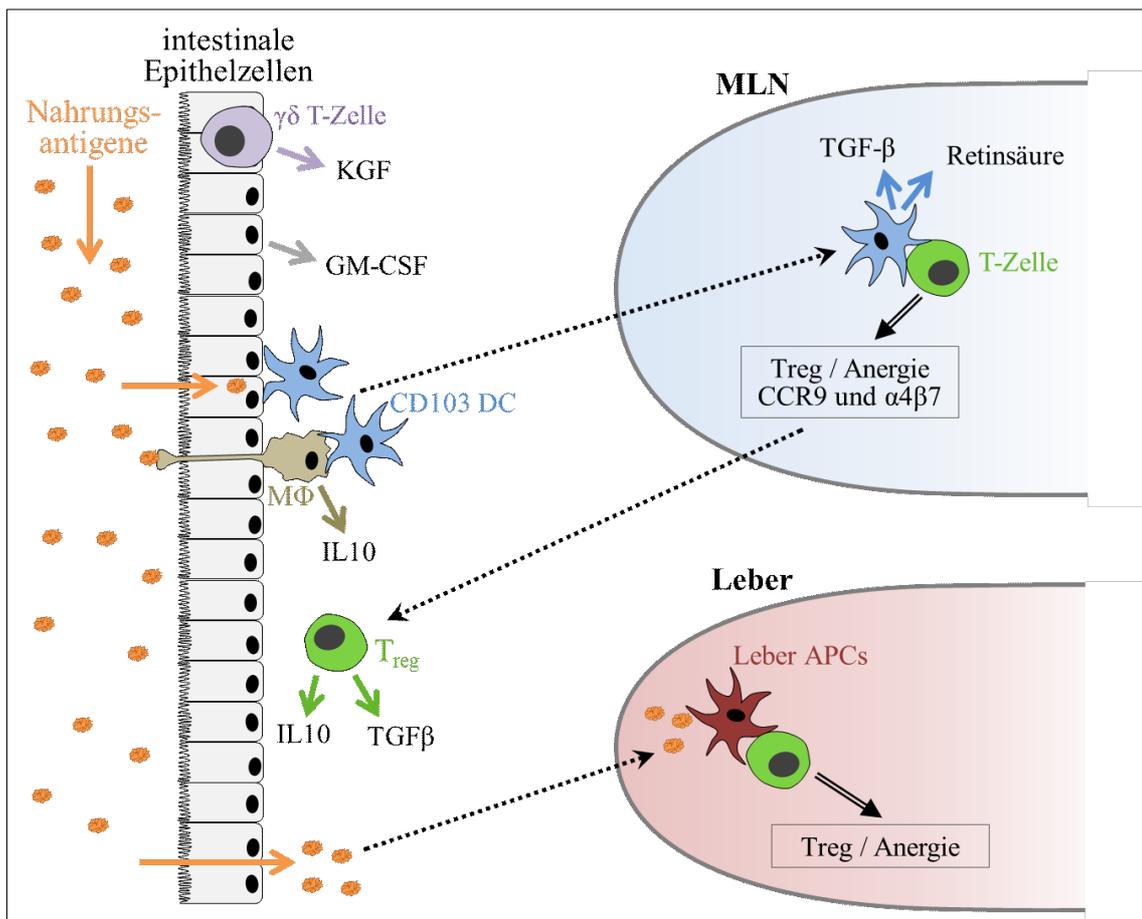


Abbildung 1-1 Induktion von oraler Toleranz durch das Mikromilieu im Darm und MLN

Nahrungsantigene passieren die intestinale Epithelschicht para- oder transzellulär (orange Pfeile) und werden von Epithelzellen bzw. CX3CR1 Makrophagen (MΦ) an CD103 DCs weitergegeben. Diese DCs wandern in die ableitenden mesenterialen Lymphknoten (MLN) (gepunkteter Pfeil), wo die Antigenen naiven T-Zellen präsentiert werden. Aufgrund der im Darmgewebe stattfindenden GM-CSF Stimulation produzieren CD103 DCs im MLN Retinsäure und TGFβ. Dieses Milieu führt zur Ausdifferenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) (Doppelpfeil) und induziert bei ihnen die Expression der *homing*-Faktoren CCR9 und α4β7. Im Darm supprimieren die Treg andere Effektorzellen durch IL10 und TGFβ. Vom Darm kommende Antigenen gelangen in die Leber. Dort nehmen verschiedene Leber APCs (Antigen präsentierende Zellen) diese auf und präsentieren sie T-Zellen, die sich zu Treg differenzieren oder in Anergie versetzt werden. Die jeweiligen Referenzen sind im Text angegeben.

Der Mechanismus der T-Zell-Deletion ist aus der Induktion der zentralen Toleranz im Thymus bekannt, wo autoreaktive T-Zellen deletiert werden (Schütt & Bröker, 2011, Seite 101). Dieser Mechanismus ist aber nicht auf Autoantigene beschränkt, denn auch bei der Injektion eines körperfremden Antigens kommt es zur Apoptose der antigenspezifischen T-Zellen (Murphy et al., 1990).

In der peripheren Toleranz spielt der Mechanismus der Anergie hingegen eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass T-Zellen nach einer T-Zell-Rezeptor-Stimulation ohne zugehörige Co-Stimulation inaktiviert werden. In diesem Zustand reagieren sie auch bei einem vollständigen Stimulus nicht mehr mit Proliferation (Schwartz, 2003).

Anergie und suppressive Funktionen von T-Zellen sind nicht zwingend getrennt. So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen mit einem der Anergie entsprechenden Expressionsprofil trotzdem supprimierende Eigenschaften besitzen (Tsuji et al., 2003). Weiterhin geht man heute vielmehr davon aus, dass die beiden Mechanismen nicht für die jeweiligen Dosen exklusiv sind, sondern vielmehr nebeneinander auftreten und so gemeinsam den Effekt der oralen Toleranz bilden (Faria & Weiner, 2005).

Ein gutes Indiz dafür ist, dass *in vitro* stimulierte Milzzellen die Suppression vermittelnden Zytokine von Treg hochregulieren, gleichgültig ob bei diesen Tieren eine OT induziert worden war mit einer niedrigen oder hohen Dosis. Eine niedrige Dosis führt zu einer starken Sezernierung von TGF β und IL10, eine hohe Dosis hingegen zu einer deutlich schwächeren. Aber diese schwächere Sezernierung ist im Vergleich zu Tieren ohne OT trotzdem deutlich erhöht (Faria et al., 2003).

Neben der Dosis ist auch die Frequenz des Antigens, also wie häufig es aufgenommen wird, wichtig für die Induktion einer OT. Dabei führt eine gleichmäßige Antigenaufnahme über einen längeren Zeitraum, z.B. über das Trinkwasser oder wiederholte Fütterungen, zu einer stärkeren antigenspezifischen Immunsuppression als eine einmalige Dosis (Faria et al., 2003; Oliveira et al., 2015).

1.3. Der Arylhydrocarbonrezeptor

Unsere Umwelt enthält viele Moleküle, die im Organismus akkumulieren und dadurch Schaden verursachen können. Sensorproteine können diese Schädigung verhindern, indem sie solche Moleküle erkennen und deren Abbau induzieren. Der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) gehört zu diesen Proteinen und wird durch die Bindung eines solchen Moleküls (Liganden) aktiviert und als Transkriptionsfaktor tätig. Außerdem interagiert der AhR als Bindungspartner mit verschiedenen anderen Proteinen, wodurch wiederum deren Aktivität reguliert wird.

Der AhR gehört zu der Familie der PAS bHLH Proteine und besitzt zwei PAS*-Regionen, die für Interaktionen mit anderen Proteinen und die Bindung von Liganden wichtig sind. Im inaktiven Zustand liegt der AhR im Zytosol vor und ist mit den Stabilisierungsproteinen HSP90*, AIP* und p23 verbunden (Stockinger et al., 2014, vgl. Abbildung 1-2). Die bHLH*-Region enthält das Kern-Lokalisations-Signal (NLS) und interagiert mit HSP90, sodass erst durch die Bindung eines Liganden das NLS frei gelegt wird. Durch die Bindung von Importin an das NLS wird der AhR in den Zellkern geleitet (Ikuta et al., 2004).

Erst im Zellkern löst sich der Komplex aus AhR und Stabilisierungsproteinen auf, indem ARNT* an die bHLH-Region bindet (McGuire et al., 1994). Dieses AhR-ARNT-Heterodimer bindet an eine spezifische DNS Sequenz, das XRE*, wodurch die Transkription der dahinterliegenden Gene vom AhR-ARNT-Dimer aktiviert wird (Whitelaw et al., 1993). Solche XREs kommen im Genom sehr häufig vor, wodurch der AhR ein großes Repertoire an möglichen Genen besitzt, die er reguliert (Sun et al., 2004). Die am besten untersuchten Gene, die durch den AhR reguliert werden, gehören zu der Cytochrome P450-Familie wie z.B. *cyp1a1*. Es gehört zur Phase I des Fremdstoffmetabolismus und fördert den Abbau von solchen Fremdstoffen (Inui et al., 2014; Whitlock, 1999).

Die Aktivität des AhR wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Zum einen wird der AhR mit Polyubiquitin-Ketten markiert und in Proteasomen verdaut, sobald die Stabilisierungsproteine, in diesem Fall AIP, abgefallen sind (Morales & Perdew, 2007). Zum anderen induziert der AhR die Expression des AhR-Repressors (AhRR). Dieser konkurriert mit dem AhR um die Bindung an ARNT, wodurch das transkriptionell aktive AhR-ARNT-Dimer seltener gebildet wird (Mimura et al., 1999).

Die Funktion des AhR als Transkriptionsfaktor wird als klassischer AhR-Signalweg oder auch genomischer Signalweg bezeichnet. Dem gegenüber steht der nicht klassische bzw. nicht genomische AhR-Signalweg (Bock, 2016).

* **AIP:** AhR-interacting protein / **bHLH:** basic helix-loop-helix / **HSP90:** heat shock protein 90 / **PAS:** PER-ARNT-SIM / **PER:** period circadian protein / **ARNT:** AhR nuclear translocator / **SIM:** single-minded protein / **NLS:** nuclear localization signal / **XRE:** xenobiotic responsive element

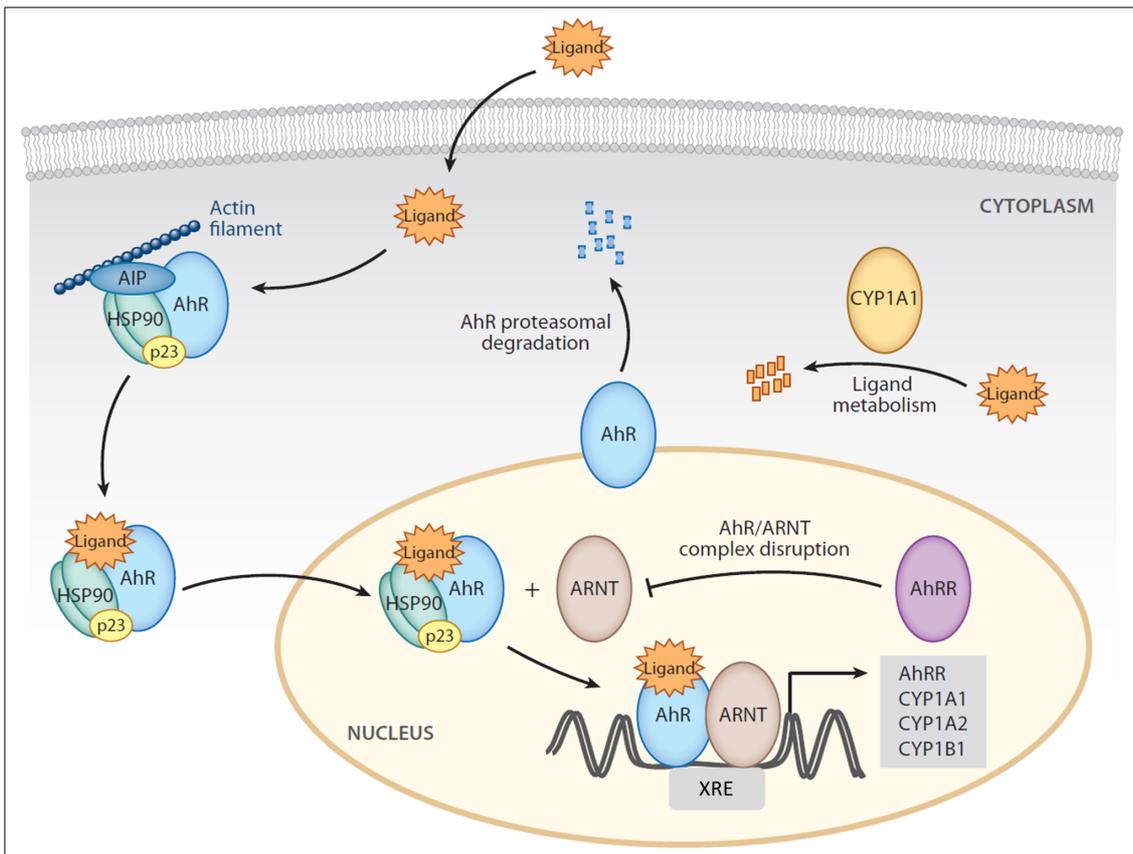


Abbildung 1-2 AhR-Signalweg

Im inaktiven Zustand liegt der AhR mit Stabilisierungsproteinen im Zytosol vor und wird erst durch Ligandenbindung in den Zellkern geleitet. Dort dimerisiert er mit ARNT und die Transkriptionseigenschaft wird aktiv, wobei der AhR-ARNT-Komplex an eine spezifische DNS-Sequenz (XRE) bindet und die Expression der entsprechenden Gene induziert. Der AhR wird durch Ubiquitinierung proteosomal verdaut und konkurriert um die Bindung mit ARNT mit dem AhR-Repressor, wodurch die Transkriptionseigenschaft reguliert wird. Grafik entnommen aus (Stockinger et al., 2014).

Die Protein-Protein Interaktion des AhR ist im nicht genomischen Signalweg wichtig. Der AhR vermag als Koaktivator oder durch konkurrierende Bindungen an andere Proteine deren Signalwege zu beeinflussen (Esser & Rannug, 2015). So ist bekannt, dass der ligandengebundene AhR an das aktivierte Retinoblastom-Protein (pRb) bindet, wodurch ein Zellzyklus-Arrest ausgelöst wird, falls der Ligand nicht abgebaut werden kann (Levine-Fridman et al., 2004).

Die zelluläre Sarkom assoziierte Kinase (c-Src) spielt in vielen Signalkaskaden eine wichtige Rolle (Thomas & Brugge, 1997). Durch den ligandenaktivierten AhR wird sie stimuliert (Dong et al., 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine TCDD-induzierte AhR-Aktivierung die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) in einem c-Src abhängigen Mechanismus induziert (Fritsche et al., 2007; Vogel et al., 2000).

COX-2 wiederum beeinflusst den Verlauf von Entzündungsreaktionen, indem es verschiedene Prostaglandine bildet (Smith et al., 1996). Diese können entzündungshemmende oder -fördernde Eigenschaften haben, je nachdem, aus welchen Vorstufen sie entstehen (Simmons et al., 2004).

Auch bei der T-Zell-Differenzierung spielt der AhR eine Rolle, indem er Proteine aus der Familie der Signalumwandler und Transkriptionsaktivatoren reguliert (STAT, *signal transducers and activators of transcription*). Die Proteine STAT1 und 5 inhibieren die Bildung von Th17 Zellen aber durch die Interaktion mit dem AhR wird die Inhibierung aufgehoben. Dadurch fördert der AhR die Differenzierung von Th17 Zellen (Kimura et al., 2008).

Die verschiedenen Liganden des AhR umfassen ein sehr weites Spektrum und lassen sich in drei Kategorien einteilen. In xenobiotische Liganden, endogene Liganden und Liganden aus der Nahrung (Nguyen & Bradfield, 2008).

Die xenobiotischen Liganden sind lipophile Umweltschadstoffe, die durch unvollständige Verbrennung entstehen. Sie sammeln sich in der Natur an und belasten den Menschen über die Nahrungskette. Zu dieser Gruppe gehören die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) und halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAKs), zu denen auch TCDD gehört (Denison & Nagy, 2003).

TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) ist ein starker AhR-Ligand, der metabolisch inaktiv ist und sich im Fettgewebe und in der Leber einlagert. Aufgrund der hohen Toxizität und der schon früh erkannten Bindung an den AhR, ist TCDD noch heute ein Prototyp zur Untersuchung des AhR-Signalweges. Die Halbwertszeit beträgt beim Menschen 7-8 Jahre und bei der Maus lediglich ca. 14 Tage (Diliberto et al., 2001; Van den Berg et al., 1994).

Beim Stoffwechsel im Körper entstehen immer wieder Produkte bzw. Nebenprodukte, die den Organismus schädigen können und dementsprechend abgebaut werden müssen. Solche Moleküle stellen die Gruppe der endogenen Liganden dar und werden direkt im Körper generiert oder als Vorstufen durch die Nahrung aufgenommen. So entsteht z.B. aus Tryptophan und UV-Strahlung 6-Formylindolol(3,2-b)carbazol (FIZC) direkt im Körper, welches ein starker AhR-Ligand ist (Rannug et al. 1987). Oder 2-(1'H-indolo-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylsäuremethylester (ITE), welches aus den Aminosäuren Tryptophan und Cystein entsteht (Song et al., 2002).

Zu den Nahrungsliganden zählt z.B. Indol-3-carbinol (I3C), das vorzugsweise in Kreuzblütlergewächsen (z.B. Brokkoli) vorkommt. Bei saurem pH, wie im Magen, wird I3C zu starken AhR-Liganden umgesetzt (Nguyen & Bradfield, 2008). So besitzt das aus I3C gebildete Indolo-[3,2-b]-carbazol (ICZ) eine der stärksten Bindungsaffinitäten zum AhR,

zeigt aber keine toxische Wirkung wie TCDD (Denison et al., 2002; Pohjanvirta et al., 2002).

Unterschiedliche Immunmodulationen können aber nicht nur durch verschiedene AhR-Liganden bewirkt werden, sondern auch der Zelltyp ist entscheidend. So führt derselbe Ligand bei verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Veränderungen (Wheeler et al., 2014).

1.3.1. AhR-Expression im Körper und in Immunzellen

Die Expression des AhR ist gewebe- und zellspezifisch sehr verschieden. In der Literatur sind, insbesondere je nach Messmethode, auch leicht unterschiedlich starke Expressionen für die jeweiligen Gewebe gezeigt worden. Die stärkste Expression wurde in der Lunge gemessen. Leber, Thymus, Herz und Plazenta zeigen eine mittlere Expression und eine noch schwächere Expression wird in Nieren, Milz und Muskel detektiert (Frericks et al., 2007; W. Li et al., 1994).

Bei den einzelnen Immunzellpopulationen gibt es ebenfalls eine unterschiedliche AhR-Expression. B-Zellen exprimieren den AhR erst nach einer Aktivierung (Marcus et al., 1998). In undifferenzierten T-Zellen, Th1, Th2 und auch regulatorische T-Zellen ist nur sehr wenig *ahr*-mRNA vorhanden. Hingegen ist die AhR-Expression in Th17 Zellen deutlich hochreguliert und kann die Differenzierung von diesen Zellen modulieren (Kimura et al., 2008; Veldhoen et al., 2008).

Das Darmgewebe selbst, insbesondere die intestinalen Epithelzellen (IECs), exprimieren den AhR (Chmill et al., 2010) und es gibt mehrere Hinweise, dass der AhR wichtig für das Immunsystem im Darm ist. AhR-defiziente Mäuse zeigen einen Verlust von wichtigen Immunzellen im Darm, wie den $\gamma\delta$ T-Zellen (Y. Li et al., 2011). Diese sitzen im Darmepithel und unterstützen den Erhalt von dessen Integrität durch die Ausschüttung von KGF (Boismenu & Havran, 1994).

Eine weitere Zellpopulation, die ILC3 (*innate lymphoid cells*), ist ebenfalls abhängig vom AhR und wird über die Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t (*RAR-related orphan receptor*) definiert. Sie sind eine wichtige Quelle für IL17a und/oder IL22 (Spits et al., 2013). Die ILC3 Zellen exprimieren den AhR und deren Aktivität kann durch zusätzliche AhR-Liganden aus der Nahrung beeinflusst werden. Im Darm von AhR-defizienten Tieren ist die Anzahl der ILC3 stark verringert und zusätzlich werden weniger isolierte lymphatische Follikel (ILF) im Darmgewebe gebildet (Kiss et al., 2011). Durch die Sezernierung von IL22 bzw. IL17 sind die ILC3 Zellen sehr wichtig für Aufrechterhaltung des Darmmilieus bzw. für die Abwehr von Pathogenen (Qiu & Zhou, 2013).

Neben der Expression des AhR an sich ist auch seine Regulation durch den AhRR in den Zelltypen unterschiedlich. So zeigen insbesondere die Immunzellen in Barriere-Organen eine starke AhRR-Expression. Vor allem diese Organe kommen mit AhR-Liganden aus der Umwelt in Kontakt aber aufgrund der hohen Expression des AhRR kommt es seltener zu dem transkriptionell aktiven AhR-ARNT-Dimeren. Dadurch wird eine entzündliche Überreaktion des AhR in Barriere-Organen verhindert (Brandstätter et al., 2016). Ein Beispiel für die hohe AhRR-Expression sind CD103 DCs, die für die OT notwendig sind. Sie weisen nur ein geringes Level von *ahr*-mRNS auf und die Inkubation mit TCDD führt nicht zur Induktion von *cypla1*. Stattdessen wird die Expression von *ahrr* stark hochreguliert (Chmill et al., 2010).

1.3.2. AhR-abhängige Toleranz-Regulation

Vieles in der Literatur spricht dafür, dass der AhR einen Einfluss auf die OT hat. So zeigen Veröffentlichungen, dass der AhR in die Funktionen und in die Differenzierungsprozesse bei wichtigen Kompartimenten oder Zellen involviert ist, die notwendig für die Induktion einer OT sind.

Ein direktes Beispiel für den Einfluss des AhR auf die OT ist, dass eine starke AhR-Aktivierung die Induktion der OT verhindert. Es wurde gezeigt, dass die Gabe von TCDD (10µg/kg KG p.o.) vor der OT-Induktion zur Erhöhung des antigenspezifischen Antikörpertiters nach Immunisierung führt, was als destabilisierte bzw. durchbrochene OT beschrieben wird (Chmill et al., 2010; Kinoshita et al., 2006).

Im Gegensatz zu der Verschlechterung der OT, kann die AhR-Aktivierung bei anderen immunologischen Toleranzen aber zu einer Verbesserung führen. In Untersuchungen von experimentellen Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass die AhR-Aktivierung zu mehr Treg führt. In der experimentellen posterioren Uveitis entstehen Entzündungen in der Netz- und Aderhaut im Auge des Versuchstieres. Durch die AhR-Aktivierung mit TCDD (50µg/kg KG i.p.) kann die Uveitis verhindert werden, was auf einen Anstieg an Treg zurückzuführen ist (Zhang et al., 2010). Ähnliches wurde für die immunologische Akzeptanz von Transplantaten gezeigt, bei denen die AhR-Aktivierung für 30 Tage durch tägliche orale Gabe von VAG539 (Vorstufe eines AhR-Liganden) durchgeführt wurde. Auch hierbei wird die Toleranz durch Treg vermittelt, welche wiederum von DCs induziert wurden (Hauben et al., 2008).

Somit fördert die AhR-Aktivierung einerseits Treg und damit die immunologische Toleranz, aber andererseits verhindert sie auch die Induktion einer oralen Toleranz. Wie die AhR-Aktivierung solch gegenteilige Auswirkung haben kann, ist Gegenstand der aktuellen

Forschung. Daher stellte sich die Frage, ob auch der Verlust des AhR-Signalweges die OT beeinflusst.

Wie schon bereits beschrieben, konnte mit AhR-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die Bildung von isolierten lymphatischen Follikeln (ILF), ein Kompartiment des GALT, ausbleibt und dass ILC3 Zellen verringert sind (Kiss et al., 2011). Weiterhin führt eine AhR-Defizienz zur Verringerung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm (Y. Li et al., 2011) und zu einer starken Reduzierung der Retinsäure in der Leber (Andreola et al., 1997).

Diese Veränderungen in AhR-Ko Mäusen legen nahe, dass nicht nur die AhR-Aktivierung, sondern auch der Verlust des AhR-Signalweges sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die OT besitzt. Daher wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der AhR-Defizienz auf die OT untersucht.

1.4. Untersuchung der oralen Toleranz im Mausmodell

Um im Tierversuch die erfolgreich induzierte OT nachzuweisen, gibt es verschiedene Testverfahren. So kann die entzündliche Schwellung nach einer subkutanen Antigeninjektion gemessen werden (*delayed type hypersensitivity*, DTH) oder es wird nach einer intraperitonealen (i.p.) Injektion der antigenspezifische Antikörpertiter im Blut gemessen (Faria & Weiner, 2005).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Induktion und Stabilität der OT durch den Antikörpertiter im Blut bestimmt. Dies misst die humorale Immunantwort und hat den Vorteil, dass die Stabilität der Toleranz durch mehrfache Immunisierung über einen längeren Zeitraum gemessen werden kann und die Tiere dafür nur gering belastet werden müssen (Faria et al., 1998).

Für die Induktion einer OT wird ein Protein verwendet, welches im normalen Futter der Versuchstiere nicht enthalten ist und zusätzlich eine Immunreaktion auslösen kann. Das Hühnereiweiß Ovalbumin (OVA) verfügt über diese nötigen Eigenschaften und ist in der Literatur für Untersuchungen der OT etabliert (Fowler & Weiner, 1997; Melamed & Friedman, 1994).

Um die Antikörperproduktion eines Tieres zu testen, wird bei der ersten Injektion (Immunisierung) das OVA in komplettem Freund's Adjuvans (CFA) gelöst. Aufgrund des Mineralöls im CFA verbleibt die Lösung am Injektionsort im Gewebe, was es dem Immunsystem ermöglicht, das gespritzte OVA besser aufzunehmen (Billiau & Matthys, 2001). Zusätzlich sind im CFA abgetötete Mykobakterien enthalten, die als ein sehr starkes „*danger signal*“ für die DCs fungieren (Gallucci & Matzinger, 2001). Dieses Signal aktiviert die DCs, wodurch sie in den nächsten Lymphknoten wandern und dort die aufgenommenen

Antigene, also auch OVA, auf ihrer Oberfläche präsentieren. Zusätzlich induziert das CFA die Sezernierung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL12 und IL6 (Billiau & Matthys, 2001; Schütt & Bröker, 2011, S. 64). Im Lymphknoten stimulieren die aktivierten DCs T-Zellen, die einen OVA-spezifischen TCR besitzen. Hierbei sind das Mikromilieu im Lymphknoten und die Aktivität von T-Helferzellen (Th) entscheidend. Die von den DCs sezernierten Zytokine fördern dabei die Entstehung von Th1 Zellen, welche wiederum die OVA-spezifischen B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen (Schütt & Bröker, 2011, S. 68).

Nach der Reifung der aktivierten B-Zellen sezernieren sie vor allem Antikörper der IgG-Klasse, wobei IgG1 den größten Anteil der Antikörper im Blut ausmacht (a M. Faria et al., 1998; W. Quimby & H. Luong, 2007, S.190). Deswegen wurde in dieser Arbeit der Titer der OVA-spezifischen-Antikörper der IgG1-Klasse bestimmt. Durch die jeweiligen Verstärkungsinjektionen (vgl. Abbildung 2-1) werden die B-Gedächtniszellen angesprochen, die bei der ersten Immunisierung gebildet wurden. Diese sekundäre Immunantwort erhöht den antigenspezifischen Antikörpertiter (Schütt & Bröker, 2011, S. 67), wodurch auch kleine Unterschiede in der Immunantwort deutlich werden.

Wurde bei dem Tier zuvor eine OT gegen OVA induziert, hatten sich OVA-spezifische Treg gebildet und im Körper verteilt bzw. stehen aufgrund der Deletion/Anergie keine antigenspezifischen T-Zellen zur Verfügung (vgl. Abschnitt 1.2). In diesem Fall würden die B-Zellen nicht aktiviert werden und die Antikörperproduktion würde ausbleiben (Lim et al., 2005; Wang et al., 2015).

1.4.1. Mausmodell mit zellspezifischer *ahr*-Deletion

Um zu untersuchen, wie wichtig die AhR-Expression in ganz bestimmten Zelltypen für die OT ist, wurden zellspezifische *ahr*-Deletionen mit Hilfe des Cre-Lox-Systems durchgeführt. Dieses System basiert auf zwei genetischen Veränderungen. Eine ist die Expression der Cre-Rekombinase durch einen zellspezifischen Promotor, sodass nur bestimmte Zellen dieses Protein synthetisieren. Die zweite sind LoxP-Elemente, die eine gewünschte Gensequenz im Genom der Tiere flankieren. Folglich wird in jeder Zelle, welche die Cre-Rekombinase exprimiert, die Gensequenz zwischen den LoxP-Elementen entfernt (Orban et al., 1992).

Bei der AhR^{flox} Mauslinie ist das Exon 2 des *ahr*-Gens mit LoxP-Elementen flankiert, sodass die Cre-Rekombinase dieses Exon entfernen kann und dadurch kein funktionierendes AhR-Protein mehr synthetisiert wird (Walisser et al., 2005). Drei verschiedene Mauslinien mit Cre-Expression in IECs, DCs oder T-Zellen wurden verwendet.

Die Villin^{Cre} Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase unter dem Promotor von Villin, welches nur in intestinalen Epithelzellen (IECs) ausgeprägt wird (Madison et al., 2002). Die Integrin- α -Kette (CD11c) wird von DCs, aber auch von Makrophagen und einigen T-Zellen ausgeprägt, wodurch CD11c^{Cre} Mäuse zur Untersuchung von DCs geeignet sind (Caton et al., 2007). Für die zellspezifische Cre-Expression in T-Zellen wurden Lck^{Cre} Mäuse verwendet, die Cre unter dem Promotor der Tyrosin Kinase „*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*“ (Lck) exprimieren (Garvin et al., 1988, 1990).

Diese drei Cre-Mauslinien wurden jeweils so mit AhR^{flox} Mäusen verpaart, dass alle Würfe der Zucht homozygot AhR^{flox} waren und nur die Hälfte *cre* trugen. Dadurch konnten Cre^{neg}-Wurfgeschwister als Kontrolle zu den Cre^{pos} Tieren verwendet werden. Die Cre^{pos} Tieren besitzen die *ahr*-Deletion ihrer zellspezifischen Cre-Expression und werden entsprechend als AhR ^{Δ Villin}, AhR ^{Δ CD11c} oder AhR ^{Δ Lck} bezeichnet.

Bevor die Tiere in einem OT-Versuch verwendet wurden, musste die jeweilige zellspezifische *ahr*-Deletion der drei Zelltypen überprüft werden. Dazu wurde eine PCR genutzt, die den Ausschnitt des Exon 2 im *ahr*-Gen durch zwei unterschiedlich große PCR-Banden nachweist. Von einem unveränderten *ahr*-Gen wird ein 140bp-Fragment amplifiziert. Falls die Cre-Rekombinase in einer Zelle aktiv war, wurde das Exon 2 im *ahr* entfernt, von dem dann ein 180bp-Fragment amplifiziert wird. Somit zeigt die DNS-Analyse, ob eine Zelle ein unverändertes (140bp) oder ein deletiertes *ahr*-Gen besitzt (180bp) (Walisser et al., 2005).

1.5. Zielsetzung

Ist die OT gestört oder beeinträchtigt, kann es zu Pathologien wie Lebensmittelallergien, autoimmunen Darmerkrankungen und sogar zu Krebs kommen (Faria & Weiner, 2005). Der AhR wird in den intestinalen Epithelzellen und in bestimmten Immunzellen des Dünndarms exprimiert und seine Aktivierung beeinflusst die OT. So konnte schon gezeigt werden, dass die persistente Aktivierung des AhR durch TCDD die OT durchbricht (Chmill et al., 2010). Die Mechanismen der OT, also wie die unterschiedlichen Zellarten vom Darmepithel über die DCs bis hin zu den T-Zellen zur OT beitragen, sind nur teilweise bekannt.

Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit ist, inwieweit der AhR an der Induktion bzw. Aufrechterhaltung der OT beteiligt ist. Dafür wurde bei Mäusen mit einer systemischen *ahr*-Deletionen (AhR-Ko) eine experimentelle OT ausgelöst und diese auf Induktion und Stabilität getestet. Es sollte auch geklärt werden, welche Zellpopulation für die Auswirkung des AhR auf die OT verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass der AhR die Balance zwischen Treg und Th17 Zellen beeinflusst und dass diese Balance wichtig für die OT ist (Matteoli et al., 2010). Dementsprechend wurden OT relevante Organe durchflusszytometrisch analysiert. Außerdem wurden Mäuse mit zellspezifischen *ahr*-Deletionen verwendet, um zu untersuchen, in welcher Zellpopulation der AhR für die OT notwendig ist. Die zu untersuchenden Zellpopulationen für eine zellspezifische *ahr*-Deletionen wurden aufgrund ihrer Beteiligung an der OT und weil sie den AhR exprimieren ausgewählt. Deswegen wurden Mäuse mit der *ahr*-Deletion in den IECs (AhR^{ΔVillin}), den DCs (AhR^{ΔCD11c}) oder den T-Zellen (AhR^{ΔLck}) untersucht.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob AhR-Liganden aus der Nahrung einen Einfluss auf die OT haben. Es ist bekannt, dass durch eine Diät ohne AhR-Liganden die Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen, welche für eine OT wichtig sind, im Dünndarm reduziert wird (Ke et al., 1997; Y. Li et al., 2011). Deswegen wurde eine AhR-ligandenfreie Diät an Mäuse verfüttert und die Auswirkung auf die experimentell induzierte OT untersucht.

Zuerst musste die Frage geklärt werden, welches OT-Protokoll geeignet ist. Weil neben der Induktion auch die langfristige Aufrechterhaltung der OT getestet werden sollte, musste die induzierte OT sehr stabil sein. Durch die bekannte Auswirkung einer TCDD-Belastung, konnte das entworfene OT-Protokoll auf Funktionalität getestet werden und gleichzeitig die Frage geklärt werden, wie sich eine dauerhafte TCDD-Belastung auf die OT auswirkt.

Durch ein besseres Verständnis des Mechanismus der OT, kann dieser gezielter genutzt werden, um Immunerkrankungen zu behandeln. Eine Toleranzinduktion, welche durch die orale Einnahme eines Antigens induziert wird, kann somit helfen, eine systemische Immunreaktion auf dasselbe Antigen zu verhindern oder abzuschwächen. Ein Beispiel dafür ist die orale Immuntherapie bei Allergien (Cabrera & Urrea, 2015).

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden C57BL/6-Mäuse oder genetisch veränderte Mäuse mit einem C57BL/6-Hintergrund im Alter von 8-13 Wochen bei Versuchsstart verwendet. Bei der Untersuchung von genetisch veränderten Tieren wurden für die Wildtyp-Kontrolle immer Wurfgeschwister genutzt, wodurch eine Auswirkung von unterschiedlichen genetischen Variationen, wie z.B. durch genetische Drift, ausgeschlossen werden konnte.

Die Mäuse wurden unter spezifisch-pathogen-freien (SPF) Bedingungen im Tierstall des IUFs gezüchtet und gehalten, wobei sie einen 12h Tag-Nacht Rhythmus und Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* hatten. Alle Tierversuche wurden nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes angemeldet, genehmigt und durchgeführt.

Bezeichnung (Interner Name)	Erhalten von	Einstellung in IUF Tierstall	Referenz
C57BL/6 wildtyp			
B6.129-AhRtm1Bra/J (AhR full knockout, AhR-Ko)	Jackson Laboraory, Bar Harbor, USA	11.12.2003	(Lahvis & Bradfield, 1998)
B6.129(FVB)-AhRtm3.1Bra/J (AhR-flox)	Jackson Laboraory, Bar Harbor, USA	20.09.2007	(Walisser et al., 2005)
B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz/J (CD11c Cre)	Ari Waisman, Universität Mainz	15.10.2007	(Caton et al., 2007)
B6.Cg-Tg(Vill1-cre)997Gum/J (Villin Cre)	Jackson Laboraory, Bar Harbor, USA	Juli 2014	(Madison et al., 2002)
B6.Cg-Tg(Lck-cre)548Jxm/J (Lck Cre)	Jackson Laboraory, Bar Harbor, USA	Mai 2014	(Hennet et al., 1995)

2.1.2. Geräte

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Beschreibung
FACS Canto II	Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg	Laser: 405 / 488 / 633nm Software: BD FACS Diva 6.1.3
FACS Aria III	Durchflusszytometer und Zellsortiereinheit	BD Biosciences, Heidelberg	Laser: 405 / 488 / 561 / 633nm Software: BD FACS Diva 8.0.1 Sortieren von bis zu vier einzelnen Zellpopulationen
Tecan - Infinite 200 Pro	Mikroplatten Lesegerät	Tecan, Grödig, Österreich	UV Xenon Lampe mit Absorbtionsmessungen im Bereich von 230 - 1000nm
Rotor-Gene-Q	semi quantitative Polykettenreaktion	Qiagen, Hilden	
Tissue Lyser III	Gewebeaufschluss	Qiagen, Hilden	

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	LGC Promochem GmbH, Wesel
AccuCheck Counting Beads (#PCB100)	Thermo Fischer, Carlsbad, CA, USA (Applied Biosystem)
Albumin vom Hühnereiweiß, Ovalbumin (OVA), Grade V (#A5503)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
BSA, Fraktion 5	Serva, Heidelberg
DAPI (#6335.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase I (#10104159001)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EasyColl (#L6145)	Biochrome GmbH, Berlin
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fixable Viability Dye eFluor® 506 (#65-0866)	eBioscience, Frankfurt am Main
Freunds Adjuvans, Complete (CFA) (#F5881)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Freunds Adjuvans, Incomplete (IFA) (#F5506)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (#4368813)	Thermo Fischer, Carlsbad, CA, USA (Applied Biosystem)
HRP-Avidin (#18-4100-51/ 500x)	eBioscience, Frankfurt am Main
Kollagenase P (#11213865001)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
my Budget RNAmagic (#26-1000-100)	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Oliven Öl, Ph. Eur.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (#204076)	Qiagen, Hilden
RQ1-DNase (RNasefrei)	Promega Corporation, Madison, WI (USA)
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

ssniff EF R/M acc. AIN 76A (#E15710-04) AhR-Lignaden reduziertes Futter (ALFD)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
ssniff M-Z Alleinfuttermittel (#V1124-0)	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
TMB-Ready to use (#4390A)	Kem-en-tec, Dänemark
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.4. Antikörper

Spezifität	Fluorophore	Clone	Hersteller	Bestellnummer
CD3e	APC	145-2C11	BioLegend, Fell	100312
CD4	APC-H7	GK1.5	BD Biosciences, Heidelberg	560181
CD8a	V450	53-6.7	BD Biosciences, Heidelberg	560469
CD11c	APC	N418	eBioscience, Frankfurt am Main	17-0114
CD19	PE	ID3	BD Biosciences, Heidelberg	557399
CD19	FITC	ID3	BD Biosciences, Heidelberg	557398
CD25	APC	PC61	BioLegend, Fell	102012
CD69	BV605	H1.2F3	BioLegend, Fell	104529
CD103	BV786	M290	BD Biosciences, Heidelberg	564322
CD103	PE	2E7	eBioscience, Frankfurt am Main	12-1031
FoxP3	eF450	FJK-16s	eBioscience, Frankfurt am Main	48-5773
IgG1	biotinyliert	polyklonal	Southern Biotech	1070-08
IL17a	PE	TC11-18H10.1	BioLegend, Fell	506904
MHCII	AF488	M5/114.15.2	BD Biosciences, Heidelberg	562352
MHCII	PerCP	M5/114.15.2	BioLegend, Fell	107624
$\gamma\delta$ TCR	APC	GL3	BioLegend, Fell	118116
CD3	-	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg	553058
CD16/32	-	93	BioLegend, Fell	101321
CD28	-	37.51	eBioscience, Frankfurt am Main	16-0281

2.1.5. Primer

Bezeichnung	Sequenz	Fragmentgröße
DB_2 AhR for DB_2 AhR rev	AGACCGGCTGAACACAGAGT GTCAGCAGGGGTGGACTTTA	cDNA -> 160bp gDNA -> 11.716bp
Oimr 1084 (Cre) Oimr 1085	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT	100bp
OL4088 OL4062	GGT ACA AGT GCA CAT GCC TGC GTC ACT CAG CAT TAC ACT TTC TA	180bp nach Deletion
OL4088 OL4064	GGT ACA AGT GCA CAT GCC TGC CAG TGG GAA TAA GGC AAG AGT GA	140bp
DB_FGF7 for (KGF) DB_FGF7 rev	CAAAGGGGTGGAAAGTGAATAC GGAATCCCCTTTTGATTAAAGG	cDNA -> 189bp gDNA -> 1217bp
DB_FGFR2IIIb for DB_FGFR2IIIb rev	TGGAGTTTGTCTGCAAGGTTTA GTTGGCCTGCCCTATATAATTG	cDNA -> 230bp gDNA -> 1307bp
DB_FGFR2IIIc for DB_FGFR2IIIc rev	GTGCTTGGCGGGTAATTCTA GCTGAAGTCTGGCTTCTTGG	cDNA -> 208bp gDNA -> 2252bp
DB_1 GMCSF for DB_1 GMCSF rev	GGGTCTACGGGGCAATTTCA CACAGTCCGTTTCCGGAGTT	cDNA -> 98bp gDNA -> 840bp
DB 1 CD3e for DB 1 CD3e rev	CTGCTACACACCAGCCTCAA ATCAGCAAGCCCAGAGTGAT	cDNA -> 138bp gDNA -> 1129bp
DB IL6 for DB IL6 rev	TCCAATGCTCTCCTAACAGATAAG CAAGATGAATTGGATGGTCTTG	cDNA -> 75bp gDNA -> 75bp
DB TGF beta for DB TGF beta rev	CACTGATACGCCTGAGTG GTGAGCGCTGAATCGAAA	cDNA -> 100bp gDNA -> 2677bp
IL10 Chmill for IL10 Chmill rev	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	cDNA -> 191bp gDNA -> 1198bp
DB_3 IL22 for DB_3 IL22 rev	GGTGGTGCCTTTCCTGACCA AGCTTCTTCTCGCTCAGACG	cDNA -> 203bp gDNA -> 3707bp
GAPDH for GAPDH rev	CGTCCCGTAGACAAAATGGT TTGATGGCAACAATCTCCAC	cDNA -> 110bp gDNA -> 1944bp
mCyp1a1_CHK01_For mCyp1a1_CHK01_Rev	ATATCCCCAAGGGGTGCTGT TTCAGGCCGGAACCTCGTTTG	cDNA -> 92bp gDNA -> 229bp
RPS6 for RPS6 rev	TACTGTGCCTCGTCGGTTG TGAATCTTGGGTGCTTTGGT	cDNA -> 150bp gDNA -> 1061bp

2.1.6. Puffer

1xPBS (10L)	NaCl	140mM (81,8g)
	KCl	2,5mM (1,9g)
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	6,5mM (11,5g)
	KH ₂ PO ₄	1,5mM (2g)
	pH 7,4	(ad 10L H ₂ O)
FACS Puffer (512mL)	PBS	(500mL)
	FCS	2% (10mL)
	EDTA (500mM)	2mM (2mL)
IEL Puffer (20mL pro Darm)	PBS	18ml
	FCS	2ml
	EDTA (250mM)	160µL
Verdaulösung (12mL pro Darm)	RPMI 1640	10,2mL
	FCS	1,8mL
	direkt vor Verdau zugeben:	
	Kollagenase P	0,15mg/mL
	DNase I	0,025mg/mL
PERM-Puffer	Saponin	0,5%
	in FACS Puffer	
Tween Puffer	Tween 20	0,5%
	in FACS Puffer	
DNA Lysis Puffer (nach Heinz)	Tris	100mM
	NaCl	200mM
	EDTA	5mM
	SDS	0,2%
	pH 8,5 (mit HCl)	
Stimulationsmedium für	FCS	10%
Färbungen	Pen-/Strep	1%
	Glutamin	
	beta-mercaptoethanol	
	PMA	10ng/mL
	Ionomycin	1µg/mL
	BrefeldinA	10µg/mL
	in RPMI Medium	

ELISA Waschpuffer	Tween 20	0,05%
	in PBS	
ACT Puffer	Tris	17mM
	NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	160mM
	pH 7,2 (mit HCl)	

2.1.7. Programme

DIVA 6.1.3 und 8.0.1	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Office Professional Plus 2010	Microsoft, Redmont, USA
GraphPad Prism 6.02	GraphPad, San Diego, USA
UGENE 1.13.0	Unipro, Novosibirsk, Russland
Rotor-Gene Q 2.0.2	Qiagen, Hilden
Tecan i-control 1.11.1.0	Tecan, Grödig, Österreich,

2.2. Methoden

2.2.1. Induktion der oralen Toleranz

Um die orale Toleranz (OT) zu untersuchen wurde, ein Antigen verfüttert, welches im normalen Zucht- und Haltungsfutter der Tiere nicht vorkommt. Das Albumin aus dem Hühnereiweiß, Ovalbumin, eignet sich hierzu, da es zusätzlich auch eine starke Immunreaktion durch eine Immunisierung hervorruft (Fowler & Weiner, 1997; Melamed & Friedman, 1994).

Ovalbumin (OVA) wurde in PBS gelöst und mit einer 20G Schlundsonde intragastral (i.g) verabreicht, wodurch kontrolliert wurde, dass jedes Tier die gewünschte Dosis aufnimmt. Die Dosis war an das Körpergewicht (KG) der Tiere angepasst, eine Maus erhielt 20mg OVA pro 20g KG. Diese Fütterung wurde dreimal wiederholt (Tag 0, 2 und 5). Dieses Protokoll entspricht in der Literatur einer als *high dose* induzierten OT. Hierbei werden die OVA-spezifischen T-Zellen zum größtem Teil deletiert bzw. in Anergie versetzt (Pabst & Mowat, 2012; Weiner et al., 2011).

Die Induktion von oraler Toleranz durch hohe Dosen ist ein gutes und in verschiedenen Laboren etabliertes Modell. Es erlaubt einen schnellen und effektiven Vergleich der Stabilität der OT durch Auslesen des antigenspezifischen Antikörpertiters im Serum der Tiere. Dabei kann dasselbe Tier zu verschiedenen Zeitpunkten getestet werden, weil die Blutabnahme keine Tötung des Tieres erfordert.

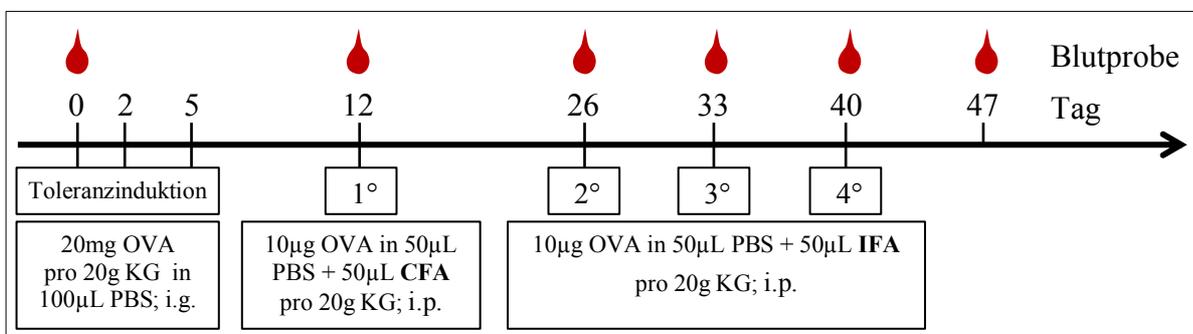


Abbildung 2-1 Zeitlicher Ablauf für Toleranzinduktion und Immunisierung

Die Toleranzinduktion erfolgt durch dreimalige Gabe von je 20mg OVA pro 20g Körpergewicht (KG) per Schlundsonde (i.g.). Sieben Tage nach der letzten Fütterung wird die Immunisierung mit CFA intraperitoneal durchgeführt und 14Tage später folgen drei Verstärkungsinjektionen mit IFA in wöchentlichem Abstand. An den jeweiligen Behandlungstagen wurden Blutproben (♠) entnommen, um den Antikörpertiter zu bestimmen.

Um die Stabilität der OT zu testen, wurde eine Woche nach der letzten Fütterung mit OVA immunisiert und als Adjuvans komplettes Freund's Adjuvans (CFA) genutzt, welches abgetötete Mykobakterien enthält. Diese dienen als *danger signal* für die dendritischen Zellen, die dadurch die zuletzt aufgenommenen Antigene, also auch OVA, in dem

nächstgelegenen Lymphknoten präsentieren (Gallucci & Matzinger, 2001). Eine 20g schwere Maus erhielt eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit 10 μ g OVA gelöst in 50 μ L PBS und 50 μ L CFA.

Am Tag der ersten Immunisierung (1 $^\circ$) wurde ebenfalls eine Blutprobe genommen, um Tiere ausschließen zu können, die durch die Schlundsondenfütterung ungewollt immunisiert wurden und dementsprechend schon vor der ersten Immunisierung einen OVA-spezifischen Antikörpertiter aufwiesen. Bei der Schlundsondenfütterung kann das Gewebe der Speiseröhre leicht verletzt werden, was eine Möglichkeit für die ungewollte Immunisierung darstellt. Solche Tiere hatten nach der Immunisierung einen sehr hohen Antikörper-Titer im Vergleich zu allen anderen Tieren und wurden aus technischen Gründen von der Auswertung ausgeschlossen. Dies betraf 10-20% der gefütterten Tiere.

Zwei Wochen nach der Immunisierung erfolgten im wöchentlichen Abstand Verstärkungsinjektionen, bei denen OVA in inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) gelöst wurde, welches nur Öl und Emulgatoren, aber keine Bakterienbestandteile enthielt. Diese Injektionen hatten die gleiche Dosis wie die erste Immunisierung und sie verstärkten die Antikörper-Produktion, wodurch eine mögliche Destabilisierung der OT gegebenenfalls beobachtet werden konnte. An jedem Behandlungstag wurde eine Blutprobe genommen, in der die α -OVA-IgG1-Konzentration bestimmt und somit die Auswirkung der vorherigen Injektion verdeutlicht wurde.

Um die Induktion der OT zu überprüfen, wurden Wurfgeschwister nur mit dem Lösungsmittel PBS i.g. gefüttert, aber genau wie die anderen Tiere immunisiert, wodurch zwei Behandlungsgruppen (PBS und OVA) entstanden. PBS-Kontrolltiere saßen nicht zusammen in einem Käfig mit Tieren, die mit OVA gefüttert wurden, um die mögliche Weitergabe des Antigens von Tier zu Tier zu verhindern. Wohingegen Tiere unterschiedlichen Genotyps aber mit gleicher Behandlung durchaus gemeinsam in einem Käfig gehalten wurden.

2.2.2. Gewinnung von Blutproben aus der submandibulären Vene

Im Blutserum der Tiere konnten die antigenspezifischen Antikörper durch einen ELISA nachgewiesen werden. Die Gesichts- bzw. submandibuläre Vene läuft bei der Maus oberhalb des Fellwirbels am Kiefer entlang und kann ohne Betäubung für die Blutabnahme genutzt werden (Golde et al., 2005). Nach Punktion der Vene tropften etwa 100-200 μ L Blut in ein angelegtes 0,5mL Reaktionsgefäß und nach 2,5h Inkubation bei RT wurden die zellulären Bestandteile bei 5000rpm für 14min abzentrifugiert. Das Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Messung bei -20 $^\circ$ C gelagert.

2.2.3. Isolation von Immunzellen aus der Milz

Die Milz wurde auf einem 100µm Zellsieb mit einem Stempel zerdrückt, wobei ständig kaltes PBS nachgegeben und die gewonnene Zellsuspension in einem 50mL Gefäß auf Eis aufgefangen wurde. Nach 8min bei 1200rpm und 4°C Zentrifugation wurden die Zellen in 2mL ACT Puffer aufgenommen und 5min bei 37°C inkubiert, wodurch die Erythrozyten lysierten. Die Reaktion wurde mit 5mL 10% FCS gestoppt und die Zellen wieder abzentrifugiert. Die so gewonnenen Zellen wurden in Medium resuspendiert und bis zur Färbung auf Eis gelagert.

2.2.4. Aufreinigung von Lymphzellen aus den mesenterialen Lymphknoten

Es wurden die drei großen, zusammenliegenden mesenterialen Lymphknoten (MLN) entnommen, indem der mesenteriale Arterien- und Venenkanal vom Blinddarm beginnend bis hin zu den MLN medial-dorsal verfolgt wurde. Die MLN wurden mit einer Pinzette entnommen und auf einem 70µm Zellsieb mit einem Stempel und PBS zerdrückt, um die Lymphzellen in einer Suspension zu erhalten. Nach Zentrifugation wurden die Zellen direkt in Medium aufgenommen und auf Eis gelagert.

2.2.5. Präparation des Dünndarms

Der Dünndarm besteht aus drei Segmenten, die für nachfolgende mRNA-Analysen einzeln betrachtet wurden. Das Duodenum (Du) beginnt direkt nach dem Magen und ist ca. 2cm lang, das Jejunum (Je) ist ca. 13cm lang und das letzte Stück, das Ileum (IL), umfasst ca. 8cm.

Direkt hinter dem Magen wurde ein Schnitt gesetzt und der gesamte Dünndarm langsam herausgezogen, wodurch sich das Mesenterium vom Dünndarm ablöste und im Bauchraum verblieb. Durch einen Schnitt direkt vor dem Blinddarm wurde der Dünndarm gelöst und mit einer 20G Sonde und kaltem PBS gespült. Das Duodenum wurde abgetrennt und in vier gleiche Teile geschnitten, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Von dem übrigen Dünndarm wurden die Peyer-Plaques entfernt, die auf einer schwarzen Oberfläche als weißliche Verdickung erkannt und herausgeschnitten wurden. Vom Jejunum und Ileum wurden ebenfalls je vier 0,5cm Abschnitte vom proximalen Teil abgenommen und schockgefroren.

2.2.6. Auftrennung von der intestinalen Epithelschicht und Lamina propria

Das verbliebene Dünndarmgewebe wurde in seine beiden Querschichten, der intestinalen Epithelschicht mit den darin liegenden intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und der darunterliegenden Lamina propria aufgetrennt. Dazu wurde der restliche Dünndarm längs aufgeschnitten und in ca. 1cm Abschnitte aufgeteilt, welche in IEL Puffer gegeben wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C und 200rpm im Wasserschüttelbad wurde die Lösung für 15s auf dem Wirbelmixer verwirbelt und durch ein grobes Metallsieb (Maschenweite ca. 700µm, Teesieb) gegeben. Die aufgefangene Lösung enthielt die Epithelzellen und die IEL. Durch Zentrifugation dieser Lösung wurden die Zellen sedimentiert und in Medium für die weitere Aufreinigung per Dichtegradient resuspendiert. Das im Sieb verbleibende Gewebe wurde in einem 50mL Gefäß kleingeschnitten und mit der Verdauungslösung für 40min bei 37°C und 200rpm im Wasserschüttelbad inkubiert. Danach wurde das Gewebe mit einer serologischen 5mL Pipette langsam zehnmal auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. Die Zellsuspension wurde durch ein 100µm Zellsieb gefiltert und die Zellen nach Zentrifugation in Medium aufgenommen und bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gelagert.

2.2.7. Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung von Immunzellen

In den Zellsuspensionen der intestinalen Epithelschicht und der Lamina propria stellten die Immunzellen nur einen kleinen Anteil dar. Den größten Anteil nahmen die Epithel- und Gewebezellen ein, die bei der Durchflusszytometer-Analyse oder einer *in vitro* Stimulation stören würden. Deswegen wurden die Immunzellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Zellen getrennt.

Als Gradientenreagenz wurde das Silikagel *EasyColl* der Firma Biochrom verwendet, welches mit einer Dichte von 1,124g/mL und eingestellter Osmolarität und pH-Wert geliefert wurde. Durch Verdünnung mit PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ konnten die gewünschten Lösungen hergestellt werden.

Die Zellen wurden in 1mL Medium gelöst und mit 330µL *EasyColl* gemischt, wodurch eine 25% Lösung (1,0348g/mL) entstand. Mit Hilfe einer Glaspipette wurde diese Zellsuspension zuerst mit einer 40% (1,0526g/mL) und dann mit einer 80% *EasyColl*-Lösung (1,1g/mL) unterschichtet, wie es in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt ist.

Die Zentrifugation wurde ohne Bremse für 20min bei RT und 2000rpm (804g) durchgeführt, wodurch die Immunzellen durch die 40%-Lösung wanderten und sich an der Grenzschicht zur 80%-Lösung sammelten. Die Epithelzellen verblieben zum größten Teil in der 25%-

Lösung bzw. wanderten nur geringfügig in die 40%-Lösung ein, die als Waschlösung fungierte.

Nach Abnahme der oberen Schichten wurde die Schicht mit den Immunzellen in ein neues Gefäß überführt und zweimal mit PBS gewaschen, um restliches *EasyColl* zu entfernen.

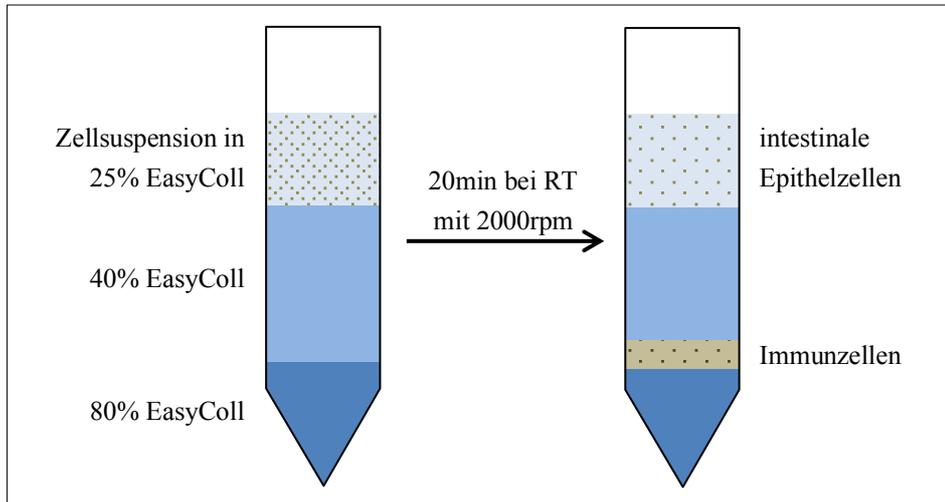


Abbildung 2-2 Schema einer Gradientenzentrifugation

Die Zellen waren in einer 25%-*EasyColl* Lösung gelöst und wurden mit einer 40%-*EasyColl* Lösung unterschichtet, welche als Waschlösung fungierte. Mit einer 80%-*EasyColl* Lösung wurde nochmals unterschichtet, so dass sich die Immunzellen nach Zentrifugation zwischen den Schichten der 80%- und 40%-*EasyColl* Lösung befanden. Die leichteren intestinalen Epithelzellen verblieben in der 25%-*EasyColl* Lösung.

2.2.8. Oberflächenfärbung der gewonnenen Immunzellen

Um die Zellen aufgrund ihrer Oberflächenproteine im Durchflusszytometer unterscheiden zu können, wurden diese mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an FC Rezeptoren von Makrophagen und dendritischen Zellen zu verhindern, wurden diese zuerst mit α -CD16/32 (Fc γ III bzw. Fc γ II Rezeptor) für 20min auf Eis abgedeckt. Im Anschluss wurden die Zellen mit den Antikörpern gegen die gewünschten Oberflächenmoleküle für 15min bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit FACS Puffer wurden die Zellen in FACS Puffer resuspendiert, der DAPI enthielt (5,71 μ M), um eine Lebend-Tot-Diskriminierung durchzuführen. Hierbei ist zu beachten, dass nur nekrotische Zellen DAPI positiv sind. Bei apoptotischen Zellen ist die Zellmembran noch geschlossen und DAPI kann nicht bis zur DNS eindringen, um zu interkalieren. Die gefärbten Zellen konnten am Durchflusszytometer gemessen werden.

2.2.9. *in vitro* Stimulation und intrazelluläre Färbung

Wenn neben Oberflächenmolekülen auch Interleukine (IL) oder andere intrazelluläre Proteine untersucht wurden, wurde vor der Färbung eine *in vitro* Stimulation der Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einer 96er Mikrotiterplatte für Suspensionszellen überführt (0,5 - 1×10^6 Zellen pro Vertiefung) und mit den unspezifischen Stimulantien Ionomycin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 10 ng/mL) für 2h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Stimulationsmedium für Färbung). Danach wurde Brefeldin A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zu den Zellen gegeben und eine weitere Stunde inkubiert, wodurch die Sezernierung der Interleukine durch Inhibierung des Golgi Apparates verhindert wurde (Wagner et al., 1994). Hierdurch erhöhten sich die Proteinkonzentrationen in der Zelle und führten bei der späteren Färbung zu einem stärkeren Signal im Durchflusszytometer.

Nach der Stimulation wurde zuerst eine Färbung von nekrotischen Zellen mit einem fixierbaren Lebend-Tot-Farbstoff (*Fixable Viability Staining Kit*) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen für 30min bei 4°C mit dem Farbstoff inkubiert, der durch offene Zellmembranen in Zellen eindrang, in die DNS interkalierte und sich kovalent an diese band, sodass sich der Farbstoff beim Waschen nicht von der DNS löste. Nach zwei Waschschritten wurde wie oben beschrieben mit der Oberflächenfärbung fortgefahren, an die sich noch die intrazelluläre Färbung anschloss.

Um die interzellulären Proteine anzufärben, wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Hierzu wurden die Zellen nach Zentrifugation in einer 2% Paraformaldehyd (PFA) Lösung resuspendiert und 30min bei 4°C fixiert. Nach einem Waschschriff permeabilisierten die Zellen für 20min bei RT in Tween Puffer. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen in der Lösung mit den gewünschten Antikörpern resuspendiert und für 30min bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschrritten konnten die Zellen am Durchflusszytometer untersucht werden.

2.2.10. Analyse der Immunzellen am Durchflusszytometer

Die Zellen von verschiedenen Organen wurden am Durchflusszytometer auf ihre Größe, Zellkomplexität und vor allem auf verschiedene Oberflächenproteine hin untersucht. Zur Messung standen zwei Geräte zur Verfügung, wobei der FACS Canto II ein Durchflusszytometer nur zur Analyse der Zellen ist und der FACS Aria III zusätzlich noch eine Sortiereinheit besitzt, mit der aus der analysierten Probe vier verschiedene Zellpopulationen gleichzeitig sortiert werden konnten.

In der Abbildung 2-3 ist die Analyse einer Lamina propria Probe als Beispiel dargestellt. Es wurde zuerst der *forward scatter channel* (FSC) zum *side scatter channel* (SSC) aufgetragen, um die Größe und Zellgranularität der Zellen zu bestimmen und nur Zellen, die

den gewünschten Parameter entsprachen, wurden für die darauffolgenden Graphen genutzt. Durch eine Lebend-Tot-Färbung konnten nekrotische Zellen angefärbt und ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen werden, denn diese zeigen häufig unspezifische Antikörperbindungen. In dem Beispiel aus Abbildung 2-3 wurden 40.000 lebende Zellen aufgenommen.

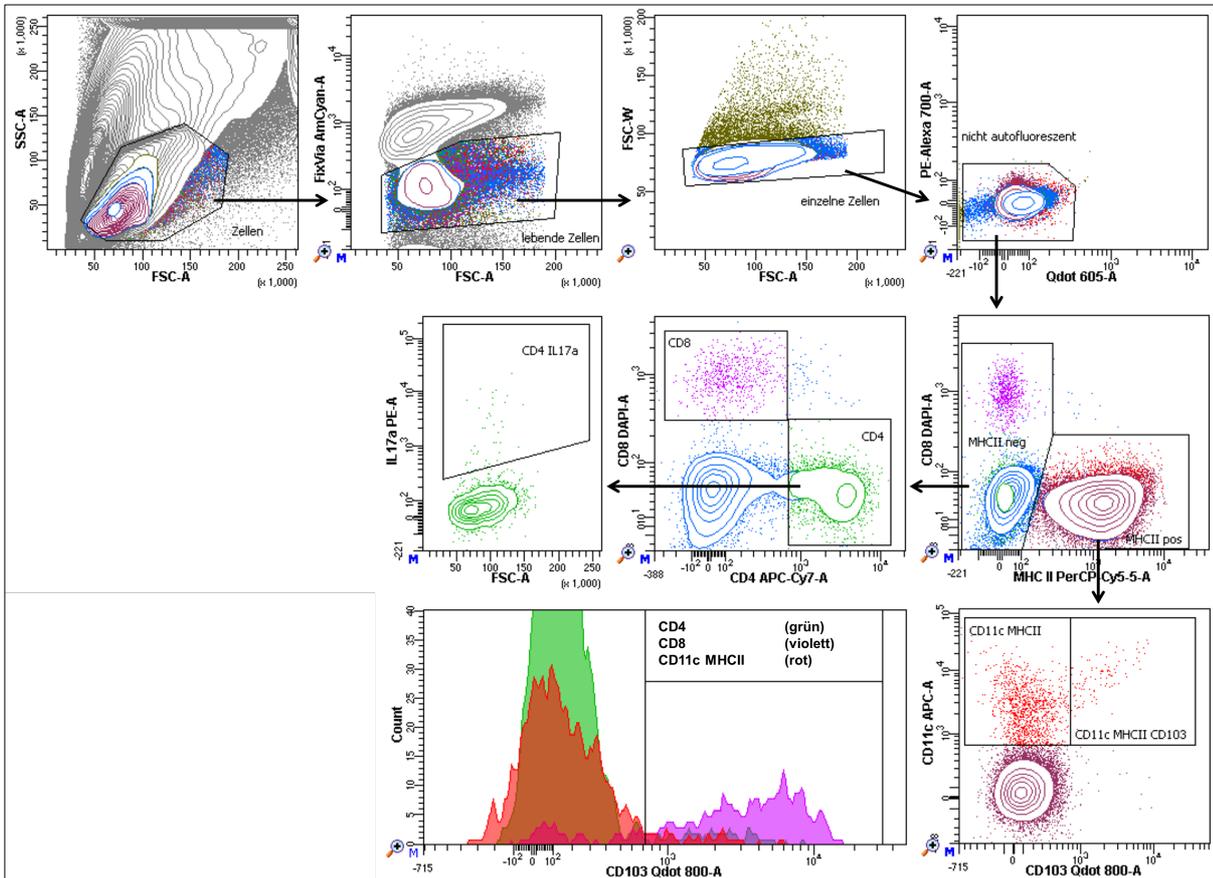


Abbildung 2-3 Zell-Auswahl-Strategie (*gating strategy*) einer durchflusszytometrischen Messung

Die Durchflusszytometer-Analyse einer Lamina propria Probe ist hier dargestellt. Zuerst wurden Zellen aufgrund der Größe und Zellgranularität ausgewählt, die zu Immunzellen passen (Zellen). Nur von diesen (Pfeil) wurde die Lebend-Tot-Färbung betrachtet, um nekrotischen Zellen ausschließen zu können. Nach Ausschluss von Dubletten und autofluoreszenten Zellen wurde, n die verbleibenden Zellen in MHCII positive und negative Zellen unterschieden. MHCII negative Zellen wurden auf CD8 und CD4 hin untersucht, wobei von den CD4 Zellen der Anteil an IL17a produzierenden Zellen bestimmt wurde. Von allen MHCII positiven Zellen wurde die CD11c MHCII (DCs) und der Anteil an CD103 DCs gemessen. Die Expression von CD103 ist für CD4 (grün), CD8 (violett) und CD11c MHCII Zellen (rot) in einer Überlagerung gezeigt.

Aus den lebenden Zellen wurden zusammenklebende Zellen (Dubletten) für die weitere Analyse ausgeschlossen, indem die Signaldauer (*width*) und die gesamte Signalstärke (*area*) eines gemessenen Signals gegeneinander aufgetragen wurden. Denn zwei zusammenhängende Zellen brauchen länger, um durch den Laser zu wandern und generieren eine dementsprechend größere Signaldauer, als eine einzelne Zelle mit der gleichen Signalstärke (vgl. Abbildung 2-3, dritter Graph, FSC-A zu FSC-W).

In einem nächsten Schritt wurden zwei Farbkanäle genutzt, die keinem genutzten Fluorophore entsprachen, wodurch diese Kanäle auch kein spezifisches Signal zeigten. Jede Zelle, die trotzdem für einen dieser Farbkanäle positiv war, wurde als autofluoreszente Zelle von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die nun verbleibenden Zellen (lebend, einzeln, nicht autofluoreszent) wurden auf die angefärbten Oberflächen- und intrazellulären Proteine hin untersucht und deren prozentualer Anteil an allen lebenden Zellen bestimmt. Im Beispiel wurden zuerst alle MHCII (*major histocompatibility complex II*) Zellen bestimmt, die in einem nächsten Graph auf CD11c- und CD103-Expression untersucht wurden. Bei den MHCII negativen Zellen wurden auf CD4 und CD8 Zellen identifiziert und von den CD4 Zellen wiederum die IL17a-Expression betrachtet. In einer Überlagerung von CD4 (grün), CD8 (violett) und CD11c MHCII Zellen (rot) wurde die CD103-Expression verglichen und bestimmt.

2.2.11. *ex vivo* Kultivierung von Dünndarmabschnitten

Zellen des Dünndarmepithels und auch die darin liegenden Immunzellen beeinflussen ihre Umgebung durch das Sezernieren von Zytokine und Chemokine. Um diese zu messen, wurden frisch präparierte Darmabschnitte *ex vivo* in Kultur gehalten, wobei die sezernierten Moleküle ins Medium gelangten. Dieses konnte per ELISA auf die Konzentration von wichtigen Signalproteinen getestet werden.

Dazu wurde der Darm, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, bis zum Öffnen entlang der Längsachse vorbereitet, allerdings ohne Proben vom Duodenum schockzugefrieren. Nun wurden von allen drei Dünndarmabschnitten (Du, Je und IL) jeweils ein 1,3cm langes Stück abgetrennt und in eine Vertiefung einer 24 Lochplatte mit 1mL Medium gelegt (DMEM, 10%FCS, P/S). Nach 4h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium vollständig abgenommen, vorhandene Zellbestandteile abzentrifugiert und das Medium bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Das Medium wurde mit ELISA-Kits der Firma eBioscience nach dem vorgegebenen Herstellerprotokoll untersucht.

2.2.12. RNS-Isolation aus Gewebe und Zellen

Um den Expressionslevel verschiedener Gene im Gewebe oder Zellen bestimmen zu können, wurde die totale RNS mit einer Phenol-Chloroform-Methode isoliert. In 2mL Reaktionsgefäßen wurde eine Metallkugel und 1mL *RNAmagic* auf Eis vorgelegt. Ein noch tiefgefrorenes Gewebestück wurde pro Gefäß hinzugegeben und dann 2min bei 30Herz in einer Gewebemühle zerkleinert. Bei der RNS-Isolation aus sortierten Zellen wurden diese in 1mL *RNAmagic* resuspendiert und kräftig geschüttelt.

Das aufgeschlossene Gewebe bzw. die Zellen wurden 5min bei RT inkubiert, bevor 200µL Chloroform hinzugegeben und dieses durch mehrfaches starkes Schütteln vermischt wurde. Durch Zentrifugation erfolgte eine Phasentrennung in eine klare wässrige Phase, die RNS enthielt und eine gefärbte organische Phase, die DNS enthielt. Proteine sammelten sich als weißlicher Schleier in einer Interphase. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500µL Isopropanol gemischt, welches zur Ausfällung der RNS-Moleküle führte. Durch eine Zentrifugation wurde die RNS als Pellet sichtbar und mit 70% Ethanol gewaschen, um Reste von Phenol und Salzen zu entfernen. Nachdem das Ethanol abgenommen und letzte Reste bei RT verdampften, wurde das RNS Pellet in Wasser gelöst.

2.2.13. cDNS-Synthese und semi-quantitative-Polymerasekettenreaktion

Die isolierte RNS enthält Boten-RNS (mRNS), welche dem Expressionsprofil der Zelle zum Zeitpunkt der Isolierung entspricht und mit Hilfe einer semi-quantitativen-Polymerasekettenreaktion (qPCR) im Vergleich zu anderen Proben analysiert werden konnte. Dazu wurde die mRNS in *complementary* DNS (cDNS) umgeschrieben, weil die mRNS für eine PCR nicht geeignet ist. Von allen Proben wurde die gleiche Menge an RNS (2µg) eingesetzt und als erstes ein DNS Verdau für 30min bei 37°C mit 2units DNase pro Probe durchgeführt, um mögliche genomische DNS in der RNS Probe abzubauen. Der DNS-Verdau wurde durch Zugabe von 2µL 30mM EDTA gestoppt und die DNase bei 65°C für 10min inaktiviert.

Die darauffolgende cDNS-Synthese verlief für 2h bei 37°C mit einem Kit der Firma Applied Biosystem, die zufällige Hexamere als Primer nutzt. Die so gewonnene cDNS wurde 1:2 mit Wasser verdünnt bevor sie für qPCR eingesetzt wurde.

Der qPCR-Reaktionsansatz wurde mit RotorGene Sybr-Green-Mix angesetzt, welcher dNTPs, Taq-Polymerase und verschiedene Salze für eine optimale Primerbindung beinhaltet. Hinzugefügt wurde noch 1µL der cDNS, jeweils 0,5µM der Primer eines Primerpaares und Wasser, um auf 15µL Reaktionsansatz aufzufüllen. In der RotorGene-Q

von Qiagen wurde mit 5min bei 95°C für eine initiale Denaturierung der cDNS und Aktivierung der Taq-Polymerase gestartet. Die darauffolgenden Zyklen bestanden aus 8s bei 95°C und 15s bei 60°C für Annealing und Elongation, bei der auch das Fluoreszenzsignal detektiert wurde.

Das Sybr-Green interkaliert in doppelsträngiger DNS (dsDNS) und emittiert Licht im gebundenen Zustand, wobei das Lichtsignal im direkten Verhältnis zur Menge an vorhandener dsDNS steht.

Es wurde bestimmt, wie viele Vervielfältigungszyklen eine Probe benötigte, damit das Lichtsignal einen bestimmten Schwellenwert (*cycle threshold*, cT) erreichte. Je mehr Zyklen nötig waren, um den Schwellenwert zu erreichen, desto weniger cDNS war vom *gene of interest* (GOI) ursprünglich in der Probe vorhanden.

Von jeder Probe wurde auch ein Haushaltsgen (*housekeeper*, HK) amplifiziert, welches zur Normierung der eingesetzten cDNS genutzt wurde. Für diese Normierung wurde der cT-Wert des GOI einer Probe von dem cT-Wert des HK derselben Probe abgezogen ($cT_{HK} - cT_{GOI} = \Delta cT$). Nun wurde der ΔcT als Potenz zur Basis 2 verwendet, um die x-fache Induktion im Verhältnis (Ratio) zum Haushaltsgen zu erhalten. Die Verhältnisse von verschiedenen Proben derselben qPCR konnten miteinander verglichen werden und gaben Aufschluss über die Expression des untersuchten Gens.

2.2.14. Behandlung von Mäusen mit TCDD

Um die Auswirkung von TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) auf die orale Toleranz zu untersuchen, wurden Wt-Mäuse der Linie C57BL/6 wie in Abbildung 2-4 dargestellt behandelt. Der Ablauf unterscheidet sich nur geringfügig zu dem OT-Protokoll aus Abschnitt 2.2.1, sodass ein Vergleich beider Protokolle und damit die Effekte eines kompletten Fehlens bzw. die persistente Aktivierung des Ah-Rezeptors möglich ist.

Zwei Tage vor der ersten Fütterung wurden die Tiere per Schlundsonde mit 10µg/kg TCDD belastet, welches in DMSO und Olivenöl gelöst war. Als Kontrollgruppe wurden Tiere nur mit dem Lösungsmittel DMSO und Olivenöl anstatt TCDD behandelt.

Nach der Induktion der oralen Toleranz durch dreimalige Gabe von 20mg OVA pro 20g KG wurden den Tieren zwei Erhaltungsdosen von je 2µg/kg TCDD gegeben. Kontrolltiere erhielten nur PBS intragastral (i.g.), um die Auswirkungen der OT-Induktion zu prüfen. Somit ergaben sich vier einzelnen Behandlungsgruppen: PBS-DMSO; PBS-TCDD; OVA-DMSO; OVA-TCDD.

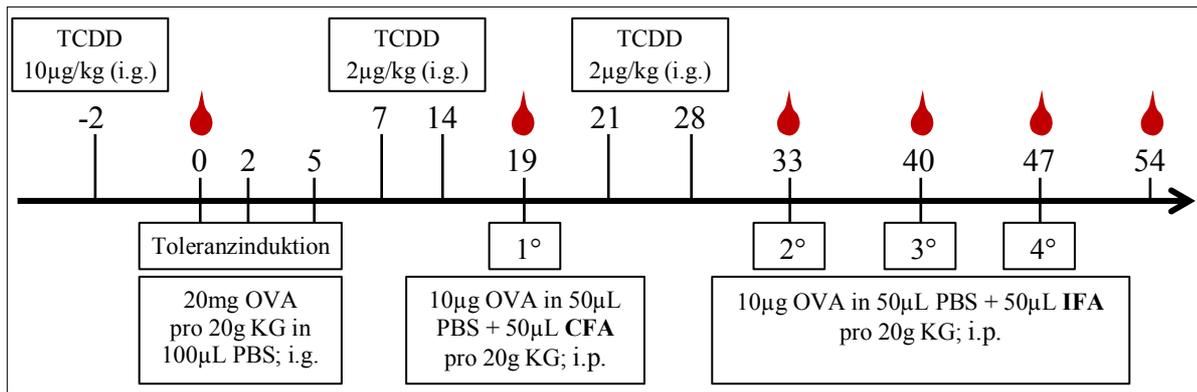


Abbildung 2-4 Zeitlicher Ablauf eines OT-Versuchs mit TCDD-Behandlung

In dieser Graphik wird der zeitliche Ablauf der TCDD-Behandlung, orale Toleranzinduktion und Immunisierung dargestellt. An den markierten Tagen (🔴) wurden Blutproben genommen.

Die Immunisierung wurde mit 10µg OVA in CFA/PBS pro 20g KG durchgeführt und nochmals wurden zwei TCDD-Erhaltungsdosen verabreicht, womit sichergestellt wurde, dass während der Zeit der Induktion und Immunisierung durchgehend TCDD im Körper vorhanden war.

TCDD hat in der Maus eine Halbwertszeit von ca. 14 Tagen, wohingegen die Halbwertszeit im Menschen mit 7-8 Jahren angegeben wird (Diliberto et al., 2001; Van den Berg et al., 1994).

Die dann folgenden Verstärkungsinjektionen und Blutproben wurden ebenfalls wie in Abbildung 2-1 durchgeführt und das gewonnene Blutserum mit einem α-OVA-IgG1-Elisa ausgewertet.

2.2.15. Orale Toleranz unter AhR-ligandenfreier Nahrung

Eine weitere Möglichkeit, die Auswirkung des AhR für die orale Toleranz zu untersuchen, ist es, die Zusammensetzung der AhR-Liganden in der Nahrung zu verändern. In diesem Experiment wurde eine spezielle Diät gefüttert, die keine Pflanzenprodukte und somit auch keine sekundären Pflanzenmetaboliten enthielt, die den Großteil an AhR-Liganden in der Nahrung ausmacht. Dieses rein synthetisch zusammengesetzte Futter (Ssniff, AIN 76A) war nicht vollkommen frei von AhR-Liganden, weil essentielle Aminosäuren, wie Tryptophan, enthalten waren. Doch dies stellte nur einen geringen Anteil an AhR-Liganden in der Nahrung dar, sodass die Diät sehr stark Liganden-reduziert war und im Folgenden als „AhR-ligandenfreie Diät“ (ALFD) bezeichnet wird.

Die Zusammensetzungen der normalen Diät (ND) und ALFD weisen aufgrund der synthetischen Zusammensetzung Unterschiede auf. Der Großteil der Kohlenhydrate bei der ND kommt aus Getreide, aber bei ALFD aus Zucker. Dennoch hatten beide Diäten einen vergleichbaren Kaloriengehalt und weitere wichtige Nährstoffe wie Mineralien, Vitamine, Aminosäuren und Spurenelemente waren gleichermaßen vorhanden, sodass keine Unterversorgung durch die ALFD auftrat (Abbildung 2-5).

Wt-Mäuse der Linie C57BL/6 wurden in einem Alter von 10-13 Wochen auf die Spezialdiät gesetzt und bekamen diese 21 Tage bevor die Toleranzinduktion durch dreimalige intragastrale Gabe von je 20mg OVA pro 20g KG durchgeführt wurde. Eine Gruppe von Wurfgeschwistern erhielt nur das Lösungsmittel PBS, um die Induktion der OT zu überprüfen. Die ALFD wurde während des gesamten Experiments gefüttert und eine weitere Wurfgeschwistergruppe erhielt die ND, wodurch vier einzelnen Behandlungsgruppen entstanden (PBS-ND; PBS-ALFD; OVA-ND; OVA-ALFD)

Ebenso wie in dem OT-Protokoll aus Abschnitt 2.2.1 wurde auch hier sieben Tage nach der letzten OVA-Gabe die Immunisierung mit 10 μ g OVA pro 20g KG in CFA intraperitoneal durchgeführt. Zwei Wochen danach folgten drei Verstärkungsinjektionen gleicher Dosis, die in IFA gelöst waren. An den jeweiligen Behandlungstagen wurde eine Blutprobe entnommen, um die α -OVA-IgG1-Titer zu bestimmen.

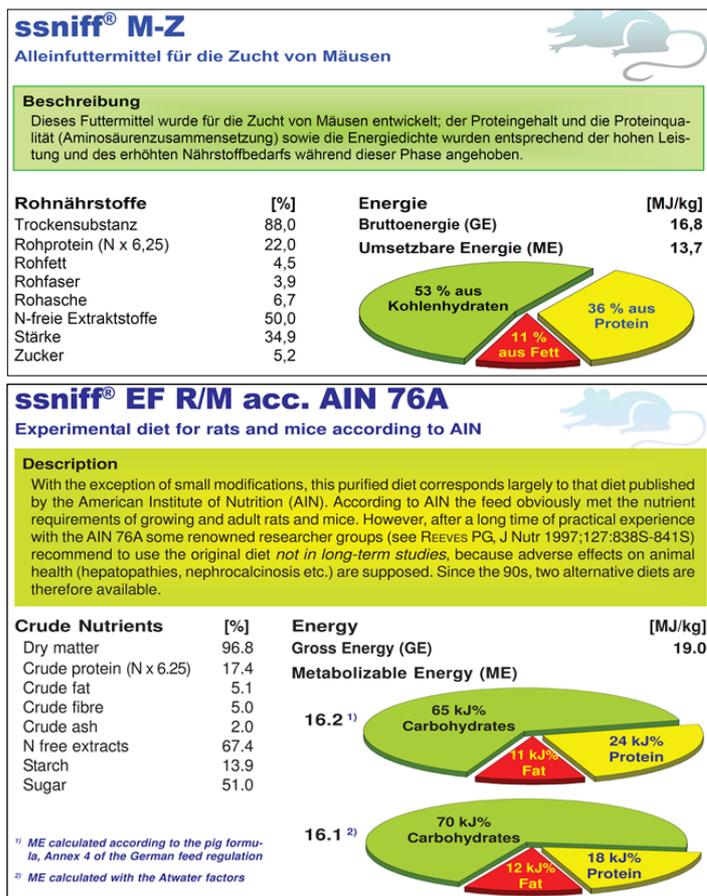


Abbildung 2-5 Futtermittel für die Diätstudie

Die Mäuse bekamen sowohl in der Zucht als auch in der normalen Haltung ein sehr energiereiches Zuchtfutter (ssniff M-Z). Für die Untersuchung der oralen Toleranz und AhR-Liganden aus der Nahrung wurde die Spezialdiät, AIN 76A, verabreicht. Diese basierte nicht auf Pflanzenmaterial, sondern war rein synthetisch hergestellt und enthielt damit keine sekundären Pflanzenmetabolite, die den größten Anteil an AhR-Liganden in der Nahrung darstellten (AhR-ligandenfreie Diät, ALFD).

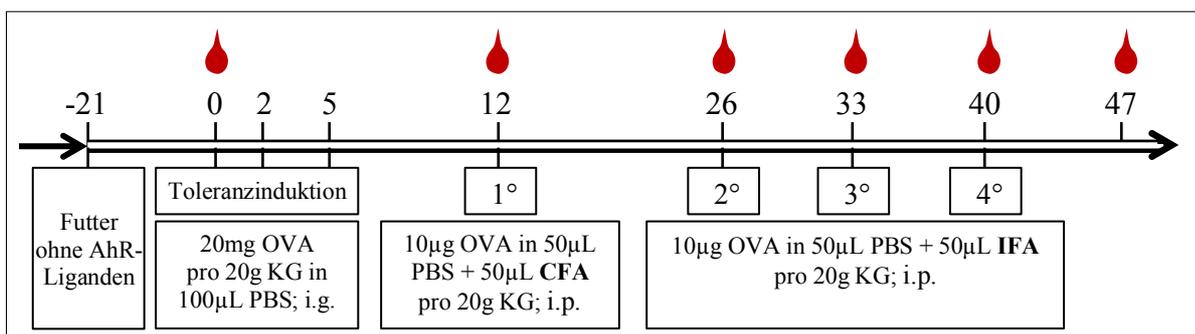


Abbildung 2-6 Zeitschema der OT-Induktion unter AhR-ligandenfreier Diät

Die zeitliche Abfolge der Untersuchung von AhR-Liganden in der Nahrung und deren Auswirkung auf die OT ist hier dargestellt. Die Spezialdiät wurde rein synthetisch hergestellt und enthielt keine AhR-Liganden in Form von sekundären Pflanzenmetaboliten. Die AhR-ligandenfreie Diät (ALFD) wurde über den gesamten Versuchszeitraum gereicht und startete drei Wochen vor der Induktion der OT. Blutproben wurden an den markierten Tagen (🔴) aus der submandibularen Vene entnommen.

2.2.16. OVA-spezifischer-IgG1 ELISA

Zum Testen der Stabilität der OT wurde der Titer von Ovalbumin-spezifischen Antikörpern der Klasse IgG1 (α -OVA-IgG1) in Blutserum der Tiere mittels ELISA bestimmt. Im Blut stellt die Klasse der IgG1-Antikörper mengenmäßig den größten Anteil und gibt Aufschluss darüber, wie stark das Immunsystem auf ein Antigen reagiert. Je stabiler bzw. stärker die OT für OVA induziert ist, desto weniger IgG1-Antikörper mit Spezifität für dieses Protein sind im Blutserum vorhanden (Faria et al., 1998; Fowler & Weiner, 1997).

Für den *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde OVA ÜN bei 4°C an das Plastik einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach drei Waschschritten mit ELISA Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween 20) wurden nicht abgebundene Stellen durch eine Inkubation mit 3% BSA Lösung für 1h geblockt. Danach wurde die Probe des Blutserums in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen und für 3h bei RT konnten die OVA-spezifischen Antikörper aus dem Serum an das gebundene OVA binden.

Für die Probeverdünnungen wurden 2 μ L des Serums in 198 μ L 1,5% BSA Lösung gemischt und von dieser 1:100 Verdünnung wurden 10 μ L in 990 μ L 1,5% BSA gegeben. Diese 1:10.000 Verdünnung wurde jeweils 1:3 verdünnt, sodass für jede Probe folgende Verdünnungsreihe entstand, die in Duplikaten getestet wurde: 1:10.000; 1:30.000; 1:90.000; 1:270.000, 1:810.000.

Nach vier Waschschritten wurde eine Lösung mit einem Biotin-gekoppelten-Antikörper dazu gegeben, der murines IgG1 erkennt. Nur IgG1-Antikörper, die während der Probeninkubation an das OVA gebunden haben, wurden detektiert. Überschüssige Detektionsantikörper wurden durch viermaliges Waschen entfernt. Bei einer anschließenden Inkubation mit Avidin gekoppelter *horseradish peroxidase* (HRP) hat das Avidin an das Biotin der anti-maus-IgG1 Antikörper gebunden. Nach 30min Inkubation bei RT wurde die Mikrotiterplatte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen, bevor als Substrat 3,3', 5, 5'-Tetramethyl-Benzidine (TMB) dazu gegeben wurde, welches für 15min bei RT von der HRP und in der Substanzlösung vorhandenem H₂O₂ oxidiert wurde, wodurch ein Farbumschlag entstand.

Je mehr HRP vorhanden war, desto stärker war der Farbumschlag. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,75M H₂SO₄ gestoppt und die optische Dichte (OD) bei 450nm ausgelesen. Eine weitere Messung bei 570nm für jede einzelne Vertiefung diente als Normierung, um mögliche Unterschiede im Plastik auszuschließen, welche die OD bei 450nm hätten verändern können (OD_{450nm} - OD_{570nm}).

Jede Probenverdünnung wurde zweimal aufgetragen und die OD-Werte dieser technischen Duplikate gemittelt. Um die Hintergrundfärbung der Reaktion als Nullwert bestimmen zu können, wurde eine Kontrolle im Duplikat mitgeführt, die mit allen Lösungen behandelt wurde, aber kein Blutserum enthielt. Der Mittelwert dieser Referenz wurde von allen

anderen Mittelwerten abgezogen, sodass für jede Probenverdünnung ein einziger OD-Wert entstand. Weil leichte Änderungen der Raumtemperatur schon zu unterschiedlichen OD-Werten führen konnten, wurde eine Standardprobe auf jeder einzelnen Mikrotiterplatte mitgetestet, wodurch es möglich war, mehrere Platten an verschiedenen Tagen miteinander zu vergleichen. Diese Standardprobe wurde am Anfang dieses Projektes durch zweimalige i.p.-Injektion von 10µg OVA in IFA bei zwei C57BL/6-Mäusen generiert und das gesamte Blutserum bei -80°C in kleinen Proben gelagert, sodass der Vergleich von allen durchgeführten α-OVA-IgG1-ELISAs während dieses Projektes möglich war.

Aus der Verdünnungsreihe der Standardprobe wurde eine Standardgerade erstellt, bei der die 1:10.000 Verdünnung gleich 1 gesetzt wurde und die weiteren Verdünnungen den jeweiligen Bruchteil (1/3; 1/9; 1/27; 1/81) als Dezimalzahl erhielten, sodass sich folgende Werte für die Verdünnungsreihe ergaben: 1; $0,\bar{3}$; $0,\bar{1}$; 0,037; 0,0125. Mit Hilfe der Standardgeraden konnten die OD-Werte der getesteten Probenverdünnungen auf einen Verdünnungswert der Standardprobe berechnet werden.

Wenn dieser Verdünnungswert mit der jeweiligen Verdünnung multipliziert wurde, ergaben sich relative Werte mit Bezug auf den Standard, der gleich 1 gesetzt war. Für jede Probe wurden die relativen Werte der Verdünnungsreihe gemittelt, die in einem messbaren OD-Bereich lagen, wodurch Proben von unterschiedlichen Tieren und Behandlungstagen miteinander verglichen werden konnten. Somit hatte jede gemessene Probe einen Wert, der das Verhältnis zum Standard wiedergab und als „Relation zum Standard“ (rs) bezeichnet wurde.

2.2.17. Stimulation von T-Zellen aus der Milz von AhR-Ko

Um Unterschiede in der Stimulation von AhR-defizienten T-Zellen zu messen, wurden Milzzellen von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistertieren isoliert, wie es in Kapitel 2.2.3 beschrieben ist. Anschließend wurde eine negative Selektion mit MHCII-*beads* mit Hilfe einer magnetischen Zell-Separation der Firma Miltenyi Biotec nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dafür wurden 3×10^7 Milzzellen mit 20µL MHCII-*beads* für 15min auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Milzzellen auf eine Separatorsäule gegeben, wobei MHCII positive Zellen in der magnetischen Säule verblieben und alle anderen Zellen, darunter auch T-Zellen, als Durchfluss aufgefangen wurden.

Somit wurde der Anteil an lebenden Zellen bei CD4 Zellen von 20% auf 40% und bei CD8 von 8% auf 20% angereichert. Der Anteil von CD19 Zellen konnte hingegen von 10% auf 5% reduziert werden.

Pro Probe wurden jeweils 1×10^6 dieser Zellen für 16h bei 37°C und 5% CO₂ in einer 48er Zellkulturplatte stimuliert bzw. für die unstimulierte Kontrolle in nicht beschichtete

Vertiefungen der Platte mit Medium gegeben. Für die Stimulation wurden die Vertiefungen zuvor über Nacht (ÜN) mit anti-CD3 (3µg/mL) beschichtet. Während der Stimulation wurde anti-CD28 (1µg/mL) in das Medium zu den Zellen zugegeben und die Zellen wurden 16h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gestellt und für die Durchflusszytometer-Analyse gefärbt, wobei zu jeder Probe 5µL sogenannte *counting beads* gegeben wurden. Diese *counting beads* werden gleichzeitig mit der Probe gemessen und ermöglichen eine genauere Aussage über die tatsächliche Zellanzahl einer Zellpopulation in einer FACS-Analyse. Deswegen wurden in dieser *in vitro* Stimulation die gemessenen Zellen nicht auf alle lebenden Zellen, sondern auf die *counting beads* bezogen.

2.2.18. Statistik

Statistische Tests wurden bei einem Vergleich von zwei Gruppen mit einem zweiseitigen ungepaarten Student'schen t-Test durchgeführt.

Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde nach der Varianzanalyse mit einem one-way-ANOVA ein anschließender-paarweiser-multipler-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet. Hierbei wurden die Gruppen wie folgt verglichen: PBS-Wt zu OVA-Wt / PBS-Ko zu OVA-Ko / PBS-Wt zu PBS-Ko / OVA-Wt zu OVA-Ko. Für die Berechnung der statistischen Tests wurde das Programm GraphPad Prism™ verwendet.

Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Folgende Grenzen für p-Werte für verschiedenen Signifikanzen wurden gesetzt: * $\leq 0,05$ / ** $\leq 0,01$ / *** $\leq 0,001$. Bei einem nicht signifikanten Ergebnis (p-Wert $> 0,05$) wurde in der Graphik diese Angabe nicht dargestellt. Im Text und in Graphiken wurde die Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines Protokolls für eine stabile orale Toleranz

Bei C57BL/6-Mäusen wurde zunächst ein Protokoll zur Induktion einer oralen Toleranz (OT) etabliert. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des AhR beim Mechanismus der OT untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll mit einer möglichst stabilen Induktion der OT gesucht. Hierfür wurden drei verschiedene Protokolle miteinander verglichen, die sich in der OVA-Dosis zur Tolerisierung unterschieden (vgl. Tabelle 3-1).

Die OT wurde bei allen drei Protokollen durch das Verfüttern von Ovalbumin (OVA) ausgelöst und durch mehrere nachfolgende Immunisierungen mit dem gleichen Protein auf ihre Stabilität getestet. Tieren der OVA-Gruppe wurde zur Induktion der OT OVA per Schlundsonde verabreicht. Im Gegensatz dazu erhielten Kontrolltiere (PBS-Gruppe) nur das Lösungsmittel PBS, um die Induktion der OT durch OVA zu überprüfen, da die PBS-Tiere bei den nachfolgenden Immunisierungen mit OVA hohe Antikörper-Titer aufweisen sollten. Alle Tiere wurden sieben Tage nach der letzten Fütterung mit OVA immunisiert, wobei CFA als Adjuvans verwendet wurde, um eine starke Immunreaktion gegen das in den Bauchraum (i.p.) gespritzte OVA zu generieren.

Die Analyse des Blutserums erfolgte 14 Tage nach der ersten Immunisierung, wobei der im Blut gemessene Titer von OVA-spezifischen-IgG1 Antikörpern Aufschluss darüber gibt, wie stark das Immunsystem auf das i.p. gespritzte OVA reagierte (Faria et al., 1998; Fowler & Weiner, 1997). Der Titer wird in relativen Werten zu einer Standardprobe angegeben (vgl. Kapitel 2.2.16, Relation zum Standard: rs).

3.1.1. Eine hohe Antigendosis führt zu einer stabilen oralen Toleranz

In dem zuerst getesteten Fütterungsprotokoll wurde dreimal eine hohe OVA-Dosis verfüttert (3x 20mg/20g KG), wie es im Abschnitt 2.2.1 beschrieben ist. Nach der ersten Immunisierung (1°) produzierten die Tiere der PBS-Gruppe wie erwartet Antikörper gegen OVA (Abbildung 3-1, Tag 26). Im Vergleich dazu hatten die Tiere der OVA-Gruppe nur sehr wenige OVA-spezifische Antikörper im Blutserum, sie waren also tolerant (Tag 26: PBS: 0,46rs ±0,09rs; OVA: 0,01rs ±0,00rs; p-Wert: ≤0,001).

Um zu untersuchen, wie stabil dieses Fütterungsprotokoll die OT induzierte, wurden Verstärkungsinjektionen gegeben (2°, 3°, 4°). Dadurch wurde die Immunreaktion gegen OVA erneut angesprochen, was zu einer verstärkten Antikörperseznierung führte. Die Injektionen und auch die Messung des Antikörpertiteres folgten nach der ersten Immunisierung im wöchentlichen Abstand und erhöhten wie erwartet den Antikörpertiter

der PBS-Gruppe (Abbildung 3-1, Tag 33, 40, 47). Im Gegensatz dazu produzierten die OVA-gefütterten Tiere nur geringe Mengen α -OVA-IgG1 (Tag 47: PBS: 5,54rs \pm 2,23rs; OVA: 0,06rs \pm 0,03rs).

Das Ausbleiben der Antikörperproduktion bei der OVA-Gruppe trotz der vierfachen Immunisierung zeigt die Stabilität der induzierten OT deutlich. Somit kann durch die dreimalige Gabe von 20mg OVA/20g KG eine stabile und langfristige OT induziert werden.

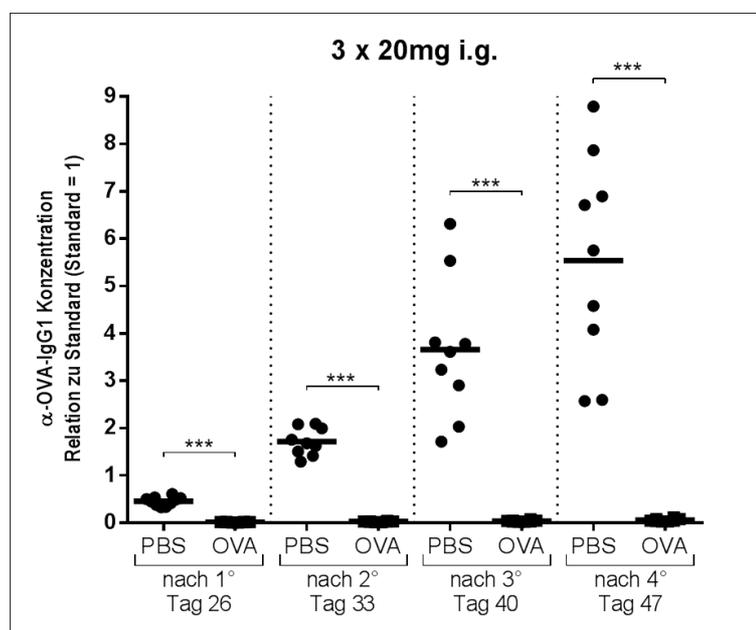


Abbildung 3-1 OVA-gefütterte Tiere zeigen eine stabile orale Toleranz

Der relative α -OVA-IgG1-Titer von Mäusen, die OVA bzw. nur das Lösungsmittel PBS dreimal intragastral verabreicht bekamen, ist hier zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Nach der Immunisierung mit OVA in CFA wurden Verstärkungsinjektion mit OVA in IFA durchgeführt und die jeweilige Auswirkung einer Injektion ist am darauffolgenden Behandlungstag im Blutserum bestimmt worden. Die Antikörperkonzentration ist in Relation zum Standard dargestellt. Jeder Wert (● oder ■) entspricht einem Versuchstier, welches zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde. Der Mittelwert ist ebenfalls dargestellt und die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet (***) \leq 0,001).

3.1.2. Eine mittlere oder geringe Antigendosis induziert keine stabile OT

Wie in der Einleitung beschrieben (vgl. Abschnitt 1.2.2) ist die Induktion einer OT von der Dosis und Fütterungsfrequenz abhängig. Um zu überprüfen, ob auch andere Fütterungsprotokolle möglicherweise für die Untersuchungen in dieser Arbeit geeignet wären, wurden verschiedene Ansätze getestet (vgl. Tabelle 3-1).

In Abbildung 3-2 sind die α -OVA-IgG1-Titer von zwei weiteren Protokollen dargestellt, bei denen im Vergleich zum ersten Protokoll eine mittlere Dosis (1x 20mg/20g KG) oder eine geringe Dosis (5x 0,5mg/20g KG) verwendet wurden.

In dem Protokoll zu Abbildung 3-2-A wurde den Tieren nur eine einmalige OVA-Dosis von 20mg/20g KG verabreicht und eine Woche später die Immunisierung durchgeführt. Nach der Immunisierung hatten die mit OVA gefütterten Tiere einen vergleichbar hohen α -OVA-IgG1-Titer wie die PBS-Kontrolltiere (Tag 18: PBS: 0,15rs \pm 0,02rs; OVA: 0,21rs \pm 0,13rs; p-Wert: 0,504). Nach der Verstärkungsinjektion erhöhten sich die Titer bei der PBS-Gruppe wie erwartet. Aber auch die Titer der OVA-Gruppe stiegen deutlich an (Tag 24: PBS: 1,76rs \pm 0,06rs; OVA: 1,05rs \pm 0,42rs; p-Wert: 0,036). Die einmalige Verabreichung von 20mg OVA pro 20g KG führt also nicht zur Induktion einer stabilen OT.

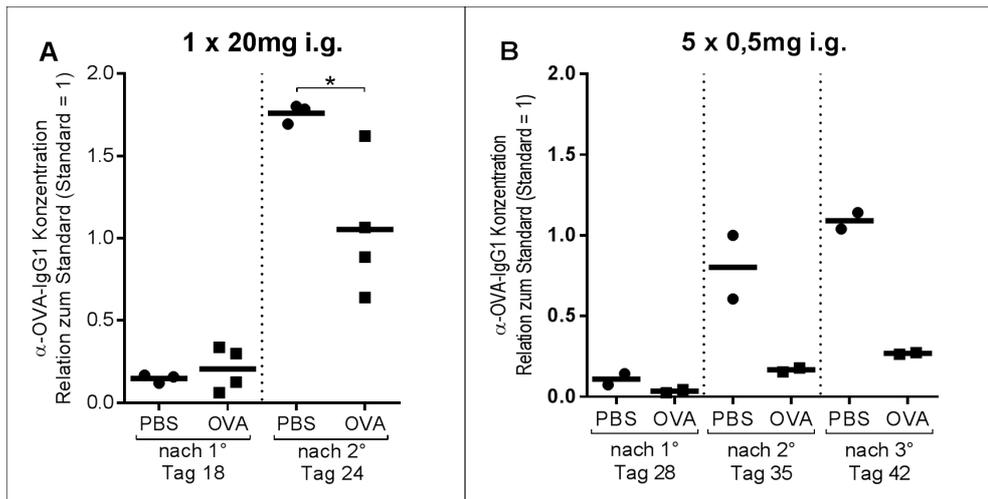


Abbildung 3-2 Fütterung einer mittleren oder geringen Antigenosis führt zu einer instabilen OT
Zwei unterschiedliche Protokolle zur Induktion oraler Toleranz durch eine mittlere oder geringe Antigenosis und deren α -OVA-IgG1-Titer wurden hier verglichen, wobei die Titer in Relation zum Standard angegeben sind. Jeder Wert (\bullet oder \blacksquare) entspricht einem Versuchstier, welches zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde und der Mittelwert ist ebenfalls dargestellt. **A)** Es wurde die OT durch einmalige Gabe von 20mg OVA induziert und sieben Tage später immunisiert. Elf Tage später wurde die Auswirkung gemessen und eine Verstärkungsinjektion gegeben, die wiederum eine Woche später ausgelesen wurde. **B)** Es wurde fünfmal an jedem zweiten Tag 0,5mg OVA gegeben und ebenfalls eine Woche später immunisiert. Wiederum elf Tage später erfolgte die erste und sieben Tage darauf eine weitere Verstärkungsinjektion. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test für die jeweiligen Behandlungstage ($* \leq 0,05$). Beim Vorliegen von nur zwei Messwerten wurde keine Signifikanzberechnung durchgeführt.

In Abbildung 3-2-B wurde ein Protokoll verwendet, bei dem die Antigenosis auf mehrere Tage aufgeteilt und gleichzeitig stark verringert wurde. Insgesamt fünfmal wurde an jedem zweiten Tag eine OVA-Dosis von je 0,5mg/20g KG verabreicht und sieben Tage nach der letzten Fütterung immunisiert. Nach der Immunisierung zeigte die OVA-Gruppe nur geringe Mengen an α -OVA-IgG1 (Tag 28: PBS: 0,11rs \pm 0,05rs; OVA: 0,03rs \pm 0,01rs). Durch die folgenden Verstärkungsinjektionen wurden die Titer der PBS-Gruppe deutlich erhöht, während die Titer der OVA-Gruppe nur gering anstiegen (Tag 42: PBS: 1,09rs \pm 0,07rs; OVA: 0,27rs \pm 0,01rs). Somit konnte gezeigt werden, dass auch eine deutlich verringerte

Dosis eine stabile OT auslösen kann, solange die einzelnen Antigendosen auf mehrere Tage verteilt werden.

Beim Vergleich der beiden Protokolle aus Abbildung 3-2 wird deutlich, dass die einmalige OVA-Gabe von 20mg/20g KG nicht ausreicht, um eine OT zu induzieren, wohingegen die OVA-Verabreichung von je 0,5mg/20g KG über mehrere Tage aufgeteilt durchaus eine stabile OT induziert.

Die stabilste Induktion der OT wurde aber durch die dreimalige OVA-Gabe von 20mg/20g KG, entsprechend dem Protokoll aus Abbildung 3-1, erreicht. Nach diesem Fütterungsprotokoll produzierten die Tiere der OVA-Gruppe selbst nach viermaliger Immunisierung nur äußerst geringe Mengen an α -OVA-IgG1.

In Tabelle 3-1 sind alle drei Protokolle nochmals aufgelistet, um ihre Eignung, eine stabile OT zu induzieren, besser vergleichen zu können. Dafür wird der α -OVA-IgG1-Titer der OVA-Gruppe mit dem Titer der zugehörigen PBS-Gruppe verglichen und deren Unterschied wurde in drei Stufen eingeteilt.

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der drei Fütterungsprotokolle

Drei verschiedene Fütterungsprotokolle mit unterschiedlicher OVA-Dosis (hoch, mittel, gering) wurden getestet. Der α -OVA-IgG1-Titer der OVA-Gruppe wurde zum Titer der entsprechenden PBS-Gruppe verglichen. Der Vergleich wurde dabei in drei Stufen eingeteilt: kein Antikörpertiter (-), ein geringer (+) oder ein ausgeprägter (++) . nd: nicht durchgeführt

Immunisierung \ Dosis	hohe Dosis	mittlere Dosis	geringe Dosis
	3 x 20mg	1 x 20mg	5 x 0,5mg
1°	-	++	-
2°	-	+	+
3°	-	nd	+
4°	-	nd	nd

Um zu untersuchen, wie der AhR den Mechanismus der OT beeinflusst, ist die Induktion einer möglichst stabilen OT Voraussetzung. Entsprechend wurde für die weiteren Experimente das Protokoll mit der stabilsten OT verwendet. Zur Induktion der OT in den folgenden Analysen wurde dreimal 20mg OVA pro 20g KG verfüttert, wie es im Abschnitt 2.2.1 beschreiben ist.

3.2. TCDD-Belastung verursacht eine Destabilisierung der OT

Eine stabile OT konnte mit dem beschriebenen Protokoll aus Abschnitt 2.2.1 induziert und auch erfolgreich auf Stabilität getestet werden. Als erstes wurde der AhR mit dem in der Literatur häufig verwendeten 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) aktiviert, um die Auswirkungen von Veränderungen am AhR-Signalweg auf die OT zu testen.

Stefanie Chmill konnte zeigen, dass die Belastung mit TCDD vor der OT-Induktion die OT destabilisiert. Bei ihren Experimenten wurden die Tiere jedoch nur einmal mit TCDD belastet, was zu keiner signifikanten Immunsuppression, wie sie für TCDD typisch ist, führte (Chmill et al., 2010).

Zur Erweiterung dieser Experimente wurde untersucht, ob zusätzliche TCDD-Erhaltungsdosen nach der OT-Induktion und nach der Immunisierung die Toleranz weiter destabilisieren oder ob die immunsuppressive Wirkung von TCDD die Antikörperproduktion zum Erliegen bringt. Außerdem konnte mit der bekannten Wirkung von TCDD auf die OT überprüft werden, ob das verwendete Protokoll zur Überprüfung einer destabilisierten OT geeignet war.

Das hier beschriebene Experiment wurde wie in Abschnitt 2.2.14 angegeben durchgeführt, sodass die Tiere aufgrund von TCDD-Erhaltungsdosen über den gesamten Behandlungszeitraum mit TCDD belastet waren. So war der AhR während der Induktion der OT und auch während der Reaktion auf die Immunisierung persistent aktiviert.

Die α -OVA-IgG1-Konzentration der vier Behandlungsgruppen wurde prozentual auf die DMSO-PBS-Gruppe bezogen, die als Kontrolle für zwei wichtige Punkte diente. Zum einen zur Kontrolle der OT-Induktion und zum anderen zur Bestimmung der Auswirkung der TCDD-Behandlung. Entsprechend wurde diese Gruppe gleich 100% gesetzt. Damit konnte eine direkte Aussage getroffen werden, um wie viel Prozent die jeweilige Behandlung die Antikörperkonzentrationen veränderte. In Abbildung 3-3 sind die prozentualen Antikörper-Titer nach der letzten Verstärkungsinjektion (4°) gezeigt.

Bei den Tieren, die nicht mit OVA gefüttert wurden (PBS-Gruppe), gab es nach den Immunisierungen einen klaren Unterschied zwischen DMSO- und TCDD-Behandlung. Die PBS-TCDD Tiere hatten im Vergleich zu den PBS-DMSO Tieren nur 30,1% \pm 12,1% α -OVA-IgG1 im Blutserum, was eine sehr deutliche Immunsuppression darstellte. Das Immunsystem wurde also durch die TCDD-Erhaltungsdosen in der Reaktion auf Immunisierung und Verstärkungsinjektion stark beeinträchtigt und die Antikörperproduktion war um ca. 70% schwächer.

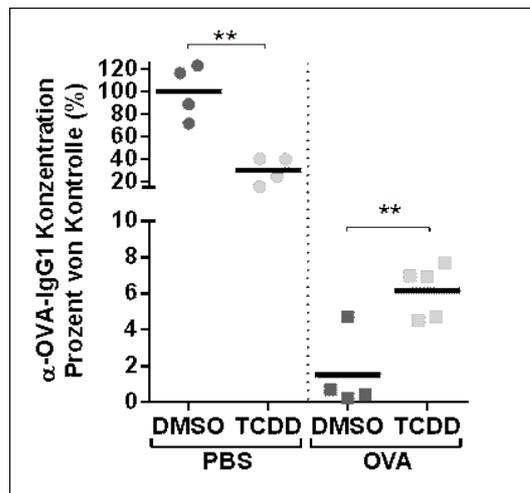


Abbildung 3-3 TCDD-Behandlung destabilisiert OT und führt gleichzeitig zur Immunsuppression

Zur Kontrolle der OT-Induktion erhielten Tiere nur PBS, während die anderen mit OVA gelöst in PBS gefüttert wurden. Um die Auswirkung von TCDD zu überprüfen, wurde jeweils eine Gruppe mit TCDD und eine andere mit dessen Lösungsmittel DMSO behandelt, wodurch vier verschiedene Behandlungsgruppen untersucht wurden. Der relative α -OVA-IgG1-Titer der Kontrollgruppe PBS-DMSO wurde auf 100% gesetzt und die Titer der anderen Gruppen auf diesen bezogen. Die Titer an Tag 47 und somit die Auswirkung der letzten Verstärkungsinjektion werden gezeigt. Jeder Wert (\bullet , \circ , \blacksquare , \square) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist ebenfalls dargestellt. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test für DMSO zu TCDD innerhalb der jeweiligen Gruppe (** \leq 0,01).

Bei den mit OVA gefütterten Tieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der OVA-DMSO und OVA-TCDD-Gruppe. Wie aufgrund der Daten von Stefanie Chmill erwartet, führte die TCDD-Behandlung zu einer stärkeren Antikörperproduktion und somit zu einer Destabilisierung der OT (OVA-DMSO: $1,5\% \pm 2,2\%$; OVA-TCDD $6,2\% \pm 1,4\%$; p-Wert: 0,006).

Mit diesem Versuch konnte zum einen die Beobachtungen von Chmill (2011) bestätigt werden, dass eine TCDD-Behandlung zu einer Destabilisierung der OT führt und zum anderen konnte gezeigt werden, dass durch die TCDD-Erhaltungsdosen im nicht toleranten Zustand eine starke Immunsuppression auftritt.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass ein exogener AhR-Ligand starken Einfluss auf die OT hatte. Auch in unserer Nahrung befinden sich viele AhR-Liganden, die ihn aktivieren. Ob diese Liganden einen Einfluss auf die OT haben, wurde im Folgenden untersucht.

3.3. AhR-ligandenfreie Diät verändert die Stabilität der OT nicht

Die alltägliche Nahrung enthält viele verschiedene AhR-Liganden, die den AhR unterschiedlich stark aktivieren oder auch blockieren können, wodurch die Nahrung den AhR-Signalweg beeinflusst (Jeuken et al., 2003; Nguyen & Bradfield, 2008). Die Überaktivierung des AhR durch einen exogenen Liganden destabilisierte die OT, wodurch sich die Frage stellte, wie sich das Fehlen der natürlichen AhR-Liganden in der Nahrung auf die OT auswirkt. Um dies zu überprüfen, wurde eine AhR-ligandenfreie Diät (ALFD) verfüttert, die synthetisch hergestellt wurde und nicht aus Pflanzenmaterial besteht, sich aber in Energie- und Nährstoffgehalt nicht bedeutsam vom Haltungsfutter unterschied (vgl. Abschnitt 2.2.15).

Die ALFD wurde C57BL/6-Mäusen in einem Alter von 10-13 Wochen gegeben und als Kontrolle erhielten Wurfgeschwister weiterhin das normale Haltungsfutter (ND), welches zum größten Teil aus Getreide besteht (vgl. Abbildung 2-5). Nach 21 Tagen auf der Spezialdiät wurde OVA an die Tiere verfüttert, um die OT zu induzieren bzw. PBS um die Induktion zu überprüfen (vgl. Abschnitt 2.2.15). Die jeweiligen Diäten erhielten die Mäuse über den gesamten Versuchsverlauf, sodass die Tiere mit der ALFD drei Wochen vor OT-Induktion und während der Immunisierung bzw. Verstärkungsinjektionen keine Beeinflussung des AhR durch Liganden aus der Nahrung haben konnten.

Um die Auswirkung der ALFD auf die Aktivität des AhR im Darmgewebe zu untersuchen, wurde die Expression des *ahr* und die von *cyp1a1* bestimmt, welches ein Zielgen des AhR ist (Merchant et al., 1992). Die Ergebnisse der semi-quantitativen-PCR (qPCR) für die Darmabschnitte Jejunum und Ileum sind in Abbildung 3-4 gezeigt und die Werte mit Standardabweichung und Signifikanztest in Tabelle 6-4 im Anhang hinterlegt.

Die Expression des *ahr* war zwischen beiden Darmabschnitten ähnlich und zeigte im Vergleich zwischen den Diäten eine signifikante Reduzierung bei ALFD in der OVA-Gruppe im Jejunum, was als Trend ebenfalls im Ileum gemessen wurde.

Bei allen Tieren auf ALFD wurde signifikant weniger *cyp1a*-Expression gemessen. Das Jejunum zeigte bei den Tieren auf ND eine fast zehnfach höhere *cyp1a1*-Expression als das Ileum, was auf eine stärkere AhR-Aktivität im Jejunum hindeutete.

An Tag 47 des Behandlungsprotokolls, also nach der 4^o Immunisierung, wurde die OT durch den α -OVA-IgG1-Titer im Blutserum untersucht. Um die Unterschiede der verschiedenen Behandlungen deutlicher darzustellen, wurden die Titer prozentual dargestellt. Der Titer der nicht mit OVA gefütterten Tiere, die ND erhielten (PBS-ND), wurde auf 100% gesetzt und die Titer der anderen Gruppen prozentual darauf bezogen (Abbildung 3-5).

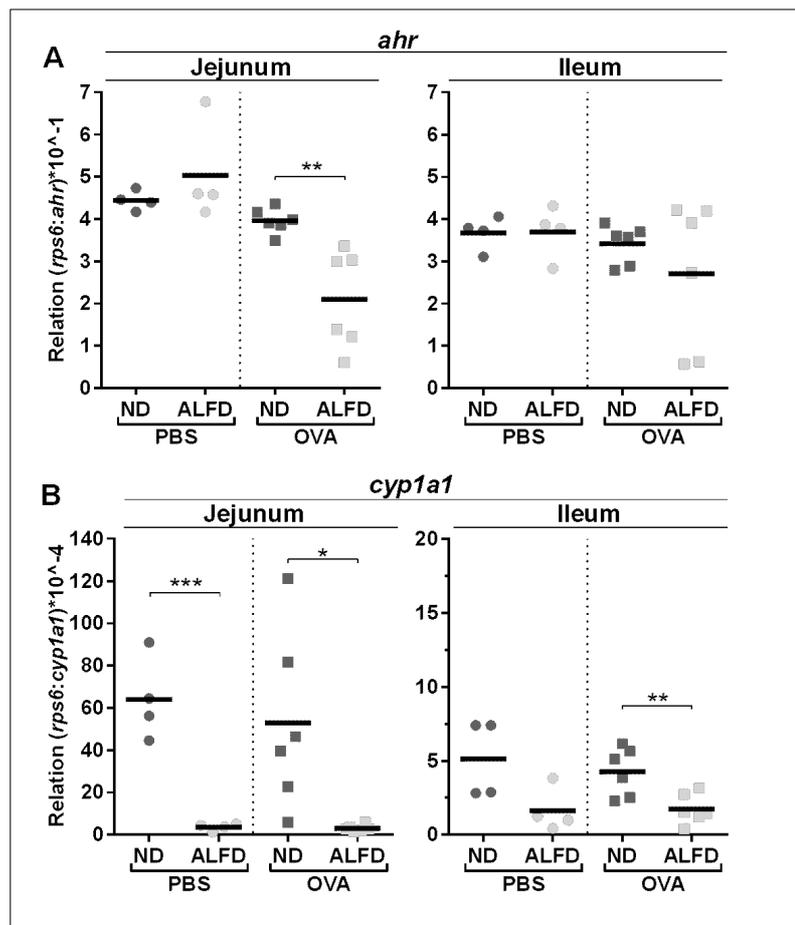


Abbildung 3-4 ALFD beeinflusst die Genexpression von *cyp1a1* und *ahr*

C57BL/6-Mäuse erhielten für eine Dauer von 68 Tagen eine AhR-ligandenfreie Diät (ALFD) bzw. zur Kontrolle die normale Diät (ND). Währenddessen wurden sie auf die Induktion und Stabilität der oralen Toleranz gegen OVA getestet. Anschließend wurde die Expression des *ahr* und dessen Zielgens *cyp1a1* in den Darmabschnitten Jejunum und Ileum per qPCR untersucht. Die Expressionswerte sind im Verhältnis zum Haushaltsgen *rps6* angegeben. Ein Wert (●,○,■,□) entspricht einem Versuchstier, welches für beide Darmabschnitte getestet wurde. Der Mittelwert ist mit dargestellt und die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit dem Student'schen t-Test für ND zu ALFD innerhalb der jeweiligen Gruppe (** ≤ 0,01).

Wie die geringen Antikörpertiter zeigen, waren Mäuse, die vor der Immunisierung mit OVA gefüttert wurden, tolerant. Zwischen den OVA-Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied bei ND und ALFD gemessen. Die ALFD destabilisierte die OT nicht. Vielmehr war sogar ein leichter Trend zu erkennen, dass die ND-Tiere mehr OVA-spezifische Antikörper produzierten als die Mäuse mit ALFD (OVA-ND: 4,1% ±2,08%; OVA-ALFD: 2,22% ±1,05%; p-Wert: 0,119).

Allein schon die Verfütterung einer AhR-ligandenfreien Diät ohne OVA-Verfütterung führte, zu einer leicht geringeren Fähigkeit, nach OVA-Immunisierung Antikörper gegen OVA zu bilden (Abbildung 3-5, PBS-Gruppen). Dieser Effekt war sichtbar, aber nicht signifikant und wird im späteren Abschnitt 4.4 nochmal aufgegriffen und genauer beschrieben (PBS-ND: 100% ±48,3%; PBS-ALFD: 58,6% ±37,2%; p-Wert: 0,098).

Insgesamt zeigte dieses Experiment, dass das Fehlen von AhR-Liganden in der Nahrung keinen Einfluss auf die Stabilität der OT mit dem verwendeten Induktionsprotokoll hat. Dies könnte daran liegen, dass noch genügend AhR-Liganden durch die Mikrobiota gebildet wurden oder dass nur lokal der Darm betroffen war.

Dementsprechend wurde im nächsten Schritt der AhR nicht über Liganden beeinflusst, sondern es wurde untersucht, wie sich ein Fehlen des AhR-Signalwegs im gesamten Körper auf die Stabilität der OT auswirkt.

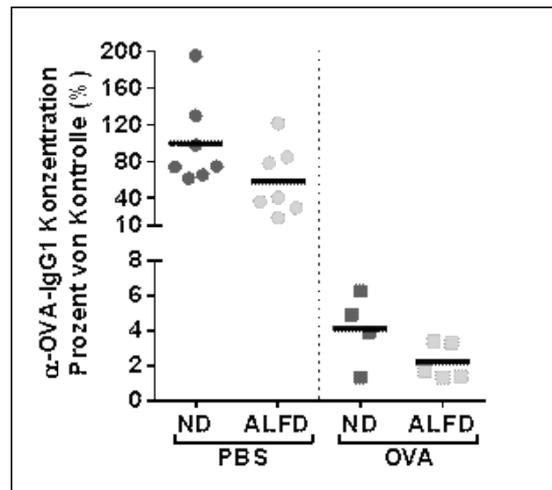


Abbildung 3-5 OT wird durch fehlende AhR-Liganden in der Nahrung nicht beeinflusst
Mäuse der C57BL/6-Linie im Alter von 10-13 Wochen erhielten eine AhR-ligandenfreie Diät (ALFD) und Wurfgeschwister bekamen weiterhin die normale Diät (ND). Mit der Fütterung der Diäten wurde bereits 21 Tage vor der Toleranzinduktion gegen OVA- bzw. vor PBS-Gabe an die Kontrolltiere begonnen. Die Stabilität der OT wurde durch den α -OVA-IgG1-Titer im Blutserum an Tag 47 bestimmt. Der Antikörpertiter der Kontrolltiere mit ND wurde auf 100% gesetzt und die anderen auf diesen bezogen. Jeder Wert (●, ●, ■, ■) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist mit dargestellt. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test für ND zu ALFD innerhalb der jeweiligen Gruppe. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

3.4. Auswirkungen einer systemischen AhR-Defizienz

Um zu untersuchen, welche Auswirkung der Verlust des AhR-Signalweges im gesamten Körper hat, wurden für den OT-Versuch genetisch veränderte Mäuse verwendet. Bei den AhR-*full-knockout* Mäusen (AhR-Ko) fehlt das Exon 2 des *ahr*-Gens. Dadurch weisen diese Tiere keine AhR-Aktivität mehr auf, wodurch sie z.B. unempfindlich gegenüber TCDD sind (Schmidt et al., 1996).

Vor dem OT-Versuch wurde ein Vergleich von AhR-Ko Mäusen und Wt-Wurfgeschwistern im naiven, also unbehandelten, Zustand durchgeführt. Dadurch sollte geklärt werden, welchen Einfluss die AhR-Defizienz auf Immunzellen, die für die OT von Bedeutung sind, im Darm und im MLN hat.

3.4.1. Untersuchung von naiven AhR-Ko Tieren

3.4.1.1. Die Frequenz OT relevanter $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmepithel oder den CD103 DCs in der Lamina Propria wird durch AhR-Defizienz verändert

Als erstes wurden zwei Zellpopulationen bei AhR-Ko Mäusen betrachtet, die für die OT sehr wichtig sind, $\gamma\delta$ T-Zellen und CD103 DCs. Die $\gamma\delta$ T-Zellen gehören zu den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und beeinflussen die Barrierefunktion des Epithels durch Sezernierung verschiedener Botenstoffe. Sie produzieren den Keratinozyten-Wachstums-Faktor (KGF), der für das Zellwachstum und das Milieu im Darmgewebe wichtig ist (Boismenu & Havran, 1994). Es wurde gezeigt, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen im AhR-Ko stark reduziert sind (Kadow et al., 2011; Y. Li et al., 2011) und eine OT in $\gamma\delta$ T-Zell-defizienten Tieren nicht induziert werden kann (Ke et al., 1997).

Um diese Veränderung der Lymphozyten-Zusammensetzung im Dünndarm bei AhR-Defizienz zu bestätigen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der IELs von AhR-Ko und AhR-Wt Tieren durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen bei den AhR-Ko Tieren stark reduziert waren, was in Abbildung 3-6-A gezeigt wird (AhR-Wt: 41,8% \pm 11,2%; AhR-Ko: 16,0% \pm 5,6%; p-Wert: <0,001). Diese Reduktion bezog sich aber nur auf die T-Zellsubpopulation der $\gamma\delta$ T-Zellen, denn die CD3 Zellen waren zwischen den Genotypen nicht verändert (Abbildung 3-6-B; AhR-Wt: 45,4% \pm 10,4%; AhR-Ko: 9,5% \pm 6,6%; p-Wert: 0,444).

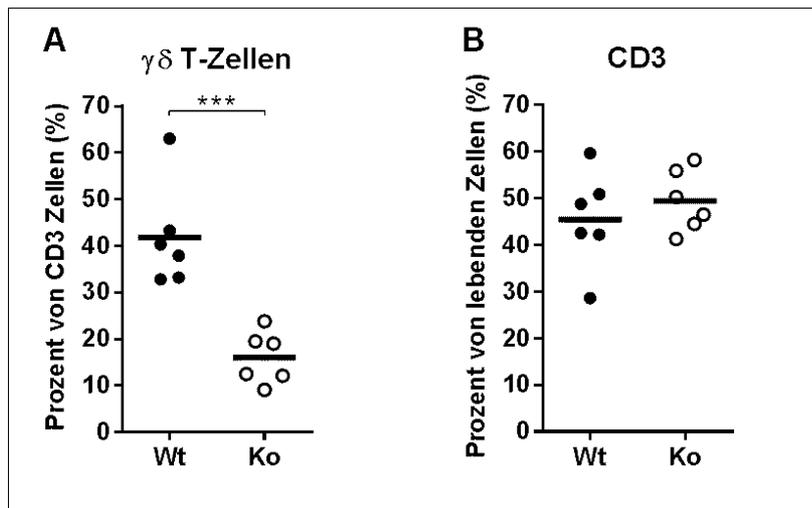


Abbildung 3-6 AhR-Defizienz führt zur Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen in der IEL-Fraktion
 Die intestinale Epithelschicht des Dünndarms wurde zusammen mit den darin liegenden IELs isoliert und am Durchflusszytometer untersucht. Ein Wert (●,○) entspricht einem Tier, welches auf $\gamma\delta$ T-Zellen und CD3 Zellen hin untersucht wurde und der Mittelwert ist mit dargestellt. **A)** Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden durch CD3 und den $\gamma\delta$ TCR definiert und der prozentuale Anteil an allen CD3 Zellen wird dargestellt. **B)** Der prozentuale Anteil der CD3 Zellen von allen lebenden Zellen in der Messung wird gezeigt. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test (***) ($\leq 0,001$).

Wenn die Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen reduziert ist, könnte dies Auswirkungen auf andere Zellen haben, die auf deren Botenstoffe angewiesen sind. So stimuliert KGF z.B. die Produktion von GM-CSF bei Epithelzellen, welches wiederum wichtig für die Entwicklung und Funktionalität von z.B. dendritischen Zellen (DCs) in der LP ist (Yaping Chen et al., 2002). Für die Induktion der OT sind DCs notwendig (Pabst & Mowat, 2012; Worbs et al., 2006) und eine besondere DC-Subpopulation des Darms sind CD103 DCs (Bogunovic et al., 2009). CD103 kann als Marker für reife DCs verwendet werden, die aufgenommene Antigene präsentieren. In den Analysen wurden DCs durch CD11c und MHCII definiert und der Anteil von CD103 DCs von AhR-Wt (grün) und AhR-Ko (rot) gemessen (Abbildung 3-7). In der LP wurden signifikant mehr DCs bei AhR-Ko Mäusen im Vergleich zu ihren Wt-Wurfgeschwistern gemessen. Auch der prozentuale Anteil der CD103 DCs an allen DCs ist in den AhR-Ko Mäusen leicht erhöht, allerdings ohne dabei signifikant zu sein (p-Wert: 0,167) (Abbildung 3-8-A).

CD103 DCs befinden sich in der LP und wandern nach Antigenaufnahme in die ableitenden Lymphknoten, wo sie für die Generierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und die Induktion der OT notwendig sind (Siddiqui & Powrie, 2008). Um die Auswanderung in die mesenterialen Lymphknoten (MLN) zu überprüfen, wurden diese ebenfalls analysiert (Abbildung 3-8-B). Hier wurden keine Unterschiede in der Anzahl von DCs und CD103 DCs zwischen AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern gefunden.

Es konnte gezeigt werden, dass die AhR-Defizienz sowohl zu einer Verringerung der $\gamma\delta$ T-Zellen, als auch zu einem Anstieg der CD103 DC im Dünndarm führt. Beide Zelltypen

sezernieren verschiedene Botenstoffe, die für das Milieu im Darmgewebe wichtig sind, weswegen diese im Weiteren untersucht wurden.

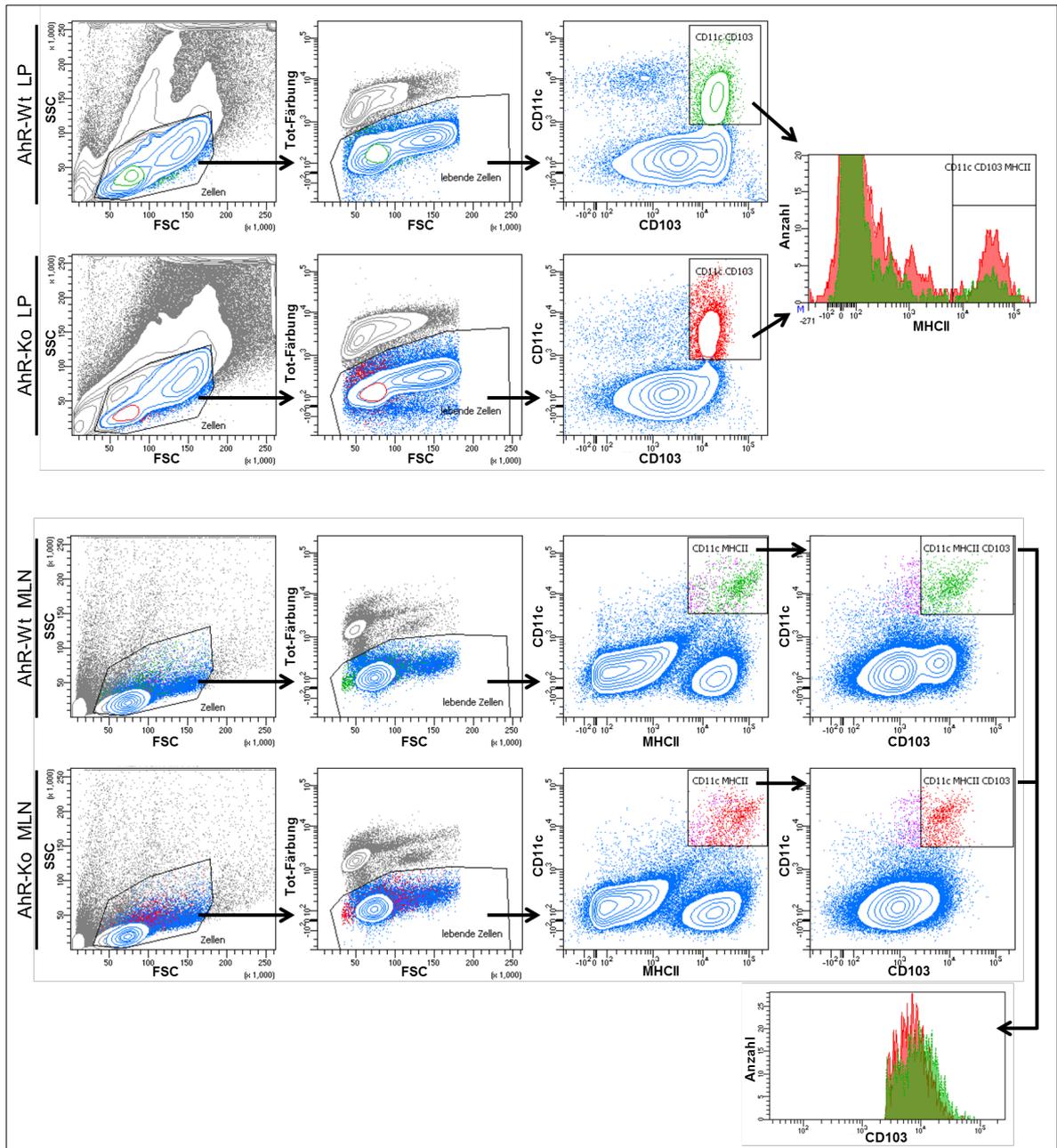


Abbildung 3-7 Bestimmung der Zellanzahl von CD103 DCs in LP und MLN bei AhR-Wt und AhR-Ko Dargestellt ist die Zell-Auswahl-Strategie (*gating strategy*) einer Durchflusszytometer-Analyse von repräsentativen Beispielen der LP und der MLN von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern zur Bestimmung der CD103 DCs. Durch eine Gradientenzentrifugation wurden die Immunzellen der LP zuvor angereichert. Die einzelnen Zellauswahlen bauen aufeinander auf, sodass im darauffolgenden Dotplot nur die zuvor ausgewählten Zellen dargestellt werden, was durch die Pfeile verdeutlicht wird. Dabei wurden zuerst Immunzellen anhand der Größe und Zellgranularität bestimmt (Zellen), aus denen nur die lebenden Zellen mit Hilfe einer Lebend-Tot-Färbung weiter betrachtet wurden. Bei den lebenden Zellen wurden DCs durch CD11c und MHCII Expression definiert und der Anteil von CD103 DCs gemessen. Das Histogramm am Schluss zeigt die CD103 Frequenzintensität der so definierten DCs im Vergleich von AhR-Wt (grün) und AhR-Ko (rot).

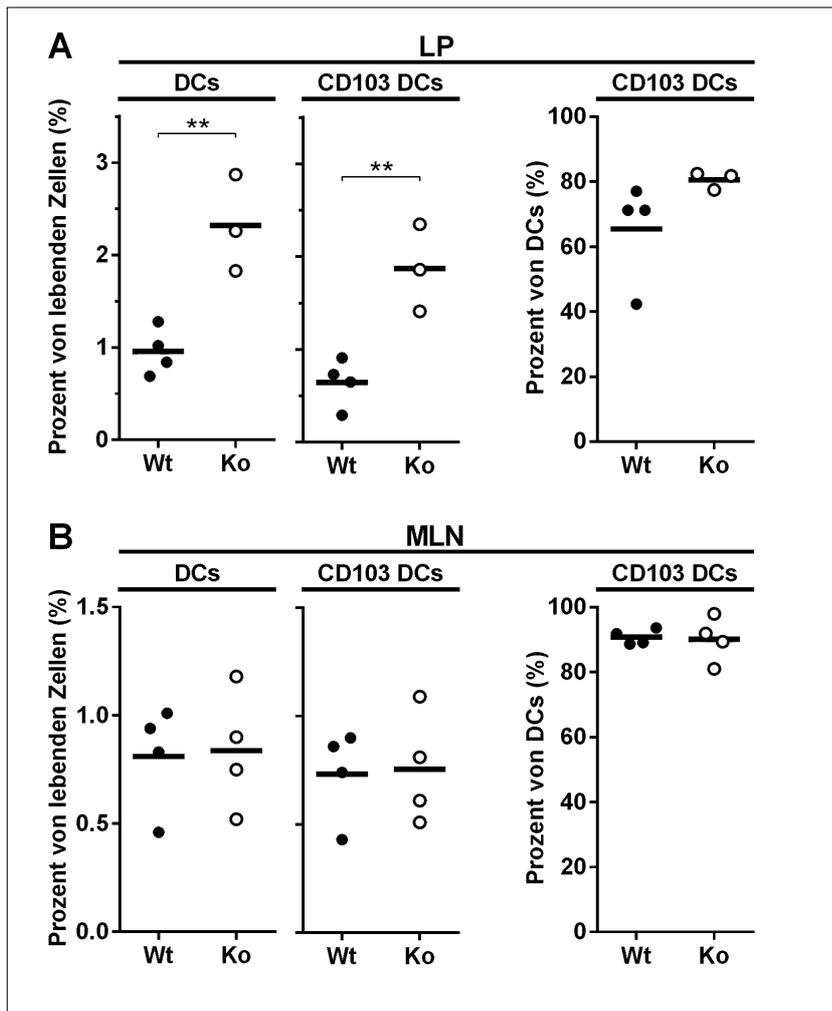


Abbildung 3-8 Erhöhung der CD103 DC-Anzahl in der LP von AhR-Ko Mäusen
 Analysen der DCs von mesenterialen Lymphknoten (MLN) und der Lamina propria (LP) von AhR-Ko Mäusen und Wt-Wurfgeschwistern. Jeder Wert (●,○) entspricht einem Versuchstier, dessen LP und MLN auf DCs (CD11c MHCII) und CD103 DCs hin untersucht wurden. Der Mittelwert ist mit dargestellt und die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (** ≤ 0,01).

3.4.1.2. KGF und Teile dessen Signalweges werden nicht unterschiedlich in AhR-Ko Dünndarmgewebe exprimiert

Um zu prüfen, ob durch die Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm auch die Expression von KGF im Darmgewebe von AhR-Ko Tieren beeinträchtigt ist, wurden die Expression von *kgf*, seines Rezeptors *fgfr2IIIb* und von *gm-csf* per qPCR betrachtet. Bei Darmzellen stimuliert KGF die Expression von GM-CSF (Yaping Chen et al., 2002), welches wiederum die Produktion von Retinsäure bei CD103 DCs fördert, die dadurch die Expression von FoxP3 bei T-Zellen stimulieren (Yokota et al., 2009). Somit haben KGF und GM-CSF Einfluss auf die Förderung von Tregs und die Induktion einer OT.

Weil der Dünndarm drei morphologisch unterschiedliche Abschnitte besitzt (Duodenum, Jejunum und Ileum), wurden diese für die Genexpressionsanalyse einzeln betrachtet (vgl. Abschnitt 1.1.1).

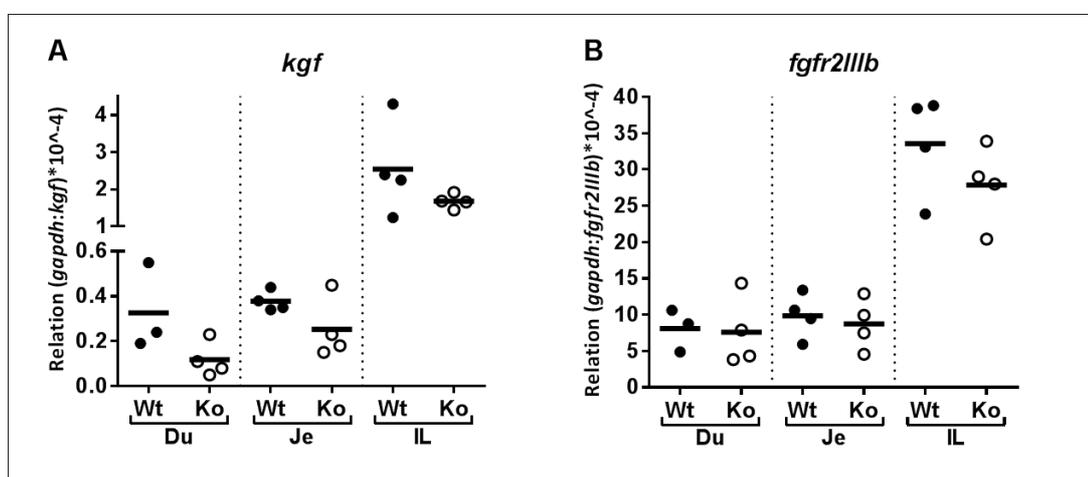


Abbildung 3-9 Expression von *kgf* und *fgfr2IIIb* ist durch AhR-Defizienz nicht verändert
Das Gewebe der einzelnen Dünndarmabschnitte von AhR-Wt und AhR-Ko wurde per qPCR untersucht. Die Expression von *kgf* und *fgfr2IIIb* mRNS ist im Verhältnis zu dem Haushaltsgen *gapdh* dargestellt. Die Darmabschnitte (Du: Duodenum, Je: Jejunum, IL: Ileum) jeweils eines Tieres (●,○) wurden analysiert und der Mittelwert ist mit angegeben. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test.

In Abbildung 3-9-A wird die Expression der *kgf* mRNS für AhR-Wt und AhR-Ko dargestellt. Die zugehörigen Werte mit Standardabweichung und Signifikanztest sind im Anhang in Tabelle 6-8 hinterlegt. Die Expression von *kgf* wurde in allen drei Darmabschnitten im AhR-Ko nur geringfügig und nicht signifikant im Vergleich zu Wt-Wurfgeschwistern vermindert. Im Duodenum und Jejunum war die Expressionsstärke von *kgf* ähnlich, während sie im Ileum ca. sechsmal so hoch war. Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die starke Reduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen im Dünndarm nur einen geringen Einfluss auf die *kgf*-Expression hat.

KGF bindet an den Rezeptor FGFR2IIIb, welcher durch alternatives Spleißen von *fgfr2* entsteht (Ornitz & Itoh, 2015). Auch bei diesem Rezeptor wurden zwischen AhR-Wt und AhR-Ko keine Unterschiede in der Genexpressionsstärke bei den drei verschiedenen Darmabschnitten gemessen (Abbildung 3-9-B). Die Expressionsstärke von *fgfr2IIIb* zeigte das gleiche Muster wie *kgf* mit einer ähnlichen Stärke in Duodenum und Jejunum, aber einer ca. dreimal höheren Expression im Ileum.

Die Expression von *gm-csf* wird in Abbildung 3-10 dargestellt und zeigte im Duodenum und Ileum von AhR-Ko Mäusen eine leichte Erhöhung, aber auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant. Interessanterweise zeigte sich die *gm-csf* Expression im Jejunum deutlich geringer als in den beiden anderen Darmabschnitten, obwohl im Jejunum jeweils die höchste Menge an mRNA von *kgf* und dessen Rezeptor gemessen wurde.

Weil das Verhältnis von mRNA und vorhandenem Protein nicht zwingend linear verläuft, wurde auch die Proteinkonzentration von GM-CSF gemessen (Koussounadis et al., 2015).

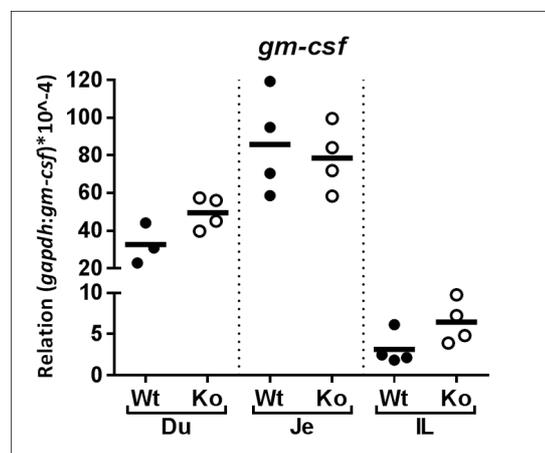


Abbildung 3-10 *gm-csf* Expression wird durch AhR-Defizienz nicht beeinflusst
 Expressionsanalyse der *gm-csf* mRNA in einzelnen Abschnitten des Dünndarms von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern, wobei die Expression des Zielgens im Verhältnis zum Haushaltsgen *gapdh* dargestellt wird. Die Darmabschnitte (Du: Duodenum, Je: Jejunum, IL: Ileum) jeweils eines Tieres (●,○) wurden analysiert und der Mittelwert ist mit angegeben. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test.

3.4.1.3. *ex vivo* GM-CSF Produktion der verschiedenen Darmabschnitte zeigt keinen Unterschied zwischen AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern

In der Untersuchung der Genexpression von *gm-csf* sind nur geringe Unterschiede festgestellt worden. Weil GM-CSF aber wichtig für die Induktion der OT ist, wurde die Konzentration von GM-CSF in den einzelnen Dünndarmabschnitten bestimmt. CD103 DCs benötigen den GM-CSF Stimulus für die Produktion von Retinsäure, welche wiederum für die Differenzierung von Treg nötig ist (Yokota et al., 2009).

Um zu untersuchen, ob GM-CSF im Dünndarm von AhR-Ko Mäusen unterschiedlich produziert wird, wurden die verschiedenen Dünndarmabschnitte *ex vivo* in Kultur gehalten und der Mediumüberstand auf die Konzentration des Proteins hin untersucht und mit Wt-Wurfgeschwistern verglichen. Dabei wurde darauf geachtet, dass immer gleich große Gewebestücke in gleicher Menge Medium inkubiert wurden, um die Abschnitte miteinander vergleichen zu können. Die GM-CSF Konzentrationen waren bei allen drei Darmabschnitten ähnlich, wobei das Duodenumgewebe die höchste Sezernierung zeigte.

Bei den verschiedenen Dünndarmabschnitten unterschieden sich die Gewebe von AhR-Ko und den Wt-Wurfgeschwistern nicht signifikant in der Sezernierung von GM-CSF (Tabelle 6-9 und Abbildung 3-11). Somit ergab sich aus diesem Ergebnis, dass das Zytokin-Milieu in der LP zwischen AhR-Wt und AhR-Ko in Bezug auf die GM-CSF Konzentration nicht unterschiedlich war.

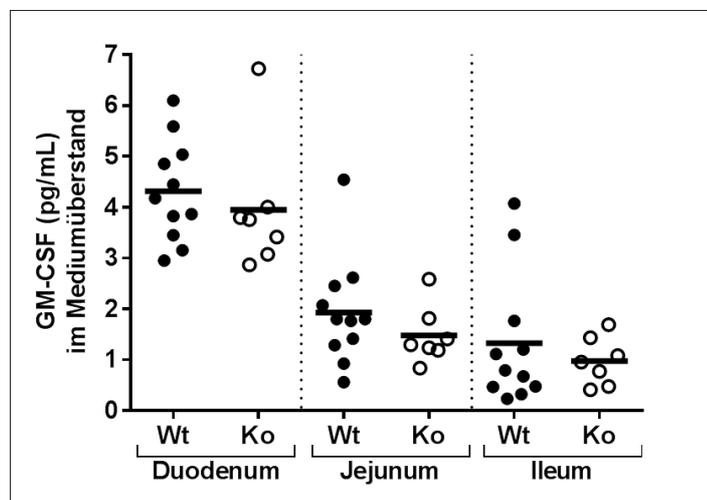


Abbildung 3-11 GM-CSF Sezernierung in *ex vivo* Kultur zeigt keinen Unterschied bei AhR-Defizienz
Gleich große Stücke der verschiedenen Dünndarmabschnitte wurden direkt nach der Präparation *ex vivo* für 4h in Kultur gehalten. Die GM-CSF Konzentration im Mediumüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Darmabschnitte (Du: Duodenum, Je: Jejunum, IL: Ileum) jeweils eines Tieres (●,○) wurden analysiert und der Mittelwert ist mit angegeben. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test.

3.4.1.4. Genexpressionsanalyse von Zytokinen im Dünndarmgewebe

Neben GM-CSF, bei dem keine signifikanten Unterschiede zwischen AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern festgestellt wurden, sind noch weitere Faktoren für das Zytokin-Milieu von Bedeutung.

Interleukin 10 (IL10) und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β) sind zwei sehr wichtige entzündungshemmende Faktoren, die für die Induktion der OT notwendig sind (Faria et al., 2003) und deren Expression AhR-abhängig reguliert werden kann (Apetoh et al., 2010; Zaher et al., 1998).

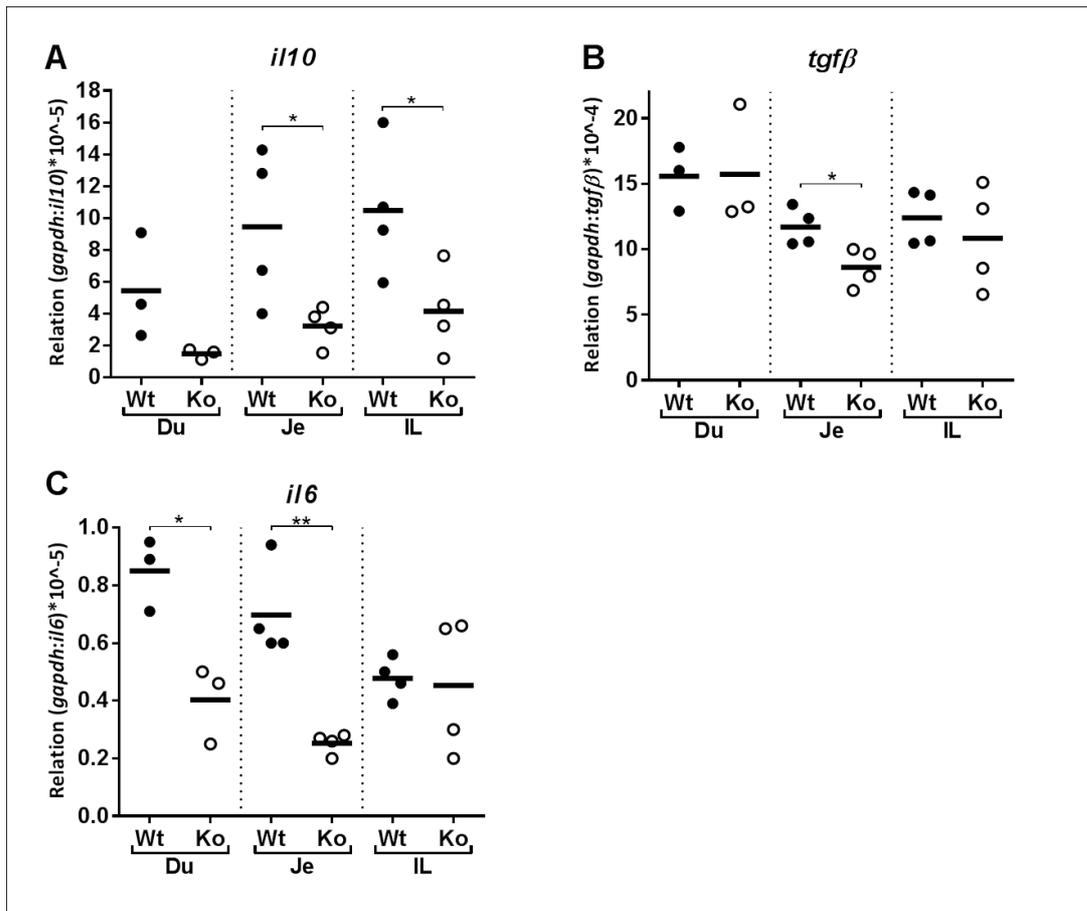


Abbildung 3-12 Gendelektion des AhR führt zur Änderung der Zytokin-Genexpression

In den drei verschiedenen Abschnitten des Dünndarms von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern wurde per qPCR die Genexpression von verschiedenen Zytokinen gemessen und im Verhältnis zum Haushaltsgen *gapdh* angegeben. Von jedem einzelnen Tier (●,○) wurden die Darmabschnitte (Du: Duodenum, Je: Jejunum, IL: Ileum) analysiert. Der Mittelwert ist mit angegeben und die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (* $\leq 0,05$ / ** $\leq 0,01$).

In Abbildung 3-12 ist zu sehen, dass sowohl *il10* als auch *tgfb* im Dünndarm von AhR-Ko Tieren geringer exprimiert wurden als in Wt-Wurfgeschwistern. Eine signifikant unterschiedliche Expression war für *il10* im Jejunum und Ileum und für *tgfb* nur im Jejunum gemessen worden.

Neben IL10 und TGFβ als anti-inflammatorische Zytokine wurde auch das pro-inflammatorische IL6 analysiert, welches bei Entzündungsreaktionen hochreguliert ist und Lymphozyten rekrutiert. Weiterhin inhibiert IL6 zusammen mit TGFβ die Bildung von Treg (Bettelli et al., 2006). Die Analyse zeigte, dass im Gewebe von Duodenum und Jejunum bei AhR-Ko Mäusen auch *il6* signifikant weniger und im Ileum-Abschnitt *il6* nicht verändert exprimiert wurde (Abbildung 3-12-C).

Die gemessenen Expressionswerte für die drei Darmabschnitte sind zusammen mit den Standardabweichungen und Signifikanztests von *il10*, *tgfb* und *il6* in Tabelle 6-10 im Anhang angegeben.

Es wurde gezeigt, dass die Expression von wichtigen Zytokinen für das anti-inflammatorische Milieu im Dünndarmgewebe von AhR-Ko Mäusen verändert war. Interessanterweise waren nicht nur *il10* und *tgfb* schwächer exprimiert, was eine eher entzündliche Reaktion vermuten ließ, sondern auch *il6* wurde unter AhR-Defizienz geringer exprimiert. Diese Zytokine haben einen starken Einfluss auf die im Gewebe befindlichen T-Zellen, weshalb sich die Frage stellte, ob diese unter AhR-Defizienz verändert vorliegen.

3.4.1.5. T-Zellen werden durch AhR-Defizienz nur gering beeinflusst

Eine weitere Zellpopulation neben den DCs, die für die Induktion und Stabilität der OT notwendig ist, bilden die T-Zellen. In der IEL-Fraktion wurden schon die $\gamma\delta$ T-Zellen betrachtet (Abbildung 3-6) und die Faktoren für die Bildung von Treg im Darmgewebe (IL10 und TGF β , Abbildung 3-12) untersucht.

Inwieweit die AhR-Defizienz Auswirkungen auf T-Zellen in der LP und den MLN hat, wurde in einer Durchflusszytometer-Analyse untersucht. In beiden Organen wurde bei CD4 Zellen die Expression von FoxP3 für regulatorische T-Zellen (CD4 FoxP3) und die von IL17a für Th17 Zellen (CD4 IL17a) betrachtet.

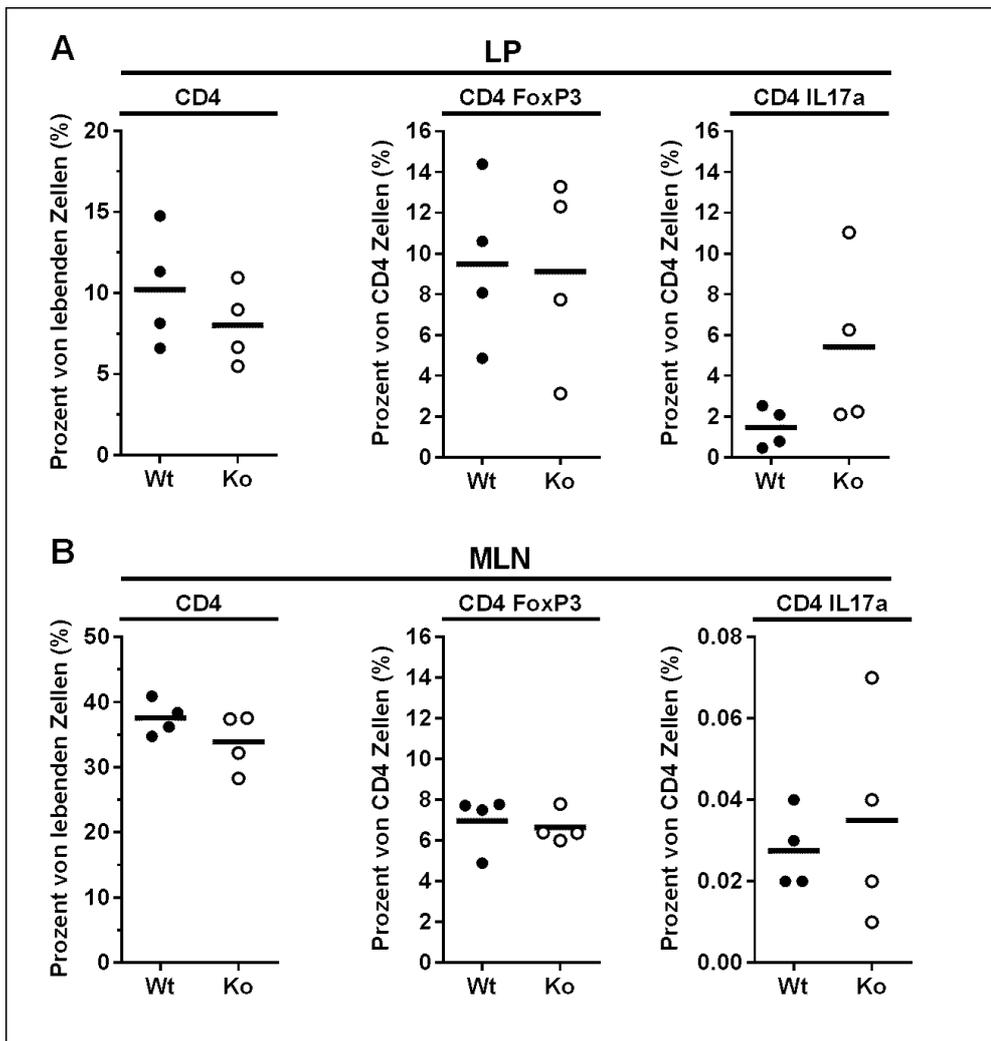


Abbildung 3-13 AhR-Defizienz verändert weder die Treg noch die Th17 Zellanzahl in LP und MLN T-Zellen wurden aus den MLN und der LP von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern wie im Methodenteil erläutert (2.2.4 bzw. 2.2.6) isoliert und vor der Durchflusszytometer-Analyse für CD4, FoxP3 und IL17a gefärbt. Vier AhR-Wt (●) und vier AhR-Ko (○) Mäuse wurden untersucht. Der Mittelwert ist mit angegeben und die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (** $\leq 0,01$). Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches von zwei unabhängigen Experimenten, die beide denselben Trend zeigten.

In Abbildung 3-13 werden die CD4 Zellen in der LP und den MLN in Bezug auf alle gemessenen lebenden Zellen gezeigt, wobei eine leichte, aber nicht signifikante Reduzierung an CD4 Zellen im AhR-Ko auffiel. Die Expression von FoxP3 bzw. IL17a bei CD4 Zellen wurde auf alle gemessenen CD4 Zellen bezogen, um zu überprüfen, ob deren Anteil bei T-Zellen verändert war. In beiden Organen wurde kein Unterschied in der Häufigkeit der regulatorischen CD4 FoxP3 Zellen gemessen. Im Gegensatz dazu wurde bei den CD4 IL17a Zellen eine leichte, allerdings nicht signifikant Erhöhung der Zellanzahl beobachtet.

In dieser Analyse wurde gezeigt, dass die AhR-Defizienz nur geringfügig die Frequenz von FoxP3 oder IL17a bei T-Zellen in LP oder MLN verändert. Es ist anzumerken, dass unbehandelte Mäuse genutzt wurden, die nicht immunologisch belastet waren. Dies ist ein Unterschied zu den Analysen in Abschnitt 3.4.2.2, bei denen die Tiere zuvor mehrfach immunisiert worden waren.

3.4.2. systemische AhR-Defizienz führt zu einer instabilen OT

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Überaktivierung des AhR durch TCDD, nicht aber der Entzug von AhR-Liganden aus der Nahrung, zu einer Verschlechterung der OT in Form einer verstärkten α -OVA-IgG1-Produktion führte. Die AhR-Defizienz in AhR-Ko Mäusen führte zu einer starken Erhöhung an CD103 DCs bei gleichzeitiger Verringerung an $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmgewebe, wohingegen die Expressionen von *kgf* und *gm-csf* keine deutlichen Veränderungen zeigten. Weiterhin waren die Expression von *il10* als auch von *il6* im AhR-Ko verringert, was aber keine Veränderung der Anzahl von Treg oder Th17 Zellen bewirkte.

Um zu überprüfen, ob diese verschiedenen Veränderungen im AhR-Ko zusammen eine Auswirkung auf die OT haben, wurden AhR-Ko Mäuse und deren Wt-Wurfgeschwister nach dem OT-Protokoll aus Abschnitt 2.2.1 behandelt und die Stabilität der OT durch den α -OVA-IgG1-Titer bestimmt.

In Abbildung 3-14 ist die Antikörper-Konzentration der vier Gruppen in prozentualem Bezug auf die PBS-Wt Kontrolle für den Behandlungstag 47 dargestellt. Innerhalb der PBS-Kontrollgruppe unterschieden sich AhR-Wt und AhR-Ko Mäuse nicht signifikant, wobei aber AhR-Ko Mäuse zu einer leicht schwächeren Antikörperproduktion neigten (PBS-Wt: 100% \pm 40,2%; PBS-Ko: 76,6% \pm 26,9%; p-Wert: 0,185). Ob der etwas geringere Titer bei PBS-Ko eine biologische Relevanz hat, soll später in Abschnitt 4.4 noch genauer betrachtet werden.

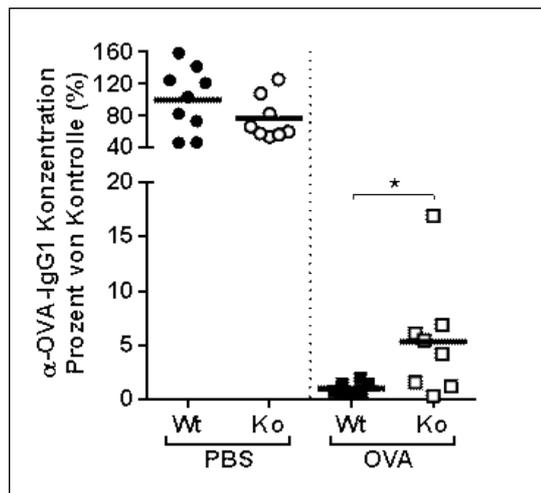


Abbildung 3-14 AhR-Ko Mäuse zeigen eine destabilisierte orale Toleranz

In der PBS-Gruppe erhielten AhR-Ko Mäuse und Wurfgeschwister nur PBS, während bei den Tieren der OVA-Gruppe durch i.g. OVA-Gabe die orale Toleranz induziert wurde. Alle Tiere wurden immunisiert und erhielten Verstärkungsinjektionen. Der α -OVA-IgG1-Titer an Tag 47 wird gezeigt. Der relative Antikörpertiter der PBS-Wt Tiere wurde auf 100% gesetzt und die anderen auf diesen bezogen. Jeder Wert (\bullet , \circ , \blacksquare , \square) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist mit dargestellt. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test für Wt zu Ko innerhalb der jeweiligen Gruppe (* $\leq 0,05$). Die Daten sind aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Die mit OVA gefütterten Wt-Mäuse zeigten eine sehr geringe Menge an OVA-spezifischen IgG1 im Blutserum, was eine stabil induzierte OT verdeutlichte. Die AhR-defizienten Wurfgeschwister hingegen hatten trotz der OT-Induktion einen signifikant erhöhten α -OVA-IgG1-Titer im Vergleich zu ihren toleranten Wt-Wurfgeschwistern (OVA-Wt: 1,0% \pm 0,5%; OVA-Ko: 5,3% \pm 5,3%; p-Wert: 0,037) (Abbildung 3-14). Die erhöhte Antikörperproduktion bei AhR-Ko Tieren zeigt, dass unter AhR-Defizienz die OT destabilisiert wurde. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die LP und die MLN dieser behandelten Tiere per Durchflusszytometer analysiert.

3.4.2.1. DCs und CD103 DCs sind am Ende eines OT-Versuch nur noch tendenziell in AhR-Ko Mäusen erhöht

In Kapitel 3.4.1.1 und 3.4.1.5 wurden die DCs und T-Zellen von naiven AhR-Wt und AhR-Ko Mäusen untersucht, wobei die deutlichsten Unterschiede eine starke Reduzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen und eine Erhöhung von DCs bzw. CD103 DCs im Darm waren.

Während des OT-Versuches mit AhR-defizienten Mäusen wurde deren Immunsystem mehrfach durch i.p. Injektionen mit OVA und CFA bzw. IFA stimuliert. Um nun zu untersuchen, ob sich die Anzahl der DCs und T-Zellen und deren Expression von OT relevanten Molekülen durch die Behandlung im Rahmen des OT-Versuches verändert haben, wurden die Zellen der LP und MLN bei diesen Tieren untersucht.

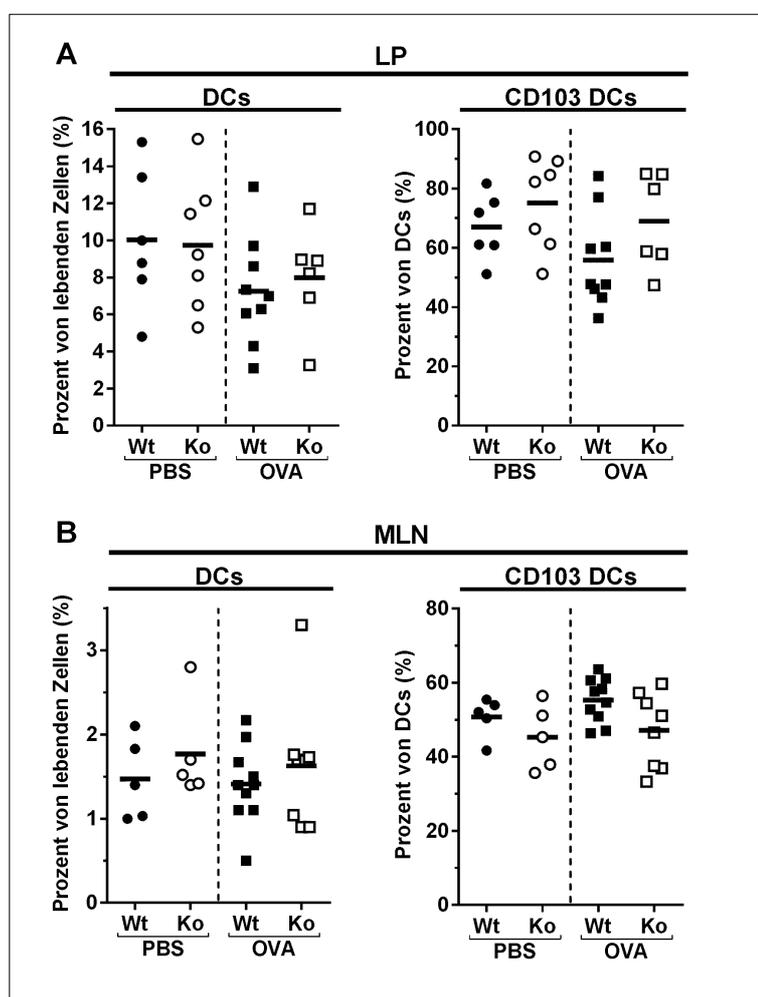


Abbildung 3-15 Verteilung der DCs und CD103 DCs am Ende eines OT-Experimentes bei AhR-Ko Tieren Am Ende des OT-Versuches wurden die LP und die MLN isoliert und am Durchflusszytometer auf die Verteilung von DCs (CD11c MHCII) und die Expression von CD103 analysiert. Jeder Wert (●,○,■,□) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist mit dargestellt. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst und mit den p-Werte in Tabelle 6-13 angegeben.

Am Ende des OT-Protokolls war die Erhöhung von DCs und der Anteil von CD103 DCs in der LP von AhR-Ko Mäusen im Vergleich zu Wt-Wurfgeschwistern nur als Trend zu sehen, dies aber unabhängig von PBS- oder OVA-Gruppe (Abbildung 3-15, p-Werte sind in Tabelle 6-13 hinterlegt). Im Vergleich PBS- zur OVA-Gruppe zeigen die Tiere der OVA-Gruppe in der LP weniger DCs, aber dies auch nicht signifikant (Abbildung 3-15).

Im MLN war der Trend zu beobachten, dass AhR-Ko Mäuse mehr DCs, aber eine Verminderung an CD103 DCs besaßen. Diese Verminderung war in der PBS- und OVA-Gruppe gleichermaßen vorhanden.

Zusammenfassend waren also keine starken Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Gruppen am Ende eines OT-Versuchs für die DCs und die CD103 DCs zu sehen (Abbildung 3-15).

3.4.2.2. Treg und Th17 Zellen sind am Ende eines OT-Versuches im AhR-Ko verringert

In der LP von AhR-Ko Mäusen waren am Ende des OT-Versuches eine geringere Häufigkeit von Treg (CD4 FoxP3), aber auch Th17 Zellen (CD4 IL17a) als in AhR-Wt Mäusen vorhanden. In der LP ist der Mittelwert der Frequenz von CD4 Zellen bei AhR-Ko Mäusen kleiner als bei AhR-Wt Mäusen. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant, trat aber bei der PBS- und OVA-Gruppe gleichermaßen auf (Abbildung 3-16-A, p-Werte: PBS-Gruppe: 0,624; OVA-Gruppe: 0,483; vgl Tabelle 6-14).

Im MLN war die Häufigkeit von Treg und Th17 Zellen in allen Gruppen ähnlich. Bei der OVA-Wt-Gruppe wurden von allen lebenden Zellen im MLN signifikant mehr CD4 Zellen gemessen, als bei den PBS-Wt Tieren (Abbildung 3-16-B). Wie bei den DCs waren auch bei den T-Zellen keine starken Unterschiede zwischen AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern am Ende des OT-Versuches gemessen worden.

Daraufhin wurde die naive Situation mit der Situation nach einem OT-Versuch verglichen, um die dadurch entstanden Veränderungen genauer betrachten zu können.

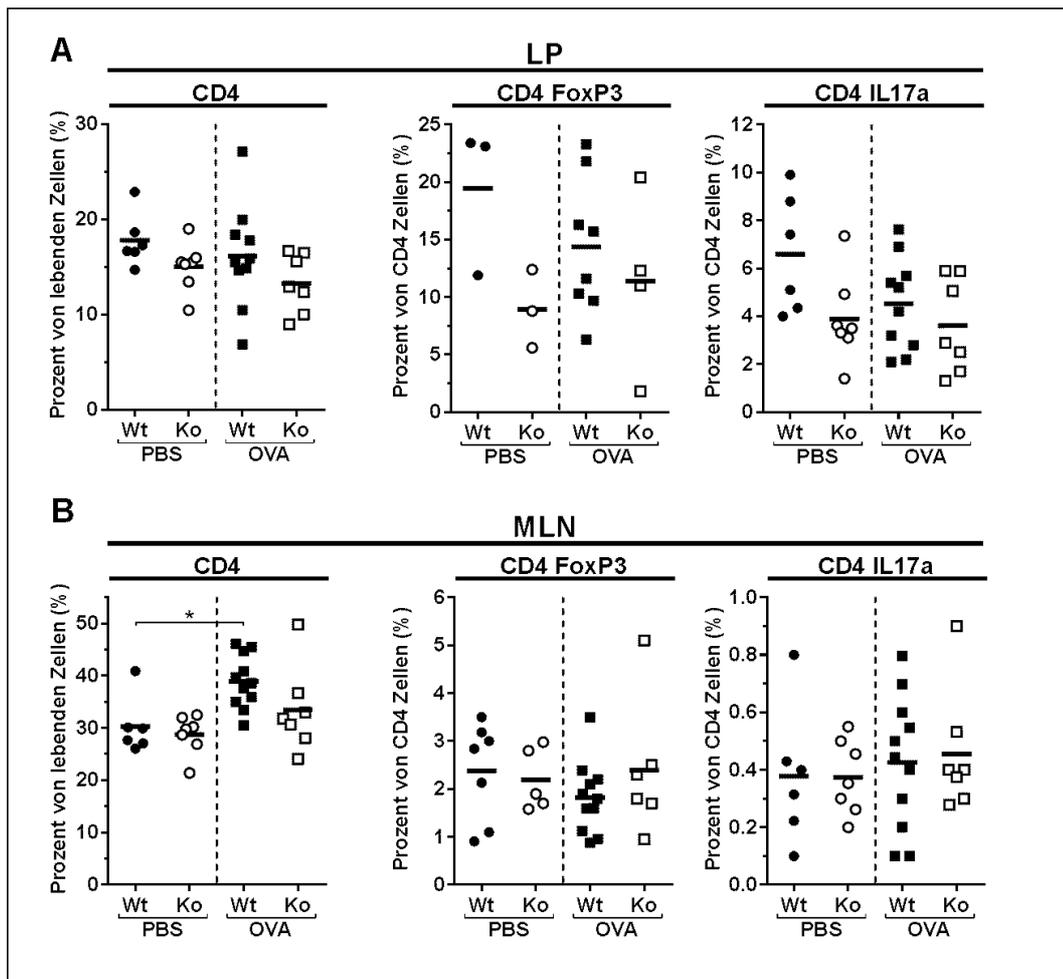


Abbildung 3-16 Analyse von T-Zellen am Ende des OT-Versuchs bei AhR-Ko
 Die LP und MLN wurden am Ende des OT-Versuches aus AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern isoliert und per Durchflusszytometrie auf die Verteilung von CD4 Zellen und deren Expression von FoxP3 bzw. IL17a untersucht. Jeder Wert (●,○,■,□) entspricht einem Versuchstier. Der Mittelwert ist als Querstrich dargestellt. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet (* ≤ 0,05). Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

3.4.2.3. Bei AhR-Ko Mäusen führt der OT-Versuch zur Erhöhung der Frequenz von DCs und Th17 Zellen, aber nicht von Treg

In diesem Kapitel sollen die Immunzellen von naiven Tieren (Kapitel 3.4.1.1 und 3.4.1.5) mit denen von OT-Versuchstieren (Kapitel 3.4.2.1 und 3.4.2.2) verglichen werden. Damit werden die Auswirkungen der Behandlungen beschrieben, die durch den OT-Versuch auftraten.

In der LP kam es durch den OT-Versuch zu einem bis zu zehnfachen Anstieg von DCs (Vergleich von Abbildung 3-8 (1-2% DCs) und Abbildung 3-15 (7-10% DCs)). Der Anteil an CD103 DCs blieb dabei trotzdem gleich. Hingegen war die Zellanzahl von DCs im MLN nicht verändert worden.

Die Frequenz an CD4 Zellen bzw. der Anteil von Treg und Th17 Zellen war in der LP durch den OT-Versuch ungefähr verdoppelt worden (Vergleich von Abbildung 3-13-A und Abbildung 3-16-A). Eine Ausnahme stellt der AhR-Ko dar, bei dem der Treg-Anteil durch die Behandlung nicht erhöht wurde. Die naiven AhR-Ko Tiere zeigten eine geringe Erhöhung des Anteils an Th17 Zellen in der LP, was sich nach dem OT-Versuch allerdings ins Gegenteil gekehrt hat, sodass die Behandlung beim AhR-Wt zu mehr Th17 in der LP führte (Vergleich von Abbildung 3-13-A und Abbildung 3-16-A).

Im MLN war am Ende des OT-Versuchs der Anteil an Th17 Zellen um etwa das zehnfache angestiegen, wobei dies bei allen Tieren gleichermaßen geschah und die Werte der einzelnen Tiere stark streuten (Vergleich von Abbildung 3-13-B und Abbildung 3-16-B). Der Anteil an Treg wurde bei allen Tieren durch die Behandlung des OT-Versuches ungefähr halbiert. Ebenso verringerte sich die CD4 Zellanzahl bei allen Gruppen, außer bei den OVA-Wt Tieren. Bei ihnen sank die CD4 Zellanzahl nach dem OT-Versuch nicht und unterschied sich damit signifikant von den Tieren der PBS-Wt-Gruppe (Vergleich von Abbildung 3-13-B und Abbildung 3-16-B).

Mit den durchflusszytometrischen Analysen von AhR-Wt und AhR-Ko am Ende eines OT-Versuchs, wurden einige Hinweise, aber eben keine signifikanten Unterschiede gefunden, die die Destabilisierung der OT bei AhR-defizienten Tieren erklären könnten. Dabei sind die jeweiligen geringeren Zellanteile von Treg in der LP oder CD103 DCs im MLN beim AhR-Ko zu nennen.

Dementsprechend bleibt bis jetzt die Frage ungeklärt, bei welchem Zelltyp der AhR für die Stabilität der OT wichtig ist. Um diese Frage besser beantworten zu können, wurden zellspezifische Gendelektionen genutzt, bei denen nur bestimmte Zelltypen den AhR nicht mehr exprimieren konnten.

3.5. Analyse der oralen Toleranz bei zellspezifischer *ahr*-Deletion

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Überaktivierung des AhR durch TCDD, als auch die AhR-Defizienz in AhR-Ko Mäusen trotz der durchgeführten OT-Induktion zu einer erhöhten α -OVA-IgG1-Produktion führte. Sowohl bei der TCDD-Behandlung, als auch bei den AhR-Ko Mäusen betraf die Veränderung des AhR-Signalweges den gesamten Organismus, wodurch nicht klar definiert werden konnte, welche Zellen den beobachteten Effekt auslösten.

Um zu erfahren, in welchen Zelltypen der AhR für die Induktion bzw. den Erhalt einer stabilen OT notwendig ist, wurde das Cre-Lox System verwendet, das im Abschnitt 1.4.1 erläutert ist. Die zellspezifische *ahr*-Deletion wurde mit drei verschiedenen Mauslinien durchgeführt, bei denen entweder die intestinalen Epithelzellen ($AhR^{\Delta Villin}$), alle DCs ($AhR^{\Delta CD11c}$) oder alle T-Zellen ($AhR^{\Delta Lck}$) betroffen waren. Im Laufe dieser Doktorarbeit wurden die Villin^{Cre} und Lck^{Cre} Mauslinien in den IUF-Tierstall von Markus Korkowski per Embryotransfer importiert und von Babette Martiensen mit der schon etablierten AhR^{flox} Mauslinie verpaart, um die gewünschte zellspezifische *ahr*-Deletion zu erreichen. Die $AhR^{flox} \times CD11c^{Cre}$ Zucht war schon im IUF-Tierstall vorhanden. Bei allen drei Linien wurde zuerst die zellspezifische *ahr*-Deletion überprüft und dann der OT-Versuch nach dem Protokoll in Abschnitt 2.2.1. durchgeführt.

3.5.1. Nachweis der AhR-Defizienz bei $AhR^{\Delta Villin}$ Mäusen

Die intestinalen Epithelzellen (IECs) exprimieren den AhR (Chmill et al., 2010) und es konnte schon gezeigt werden, dass in AhR-Ko Tieren die Barrierefunktion verschlechtert ist (Li et al. 2011). Um zu untersuchen, ob für die Stabilität der OT die AhR-Expression in den IECs notwendig ist, wurden Mäuse der $AhR^{flox} \times Villin^{Cre}$ Zucht verwendet (vgl. Abschnitt 1.4.1). Bei diesen Tieren sollte die *ahr*-Deletion nur in den IECs vorhanden sein ($AhR^{\Delta Villin}$), was zu Beginn überprüft wurde.

Um die zellspezifische Aktivität der Cre-Rekombinase nachzuweisen, wurden durchflusszytometrisch sortierte IECs und weiteres Gewebe von zwei $AhR^{\Delta Villin}$ Mäusen und zwei Cre^{neg}-Wurfgeschwistern (Kontrolltiere) per PCR untersucht. In dieser PCR können zwei unterschiedliche Banden auf Grund der Cre-Rekombinase-Aktivität gebildet werden. Von einem unverändertem *ahr* wird ein 140bp-Fragment amplifiziert. Falls die Cre-Rekombinase in einer Zelle aktiv war und Teile des *ahr* entfernt wurden, wird ein 180bp-Fragment amplifiziert. Somit zeigt die DNS-Analyse, ob eine Zelle ein unverändertes (140bp) oder ein deletiertes *ahr*-Gen besitzt (180bp) (Walisser et al., 2005).

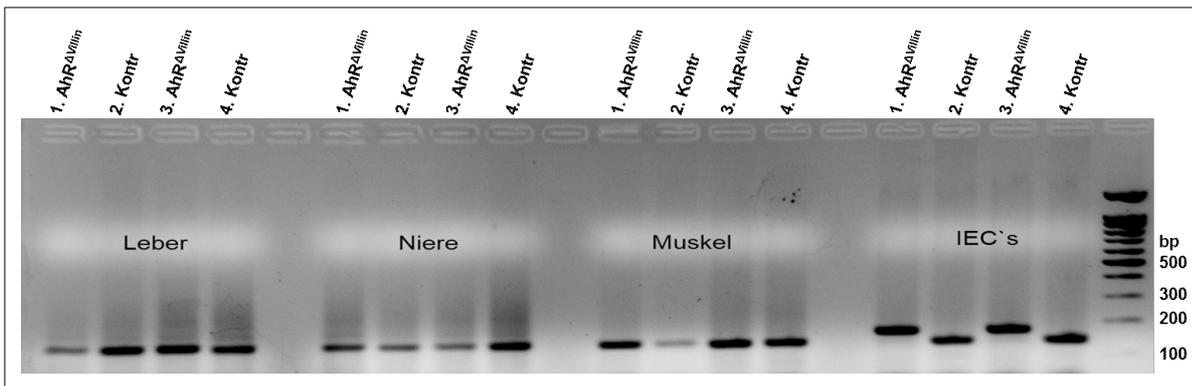


Abbildung 3-17 Nur AhR^{ΔVillin} Tiere zeigen eine zellspezifische *ahr*-Deletion in IECs

Untersucht wurde Gewebe von zwei AhR^{ΔVillin} Tieren und zwei Cre^{neg.}-Wurfgeschwistern (Kontr). DNS aus Leber, Niere und Muskel wurde direkt isoliert. Die IECs wurden per FACS von den restlichen Zellen bei der Isolation getrennt, bevor die DNS isoliert wurde. Die PCR ergibt eine 140bp-Bande beim unverändertem *ahr* und eine-180bp-Bande, wenn es teilweise entfernt wurde.

Um zu überprüfen, ob die sortierten IEC-Proben noch mit anderen Zellen verunreinigt waren, wurden sie am Durchflusszytometer untersucht und der Anteil der IECs an allen lebenden Zellen in der Probe bestimmt. Die IEC-Proben der beiden AhR^{ΔVillin} Mäuse hatten eine Reinheit von 95,5% und 94,5%. Die beiden Proben der Kontrolltiere enthielten 94,8% bzw. 96,5% IECs. Aus diesen Proben und weiteren Geweben (Niere, Leber und Muskel) wurde die DNS isoliert und mit der beschriebenen PCR analysiert.

Nur bei den IECs der beiden AhR^{ΔVillin} Mäuse war die 180bp-Bande amplifiziert worden und in allen anderen Geweben und den IECs der beiden Kontrolltiere wurde nur die 140bp gebildet (Abbildung 3-17). Dadurch konnte gezeigt werden, dass in AhR^{ΔVillin} Mäusen nur die IECs die *ahr*-Deletion tragen.

3.5.1.2. OT-Versuch mit AhR^{flox} x Villin^{Cre} Tieren

Um die Rolle des AhR in den Darmepithelzellen zu untersuchen, wurden AhR^{flox} x Villin^{Cre} Tiere dem OT-Protokoll aus Abschnitt 2.2.1 unterzogen. Dabei wurde die Stabilität der OT am Behandlungstag 47 an Hand der α -OVA-IgG1-Konzentration im Blutserum von AhR^{ΔVillin} Mäusen und Cre^{neg.}- Kontrollmäuse verglichen (Abbildung 3-18).

In der PBS-Gruppe wurde kein Unterschied für den Antikörpertiter zwischen Kontroll- und AhR^{ΔVillin} Mäusen beobachtet, was zeigt, dass der AhR in den IECs für die Immunisierung und Antikörperproduktion nicht wichtig ist (PBS: Kontr: 100% \pm 63,1%; AhR^{ΔVillin}: 89,1% \pm 50,7%; p-Wert: 0,746).

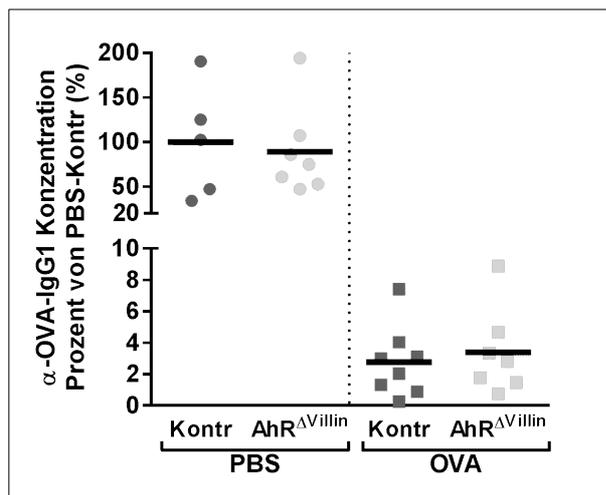


Abbildung 3-18 Keine Destabilisierung der OT in AhR^{ΔVillin} Mäusen

Der AhR wurde konditional nur in den intestinalen Epithelzellen (AhR^{ΔVillin}) ausgeschaltet, indem AhR^{fllox} x Villin^{Cre} Tiere verpaart wurden. Cre^{neg}-Wurfgeschwister wurden als Kontrolle zu den AhR^{ΔVillin} Tieren verwendet. Beide Genotypen erhielten OVA zur Induktion der OT oder nur das Lösungsmittel PBS. Gezeigt ist der prozentuale α-OVA-IgG1-Titer vom Behandlungstag 47, bezogen auf die PBS-Kontrolltiere, welche gleich 100% gesetzt wurden. Jeder Wert (●, ●, ■, ■) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist mit dargestellt. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test für Kontrolle zu AhR^{ΔVillin} innerhalb der jeweiligen Gruppe. Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Die mit OVA gefütterten Tiere zeigten im Vergleich zu der PBS-Gruppe einen deutlich geringeren α-OVA-IgG1-Titer, was eine stabile OT widerspiegelt. Innerhalb der OVA-Gruppe hatten die AhR^{ΔVillin} Mäuse einen gleich hohen Antikörpertiter wie die Kontrolltiere, wodurch deutlich wird, dass der AhR in den IECs keinen Einfluss auf die durchgeführte OT-Induktion hatte (OVA: Kontr: 2,76% ±2,26%; AhR^{ΔVillin}: 3,39% ±2,75%; p-Wert: 0,636).

Dies zeigt, dass die beobachtete Destabilisierung der OT in AhR-Ko Tieren nicht auf die Funktion des AhR in den IECs zurückzuführen ist, weswegen weitere zellspezifische *ahr*-Deletionen durchgeführt wurden.

3.5.2. Nachweis der AhR-Defizienz bei AhR^{ACD11c} Tieren

Eine weitere Zellpopulation, die für die OT wichtig ist, sind die DCs im Darm. Sie nehmen nicht nur die dort vorhandenen Antigene auf und präsentieren diese, sondern beeinflussen auch stark das Darmmilieu durch Zytokin-Sekretion (Pabst & Mowat, 2012). Es wurde gezeigt, dass DCs den AhR ausdrücken (Jux et al., 2009). Darüber hinaus zeigten die Analysen der naiven AhR-Ko Tiere einen Anstieg der Zellanzahl von DCs und CD103 DCs in der LP (Abbildung 3-8), aber dafür eine leichte Verringerung des Anteils von CD103 DC im MLN am Ende eines OT-Versuches (Abbildung 3-15).

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Destabilisierung der OT im AhR-Ko am Verlust der AhR-Expression in DCs lag, wurden AhR^{fllox} x CD11c^{Cre} Mäuse verpaart, wobei in allen CD11c positiven Zellen eine *ahr*-Deletion stattfinden sollte (vgl. Abschnitt 1.4.1).

Um die Spezifität der Deletion bei AhR^{ΔCD11c} Mäusen zu kontrollieren, wurden CD3, CD19 und CD11c Zellen aus der Milz von einer Kontroll- und einer AhR^{ΔCD11c} Maus durchflusszytometrisch sortiert und deren DNS isoliert. Zusammen mit der DNS von weiteren Geweben, wurden die Proben auf die Deletion des *ahr* per PCR getestet, wie es im Kapitel 1.4.1 beschrieben ist. Dabei dienten die CD3 und CD19 Zellen als Negativkontrollen für die *ahr*-Deletion, die nur in den CD11c Zellen erwartet wurde.

Um die Reinheit der sortierten Zellen zu überprüfen, wurden diese per Durchflusszytometer analysiert, wobei der prozentuale Anteil der sortierten Zellen an allen gemessenen Zellen in der Probe angegeben wird. Die erreichte Reinheit der sortierten Zellpopulationen betrug dabei für Zellen vom Kontrolltier: CD11c: 98%; CD3: 99,8%; CD19: 99,7% und für die Zellen vom AhR^{ΔCD11c} Tier: CD11c: 96,8%; CD3: 98,9%; CD19: 99,5%.

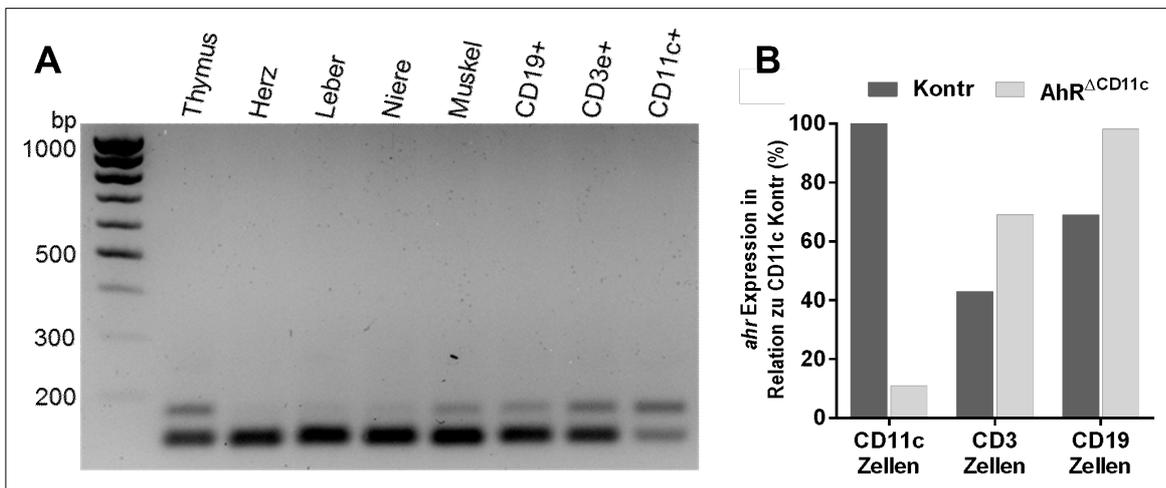


Abbildung 3-19 CD11c-sortierte Zellen von AhR^{ΔCD11c} Mäusen zeigen nur partielle Rekombination
 Zur Überprüfung der Cre-Rekombinase-Aktivität in AhR^{fllox} x CD11c^{Cre} Tieren wurden Milzzellen am Durchflusszytometer sortiert und die DNS isoliert. Sortierte CD3, CD19 Zellen und verschiedene Gewebe wurden als Kontrolle genutzt. **A)** Eine 140bp-Bande wird gebildet, wenn die DNS nicht rekombiniert wurde und eine 180bp-Bande wenn die Cre-Rekombinase aktiv war. Die getesteten Proben für diese PCR stammen alle von einem AhR^{ΔCD11c} Tier. **B)** Die Menge an *ahr* mRNS von sortierten Milzzellen von Kontroll- und AhR^{ΔCD11c} Mäusen wurde in einer qPCR bestimmt und im Verhältnis zu den CD11c Zellen des Kontrolltieres gesetzt (Kontr-CD11c = 100%).

In Abbildung 3-19-A ist die PCR von den sortierten CD3, CD19, CD11c Zellen und verschiedenen Geweben der AhR^{ΔCD11c} Maus gezeigt. Wie erwartet, zeigten die Proben von Herz, Leber, Niere, Muskel und die sortieren Negativkontrollen CD19 und CD3 Zellen die 140bp-Bande. Das heißt, dass in diesen Zellen das *ahr*-Gen nicht deletiert war. Beim Thymus ist die 140bp-Bande schwächer ausgeprägt, weil sich in diesem Gewebe viele DCs

befinden und entsprechend ist auch eine 180bp-Bande amplifiziert worden, die eine *ahr*-Deletion widerspiegelte. Auch im Muskelgewebe wurde eine schwache 180bp-Bande gebildet, die auf vorhandene DCs in diesem Gewebe hindeutete.

Bei den sortierten Zellen wurde wider Erwarten in den Negativproben (CD3 und CD19) eine 180bp-Bande amplifiziert. Dies zeigt, dass die Cre-Rekombinase unter dem CD11c Promotor bei einem geringen Anteil von CD3 bzw. CD19 Zellen in der Milz ebenfalls aktiv war. Wegen der hohen Reinheit der sortierten Zellpopulationen ist es unwahrscheinlich, dass die 180bp-Bande in den Negativkontrollen von kontaminierenden CD11c Zellen amplifiziert wurde.

Wie erwartet, war bei den sortierten CD11c Zellen eine 180bp-Bande klar zu erkennen, was die Cre-Rekombinase-Aktivität in diesen Zellen verdeutlichte. Aber auch eine 140bp-Bande wurde amplifiziert, wenn auch schwächer ausgeprägt als bei den anderen Proben. Somit ist die Cre-Rekombinase in $AhR^{\Delta CD11c}$ Mäusen nicht in allen CD11c positiven Zellen aktiv gewesen, wodurch einige CD11c Zellen weiterhin einen funktionsfähigen AhR exprimieren. Eine quantitative Aussage über die Bandenstärke in dieser PCR ist nur begrenzt möglich, weil bei dieser PCR zwei Vorwärtsprimer um den gleichen Rückwärtsprimer konkurrieren (Walisser et al., 2005).

Deswegen wurde aus den sortierten Zellen auch RNS isoliert, um die *ahr*-Expression in den jeweiligen Proben per qPCR zu bestimmen. Die *ahr*-Expression der CD11c Zellen des Kontrolltieres wurde gleich 100% und die Werte der anderen Proben in ein Verhältnis dazu gesetzt. Dadurch wurde deutlich, dass in den CD11c Zellen einer $AhR^{\Delta CD11c}$ Maus nur noch 11% der *ahr* mRNA im Vergleich zu der Kontrollmaus vorhanden war (Abbildung 3-19-B).

Zusammenfassend zeigte die Analyse der zellspezifischen *ahr*-Deletion bei $AhR^{\Delta CD11c}$ Tieren, dass zum einen nicht alle CD11c positiven Zellen AhR-defizient sind, sondern die *ahr*-Expression von allen Zellen in der CD11c-Population zusammen um 89% reduziert ist (Abbildung 3-19-B), aber zusätzlich einige CD3 und CD19 Zellen die *ahr*-Deletion tragen (Abbildung 3-19-A).

Mäuse der $AhR^{lox} \times CD11c^{Cre}$ Zucht wurden für die Untersuchung der Funktion des AhR in DCs bei der OT verwendet. Da für die Verwendung des Cre-Lox-Systems kein besserer DC-Marker als CD11c vorhanden ist, müssen die zusätzliche *ahr*-Deletion in CD3 und CD19 Zellen bzw. die nicht vollständige Deletion in CD11c Zellen bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

3.5.2.1. OT-Versuch mit $AhR^{lox} \times CD11c^{Cre}$ Tieren

Dendritische Zellen exprimieren den AhR (Jux et al., 2009). Sie sind für die Induktion der OT wichtig (Weiner et al., 2011), sodass nun untersucht wurde, wie wichtig die AhR-

Expression in dieser Zellpopulation für die OT ist. Dafür wurden Tiere aus der $AhR^{flox} \times CD11c^{Cre}$ Zucht nach dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.1 untersucht. Bei den $AhR^{\Delta CD11c}$ Mäusen muss beachtet werden, dass die zellspezifische *ahr*-Deletion nicht alle DCs umfasste, aber zusätzlich einige T-Zellen und B-Zellen ein inaktiviertes *ahr*-Gen trugen (Abbildung 3-19).

Aufgrund der geringen α -OVA-IgG1-Titer der OVA-Gruppe im Vergleich zu der PBS-Gruppe, wurde die OT stabil induziert (Abbildung 3-20). Dies trifft sowohl für die Kontroll- als auch für die $AhR^{\Delta CD11c}$ Mäuse zu, denn im Vergleich der beiden Genotypen innerhalb der OVA-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Vielmehr zeigten drei Kontrolltiere einen höheren Titer als die $AhR^{\Delta CD11c}$ Tiere (OVA: Kontr: 3,39% \pm 2,84%; $AhR^{\Delta CD11c}$: 1,63% \pm 1,3%; p-Wert: 0,162). Dies zeigt, dass die AhR-Aktivität in den DCs keinen Einfluss auf die Stabilität der OT bei dem verwendeten OT-Protokoll hat.

In der PBS-Gruppe war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen gemessen worden, aber es war ein Trend zu einer etwas geringeren Antikörperproduktion bei $AhR^{\Delta CD11c}$ Mäusen zu erkennen, der in Abschnitt 4.4 nochmals aufgegriffen und weiter beschrieben wird (PBS: Kontr: 100% \pm 44,1%; $AhR^{\Delta CD11c}$: 66,8% \pm 13,7%; p-Wert: 0,103).

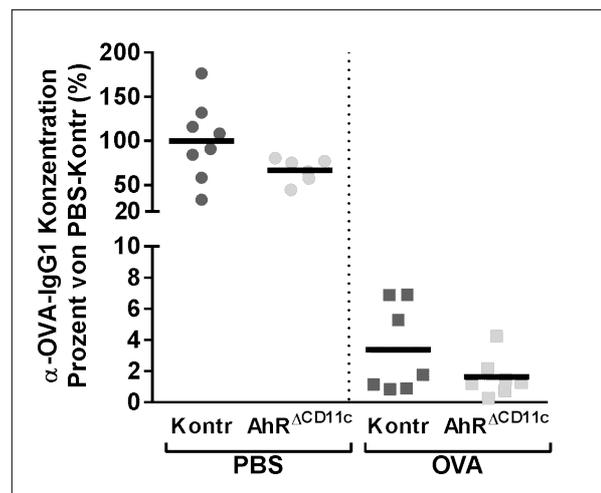


Abbildung 3-20 $AhR^{flox} \times CD11c^{Cre}$ Tiere zeigen keinen Unterschied in der OT
 Orale Toleranz gegen OVA wurde bei $AhR^{\Delta CD11c}$ Mäusen, die eine *ahr*-Deletion in DCs haben und bei Cre^{neg} -Wurfgeschwistern (Kontrolltiere) induziert. Mäuse beider Genotypen wurden ebenfalls nur mit dem Lösungsmittel PBS gefüttert. Nach Immunisierung und Verstärkungsinjektionen wurde die Stabilität der OT durch den α -OVA-IgG1-Titer im Blutserum bestimmt. Die Antikörpertiter von Tag 47 sind auf die PBS-Kontrollgruppe bezogen (PBS-Kontr = 100%). Jeder Wert (●, ●, ■, ■) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist mit dargestellt. Berechnung der Signifikanz mit dem Student'schen t-Test für die Kontrolltiere im Vergleich zu $AhR^{\Delta CD11c}$ Mäusen innerhalb der jeweiligen Gruppe. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

3.5.3. Nachweis der AhR-Defizienz bei AhR^{ΔLck} Tieren

Die Destabilisierung der OT im AhR-Ko konnte durch die zellspezifische AhR-Defizienz in IECs oder DCs nicht wiederholt werden. Neben dem Darmgewebe und den DCs sind T-Zellen unabdingbar für die Induktion der OT (Weiner et al., 2011) und daher sollte die zellspezifische AhR-Defizienz auch für diese Zellen getestet werden. Die Expression des AhR ist bei T-Zellen in den verschiedenen T-Zellpopulation sehr unterschiedlich, wobei Th17 Zellen die stärkste Expression zeigen (Veldhoen et al., 2008).

Die zellspezifische *ahr*-Deletion in T-Zellen wurde bei AhR^{ΔLck} Mäusen mit Hilfe einer PCR getestet, wie es in Kapitel 1.4.1 beschrieben ist. Dazu wurden Milzzellen von drei AhR^{ΔLck} Mäusen per Durchflusszytometer auf CD3 und CD19 Zellen sortiert, wobei alle sortierten Proben eine Reinheit zwischen 97,9-99,2% der jeweiligen Zellpopulation enthielten.

Nur in den CD3 positiven T-Zellen wurde die *ahr*-Deletion erwartet, bei der eine 180bp-Bande amplifiziert wird. Die CD19 Zellen sollten in AhR^{ΔLck} Mäusen ein unverändertes *ahr*-Gen haben, was durch eine 140bp-Bande angezeigt wird und dienten dementsprechend als Negativkontrolle (Walisser et al., 2005).

Bei drei AhR^{ΔLck} Tieren zeigten die DNS Proben der CD19 Zellen nur die erwartete 140bp-Bande (Abbildung 3-21). Bei den Proben der CD3 Zellen wurde wie erwartet die 180bp-Bande amplifiziert. Zusätzlich wurde aber auch eine schwache 140bp-Bande gebildet, was auf eine unvollständige Rekombination in CD3 Zellen bei den AhR^{ΔLck} Tieren hinweist.

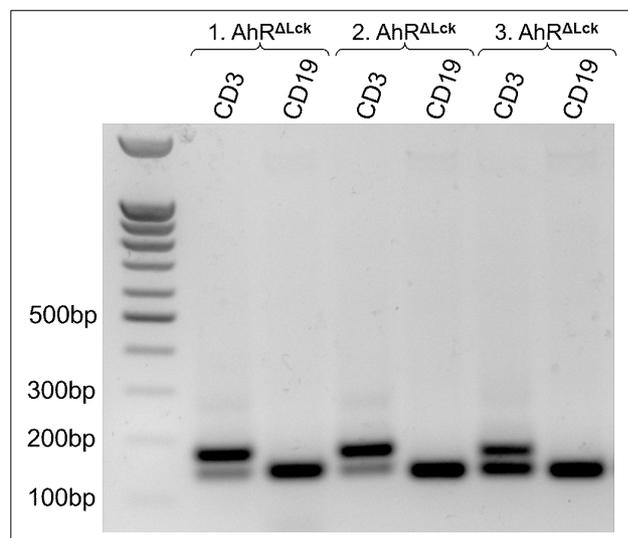


Abbildung 3-21 In AhR^{ΔLck} Tieren sind T-Zellen AhR-defizient
Aus der Milz von AhR^{ΔLck} Mäusen wurden CD3 und CD19 Zellen am Durchflusszytometer isoliert und auf *ahr*-Deletion per PCR überprüft. In der PCR wird eine 140bp-Bande bei einem unverändertem *ahr* gebildet und eine 180bp-Bande, wenn eine *ahr*-Deletion in der Zelle vorlag.

Der stärkste Einfluss der AhR-Defizienz auf T-Zellen wurde bei $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm von AhR-Ko Mäusen gemessen (Abbildung 3-6), weswegen diese Zellen auch in AhR^{flox} x Lck^{Cre} Tieren untersucht wurden. Dazu wurden die isolierten Darmzellen von vier Kontroll- und vier AhR ^{Δ Lck} Mäusen über eine Gradientenzentrifugation aufgereinigt und am Durchflusszytometer untersucht. Im Gegensatz zu den AhR-Ko Tieren war der Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmgewebe von AhR ^{Δ Lck} Mäusen nicht reduziert, sondern vergleichbar zum Anteil der Kontrolltiere (Abbildung 3-22-A).

Bei der Durchflusszytometeranalyse wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen aus den Proben herausortiert, um zu überprüfen, ob diese Zellen auch wirklich AhR-defizient waren. Die Reinheit der sortierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurde bestimmt und ergab bei den Proben der vier Kontrolltiere eine Reinheit von 91,8%-98,4% und lag bei den vier AhR ^{Δ Lck} Tieren zwischen 92,9% bis 98%.

In der PCR zur Untersuchung der *ahr*-Deletion (vgl. Abschnitt 1.4.1) konnte gezeigt werden, dass nur wenige intestinale $\gamma\delta$ T-Zellen der AhR ^{Δ Lck} Mäuse eine *ahr*-Deletion trugen, was durch die nur sehr schwache 180bp-Bande verdeutlicht wurde. Im Gegensatz dazu war die 140bp-Bande deutlich stärker ausgebildet worden, die bei einem unverändertem *ahr* entsteht. Wie erwartet, zeigten die $\gamma\delta$ T-Zellen der Kontrolltiere keine *ahr*-Deletion (Abbildung 3-22-B).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die T-Zellen (CD3) aus der Milz von AhR ^{Δ Lck} Mäusen eine *ahr*-Deletion besitzen, aber nur wenige der intestinalen $\gamma\delta$ T-Zellen (CD8 $\gamma\delta$ TCR) AhR-defizient sind.

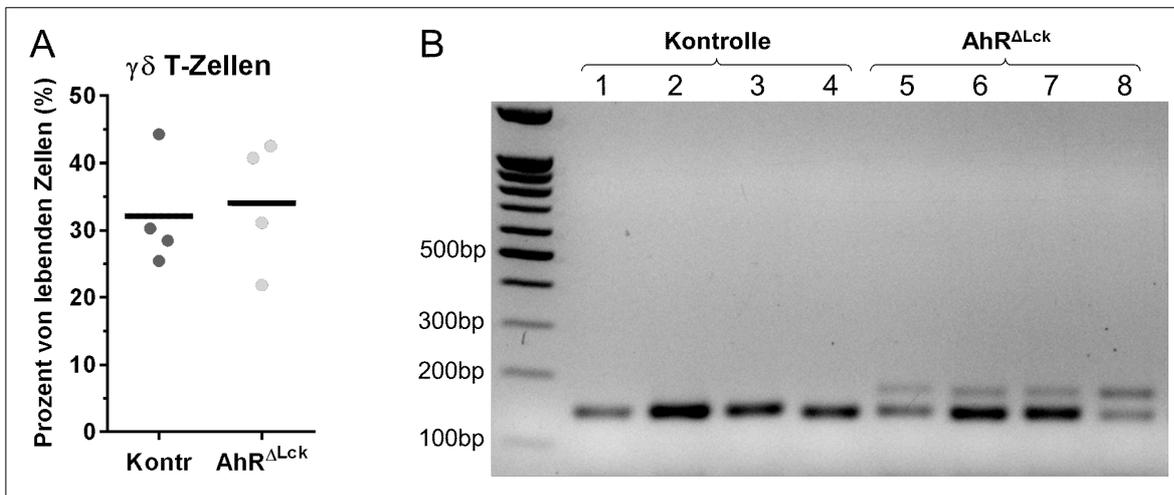


Abbildung 3-22 $\gamma\delta$ T-Zellen in AhR^{flox} x Lck^{Cre} Tieren

Die Därme von vier AhR ^{Δ Lck} Mäusen und vier Cre^{neg}-Wurfgeschwistern (Kontrolltiere) wurden nach einer Gradientenzentrifugation am Durchflusszytometer untersucht. **A)** Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden anhand der Expression des $\gamma\delta$ TCR und CD8 definiert und deren Anteil von allen lebenden Zellen in der jeweiligen Probe bestimmt. **B)** Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen herausortiert und deren DNS isoliert. Die *ahr*-Deletion wurde per PCR in der DNS nachgewiesen, wobei eine 140bp-Bande ein unverändertes und eine 180bp-Bande ein deletiertes *ahr*-Gen widerspiegelt.

3.5.3.2. OT-Versuch mit AhR^{flox} x Lck^{Cre} Tieren

Die Destabilisierung der OT bei AhR-Ko Mäusen zeigte sich nicht bei der zellspezifischen *ahr*-Deletion in IECs oder DCs. Eine weitere Zellpopulation, die für die Induktion der OT notwendig ist, sind T-Zellen (Weiner et al., 2011). Daher wurde mit Hilfe der AhR^{flox} x Lck^{Cre} Zucht auch für diese Zellpopulation eine konditionale *ahr*-Deletion durchgeführt (vgl. Abbildung 3-23).

Bei AhR^{ΔLck} Mäusen und Cre^{neg}-Wurfgeschwistern (Kontrolle) wurde eine OT mit OVA induziert und auf Stabilität durch Immunisierung und Verstärkungsinjektionen getestet, wie es in Abschnitt 2.2.1 beschreiben ist. Auf die Stabilität der OT am Behandlungstag 47 konnte anhand der produzierten α-OVA-IgG1-Antikörper im Blutserum zurückgeschlossen werden.

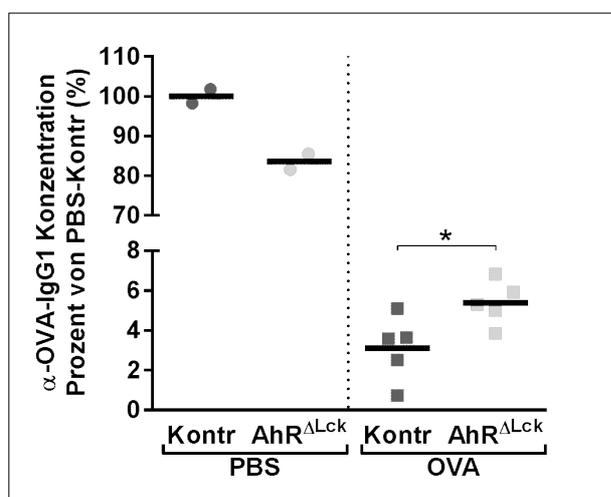


Abbildung 3-23 Zellspezifische AhR-Deletion in T-Zellen führt zur Destabilisierung der OT
AhR^{flox} x Lck^{Cre} Mäuse wurden auf die Stabilität der OT untersucht, indem AhR^{ΔLck} Tiere und deren Cre^{neg}-Wurfgeschwister (Kontrolle) mit OVA gefüttert und anschließend immunisiert wurden. Durch den α-OVA-IgG1-Titer im Blutserum am Behandlungstag 47 wird die OT-Stabilität bestimmt. Die Antikörpertiter werden prozentual auf den Titer der PBS-Kontrolltiere bezogen, welcher gleich 100% gesetzt ist. Jeder Wert (●, ●, ■, ■) entspricht einem Versuchstier und der Mittelwert ist mit dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test zwischen Kontroll-Tieren und AhR^{ΔLck}-Tieren innerhalb der jeweiligen Gruppe berechnet (* ≤ 0,05). Dieser Versuch konnte nur einmal durchgeführt werden.

In der PBS-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen gemessen. Es war aber eine leicht schwächere Antikörperproduktion bei AhR^{ΔLck} Tieren zu erkennen (PBS: Kontr: 100% ± 2,5%; AhR^{ΔLck}: 83,6% ± 2,8%), der in Abschnitt 4.40 genauer beschreiben wird (Abbildung 3-23). Die Induktion der OT war auch in AhR^{flox} x Lck^{Cre} Tieren möglich, was die deutlich geringeren Antikörpertiter der OVA-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe zeigte. Innerhalb der OVA-Gruppe produzierten aber die AhR^{ΔLck} Tiere signifikant mehr α-OVA-IgG1 als ihre Cre^{neg}-Wurfgeschwister, was als eine destabilisierte

OT interpretiert wurde (OVA: Kontr: 3,1% \pm 1,6%; AhR ^{Δ Lck}: 5,4% \pm 1,1%; p-Wert: 0,032). Dieses Ergebnis zeigt, dass die fehlende AhR-Aktivität in T-Zellen die Aufrechterhaltung einer oralen Toleranz negativ beeinflusst.

Leider konnte dieser Versuch im Rahmen dieser Dissertation aus zeitlichen Gründen nicht wiederholt werden. Aufgrund eines zufälligen Mutationsereignisses in der AhR^{fllox} x Lck^{Cre} Zucht konnte ein zweiter OT-Versuch mit AhR ^{Δ Lck} Mäusen nicht genutzt werden. Am Ende eines zweiten Experimentes wurden die Tiere auf die *ahr*-Deletion in CD3 Zellen getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass das *ahr*-Gen in den CD3-Zellen nicht deletiert war. Dementsprechend war die AhR-Expression in T-Zellen zwischen Kontroll- und AhR ^{Δ Lck} Tieren im zweiten Experiment gleich und der Versuch musste verworfen werden.

Bei der Untersuchung der Gensequenzen stellte sich heraus, dass die Sequenzen beider LoxP Elemente um das Exon 2 vom *ahr*-Gen nicht verändert waren. Allerdings hatten die Tiere die Fähigkeit verloren, die Cre-Rekombinase auszuprägen, was in einer qPCR Analyse von sortieren CD3 und CD19 Zellen eines AhR ^{Δ Lck} Tieres festgestellt wurde. Wider Erwarten zeigten die CD3 Zellen keine *cre*-Expression.

Die Zucht der AhR^{fllox} x Lck^{Cre} Tiere musste aus Mäusen neu aufgebaut werden, die noch eine funktionsfähige Cre-Rekombinase trugen. Dies war bis zum Abschluss dieser Doktorarbeit nicht möglich, sodass die Verschlechterung der OT-Stabilität bei AhR ^{Δ Lck} Mäusen in nur einem Experiment gezeigt werden konnte.

3.5.4. Zusammenfassung über OT-Versuche mit zellspezifischer *ahr*-Deletion

Es konnte gezeigt werden, dass AhR-Ko Mäuse eine destabilisierte OT aufweisen (vgl. Abbildung 3-14), aber durch die durchflusszytometrischen Zellanalysen konnte dieser Effekt keinen konkreten Zelltypen zugeschrieben werden. Deswegen wurden OT-Versuche mit Mäusen durchgeführt, die eine zellspezifische *ahr*-Deletion in IECs (Villin), DCs (CD11c) oder T-Zellen (Lck) hatten. Weder die AhR ^{Δ Villin} noch die AhR ^{Δ CD11c} Mäuse zeigten eine destabilisierte OT. In AhR ^{Δ Lck} Mäusen konnte eine destabilisierte OT, ähnlich wie bei AhR-Ko Mäusen, nachgewiesen werden. Dementsprechend spielt der AhR bei dem verwendeten Protokoll zur OT-Induktion keine Rolle in IECs oder DCs, aber in T-Zellen.

Interessanterweise waren aber die $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm der AhR ^{Δ Lck} Tiere nicht reduziert, wie es beim AhR-Ko der Fall ist. Daher muss der AhR in anderen T-Zellen die OT beeinflussen, weswegen im Folgenden AhR-defiziente T-Zellen genauer *in vitro* untersucht wurden.

3.6. Stimulation von AhR-defizienten T-Zellen

Die bisher gefundenen Auswirkungen einer AhR-Defizienz auf T-Zellen waren nicht auf die auffällige Reduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm von AhR-Ko Mäusen (Li et al. 2011 bzw. Abbildung 3-6) zurückzuführen, da diese nicht bei AhR ^{Δ Lck} Tieren beobachtet wurde (Abbildung 3-22-A). Mit anderen Worten: Für eine stabile OT ist der AhR in anderen T-Zellsubpopulationen notwendig. Naive AhR-Ko Mäuse hatten im Vergleich zu AhR-Wt Mäusen etwas mehr Th17 Zellen in der LP, was sich aber nach Beendigung des OT-Versuchs genau umgekehrt hat (Abbildung 3-13-A und Abbildung 3-16-A). Außerdem war auch der Anteil von Treg nach dem OT-Versuch in der LP von AhR-Ko reduziert (Abbildung 3-16-A).

Um AhR-defiziente T-Zellen genauer untersuchen zu können, wurden T-Zellen aus der Milz von AhR-Ko Mäusen und Wt-Wurfgeschwistern polyklonal mit CD3/CD28 *in vitro* stimuliert. Um den Effekt der Stimulation zu überprüfen, wurden parallel Zellen von jeder Probe nur in Medium inkubiert, welche im Weiteren als unstimulierte Kontrollen bezeichnet werden. In der Durchflusszytometer-Analyse wurden die gemessenen Zellen nicht auf alle lebenden Zellen der *in vitro* Stimulation bezogen, sondern auf *counting beads*, die jeder Probe zugegeben wurden (vgl. 2.2.17). Die Anzahl von CD4 und CD8 Zellen in den *in vitro* behandelten Zellen wurde gemessen, um zu untersuchen, ob die Stimulation die Zellanzahl verändert hat. Weder die Zellanzahl von CD4 noch die von CD8 Zellen wurde durch die Stimulation verändert. In der Milz von AhR-Ko Tieren sind weniger CD8 Zellen vorhanden gewesen, als in der Milz von Wildtyp-Wurfgeschwistern, was aber nicht signifikant war (Abbildung 3-24; p-Werte: unstimuliert: 0,836; stimuliert: 0,508; vgl. Tabelle 6-19).

Darüber hinaus wurden die T-Zellen von AhR-Wt und AhR-Ko Mäusen auf die Expressionen von CD25, CD69, FoxP3 und IL17a untersucht, was als Beispiel in Abbildung 3-25 gezeigt ist.

Die erfolgreiche Stimulation war an den beiden Aktivitätsmarkern CD25 und CD69 zu sehen. Beide Oberflächenmoleküle waren im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, sowohl beim AhR-Wt als auch beim AhR-Ko, gleichermaßen erhöht. Nur Trends zu einer stärkeren CD25 Expression bei CD4 und CD8 Zellen bzw. eine schwächere Expression von CD69 bei CD8 Zellen wurden bei AhR-Ko Zellen beobachtet (Abbildung 3-26). Auch bei den Subpopulationen, Treg und Th17 Zellen, zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der Aktivierungsmarker.

Dementsprechend führt die CD3/CD28 Stimulation von T-Zellen auch unter AhR-Defizienz zu einer normalen Aktivierung. Dies kann also nicht die Ursache für die veränderte OT-Stabilität bei AhR-Ko oder AhR ^{Δ Lck} Mäusen sein.

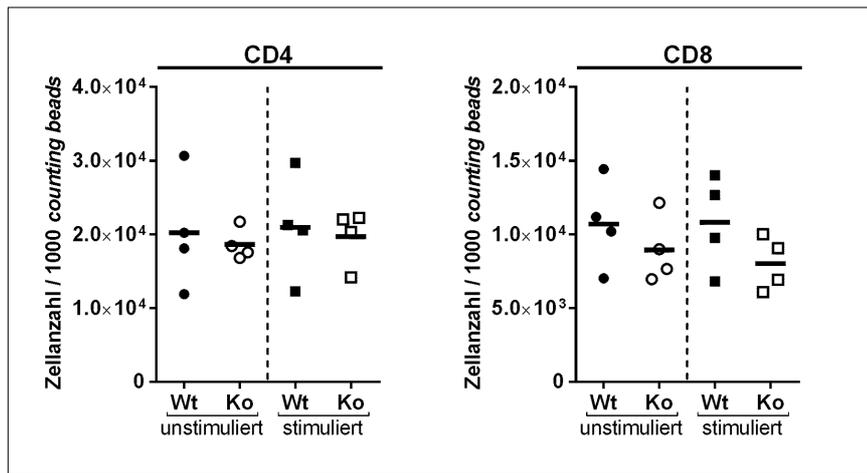


Abbildung 3-24 CD4 und CD8 Zellanzahl bei *in vitro* Stimulation

Durchflusszytometer-Analyse von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwister Milzzellen, die auf T-Zellen angereichert und mit CD3/CD28 für 16h stimuliert wurden. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur in Medium inkubiert. Die gemessene Zellanzahl von CD4 und CD8 Zellen wurde auf 1000 mitgemessene *counting beads* normalisiert. Ein Wert (●,○,■,□) entspricht einem Tier, welches auf CD4 und CD8 Zellen hin untersucht wurde und der Mittelwert ist mit dargestellt. Signifikanzen wurden durch ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet (* $\leq 0,05$).

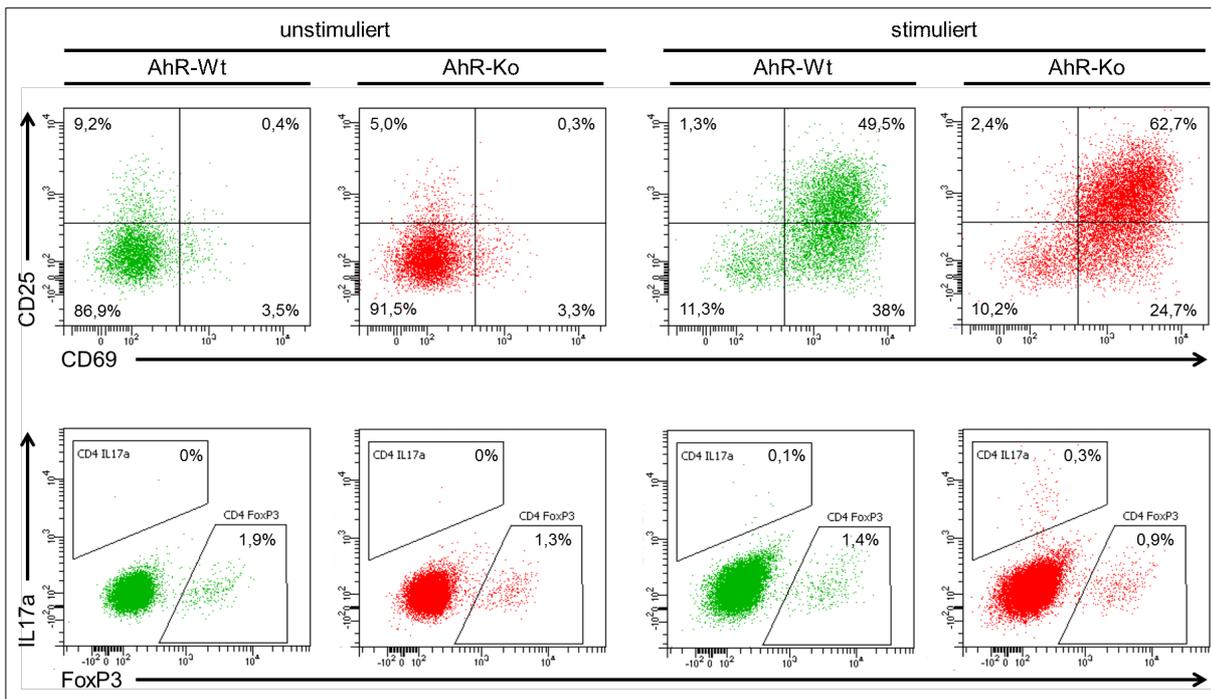


Abbildung 3-25 Zellanalyse per Durchflusszytometer von der *in vitro* T-Zell-Stimulation für CD4 Zellen
Angereicherte T-Zellen aus AhR-Wt oder AhR-Ko Milzen wurden für 16h mit CD3/CD28 stimuliert bzw. als Kontrolle in Medium inkubiert (unstimuliert). Die Expressionen von Aktivierungsmarkern (CD25 und CD69), FoxP3 und IL17a wurde bei CD4 Zellen bestimmt. Prozentuale Angaben in den jeweiligen Bereichen beziehen sich auf alle CD4 Zellen.

Es gab zwei wiederkehrende Unterschiede, die bei AhR-defizienten T-Zellen auftraten. Zum einen war die Anzahl an Treg (CD4 FoxP3) im AhR-Ko bei unstimulierten und auch bei stimulierten Zellen vermindert (Abbildung 3-26-A). Diese Verringerung war auch schon zuvor als Trend in der LP beobachtet worden (Abbildung 3-16-A). Zum anderen wurde in der *in vitro* Stimulation ein signifikanter Anstieg von Th17 Zellen (CD4 IL17a) beim AhR-Ko gemessen (Abbildung 3-26-A), was ebenfalls zuvor als Trend beobachtet wurde (Abbildung 3-13).

Eine Veränderung in der Balance von Treg hin zu mehr inflammatorischen Th17 Zellen führt zu einem entzündlichen Milieu im Gewebe (Noack & Miossec, 2014). Ein solches Milieu verändert die Entwicklung aber auch die Homöostase von schon ausgereiften T-Zellen (Hoepli et al., 2015), was wiederum Auswirkungen auf deren zuvor geprägte immunologischen Funktionen hat.

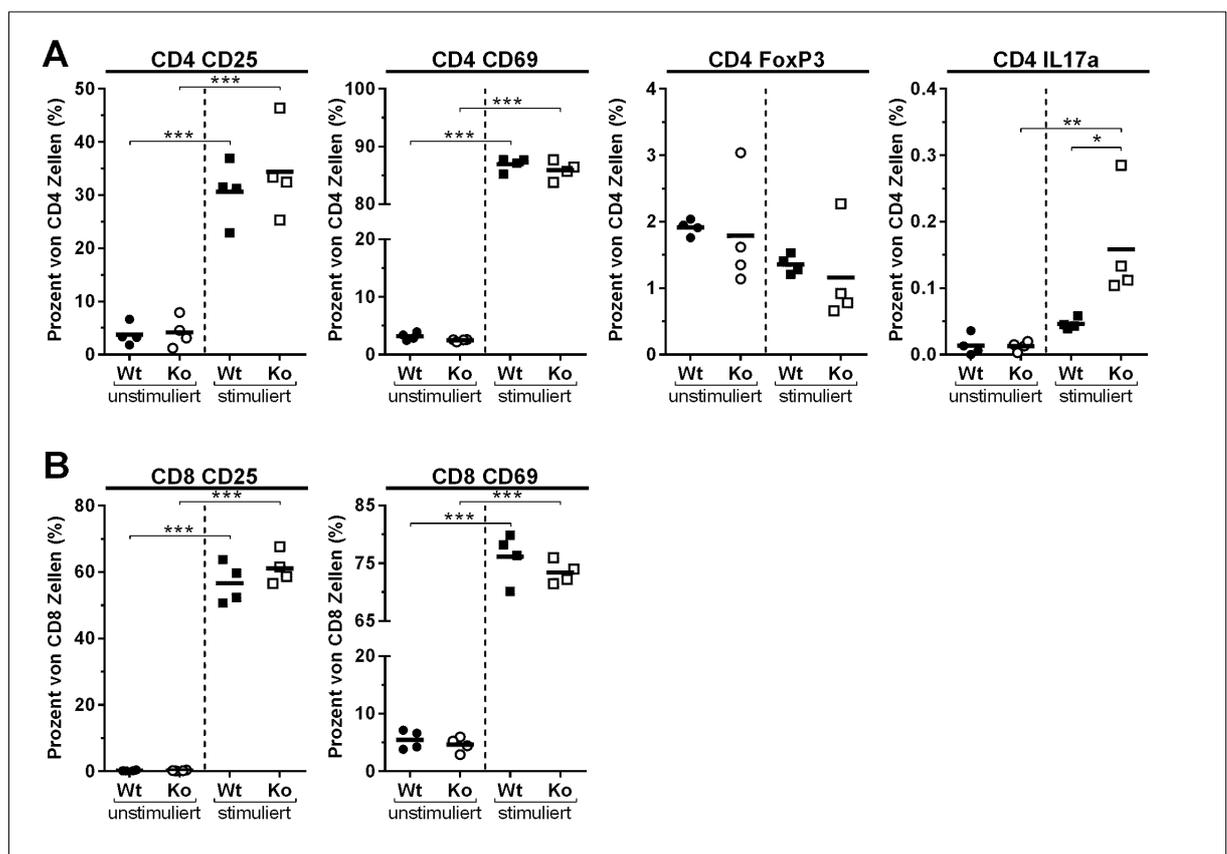


Abbildung 3-26 Expression von Aktivierungsmarkern, FoxP3 und IL17a bei T-Zell Stimulation
Milzzellen von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern wurden für T-Zellen aufgereinigt und *ex vivo* mit CD3/CD28 für 16h stimuliert, wobei die unstimulierte Kontrolle nur in Medium inkubiert wurde. Nach der Stimulation wurden die Zellen per Durchflusszytometer analysiert. Ein Wert (●,○,■,□) entspricht einem Tier, welches auf die verschiedenen Marker hin untersucht wurde. Der Mittelwert ist mit dargestellt und die Signifikanzen wurden durch ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet (* ≤ 0,05 / ** ≤ 0,01 / *** ≤ 0,001).

4. Diskussion

Das Phänomen der oralen Toleranz (OT) ist ein aktuelles Thema in der Forschung. Durch ein besseres Verständnis, wie eine OT induziert wird bzw. aufrechterhalten bleibt und welche Faktoren dafür entscheidend sind, entsteht die Möglichkeit, bestimmte medizinische Therapien mit dem Mechanismus der OT zu verbessern. Die orale Immuntherapie wird bereits angewendet und basiert höchstwahrscheinlich auf dem Mechanismus der OT (Cabrera & Urrea, 2015), aber viele Therapien zeigen noch keine hohe Effektivität bzw. sind noch im Tiermodell (Kasareklo et al., 2015). Dementsprechend ist ein besseres Verständnis für die Mechanismen der OT und wie man diese für eine erfolgreiche Therapie verbessern kann, von großem Interesse.

In dieser Arbeit habe ich die Frage nach der funktionellen Rolle des AhR bei der Induktion und Aufrechterhaltung der OT untersucht. Ich konnte zeigen, dass eine systemische AhR-Defizienz zu einer instabilen OT führt. Weiterhin fand ich heraus, dass der AhR in T-Zellen für die Stabilität der OT notwendig ist, aber die Expression des AhR nicht in IECs oder DCs. Außerdem zeigten Mäuse, die eine AhR-ligandenfreie Diät erhielten, keine Veränderung der Stabilität der OT.

4.1. Eine systemische oder T-Zell-spezifische AhR-Defizienz führt zu einer instabilen OT

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass der AhR an der Stabilität der OT beteiligt ist. In Versuchen mit AhR-Ko Mäusen führte eine systemische AhR-Defizienz zur Destabilisierung der OT (Abbildung 3-14). Eine solche Destabilisierung zeigte sich ebenfalls bei AhR^{ΔLck} Mäusen, bei denen der AhR spezifisch in T-Zellen deletiert ist (Abbildung 3-21). Dies deutet darauf hin, dass auch bei der systemischen AhR-Defizienz in AhR-Ko Mäusen, die AhR defizienten T-Zellen ursächlich für die instabile OT verantwortlich sind.

Die systemische AhR-Defizienz führt unter anderem zum Verlust der $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm (Kadow et al., 2011; Y. Li et al., 2011; Abbildung 3-6-A). Für die Induktion einer OT sind $\gamma\delta$ T-Zellen notwendig (Ke et al., 1997), weswegen zu vermuten war, dass der Verlust dieser Zellen für die beobachtete instabile OT bei AhR-Ko Mäusen relevant ist. Daher war es sehr überraschend, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm von AhR^{ΔLck} Mäusen nicht verringert waren und auch nur wenige $\gamma\delta$ T-Zellen das *ahr*-Gen deletiert hatten (Abbildung 3-22). Die AhR^{ΔLck} Mäuse zeigen also keine Veränderung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm, weisen aber eine instabile OT auf, was wiederum zu dem Schluss führt, dass die $\gamma\delta$ T-Zellen auf das hier verwendete OT-Protokoll keinen Einfluss haben.

Ke et al. (1997) zeigten eine Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmgewebe um ganze 96%, was die Induktion einer OT verhinderte. Dies wurde durch eine Injektion mit GL3-Anitkörpern erreicht, die an den $\gamma\delta$ TCR binden.

Bei meinen Untersuchungen hingegen waren die $\gamma\delta$ T-Zellen im Darmgewebe von AhR-Ko Mäusen um nur etwa die Hälfte geringer als bei Wildtyp-Wurfgeschwistern. Möglicherweise ist eine Halbierung der $\gamma\delta$ T-Zellanzahl im Darm nicht ausreichend, um einen Effekt auf die OT auszulösen. Dafür sprechen würde, dass bei AhR-Ko Mäusen keine signifikanten Unterschiede beim KGF-Signalweg und der *kfg*-Expression gefunden wurden (vgl. Abbildung 3-9), welches von $\gamma\delta$ T-Zellen produziert wird (Boismenu & Havran, 1994).

Die OT-Versuche mit AhR^{Δ_{ck}} Tieren zeigen, dass der AhR in T-Zellen für eine stabile OT notwendig ist. Da es mehrere T-Zellpopulationen gibt, wurden die Expressionen von T-Zell-relevanten Genen im Darm von AhR-Ko Tieren analysiert.

Es ist bekannt, dass eine AhR-Aktivierung bei T-Zellen zur stärkeren Sezernierung von IL10 führt (Apetoh et al., 2010; Gandhi et al., 2010) und IL6 AhR-abhängig induziert wird (Hollingshead et al., 2008; Kolasa et al., 2013). Im Umkehrschluss sind geringere *il6*- und *il10*-Expressionen bei AhR-Defizienz erwartet worden. Bei AhR-Ko Mäusen fand ich eine Halbierung der *il10*- und *il6*- bzw. im Jejunum zusätzlich eine geringerer *tgfb*-Expression (vgl. Abbildung 3-12). Aufgrund dieser Zytokin-Unterschiede wurden deutliche Veränderungen in der T-Zellzusammensetzung im Darm von AhR-Ko Tieren erwartet, weswegen ich Treg und Th17 Zellen in den OT-relevanten Geweben untersuchte. Der Fokus auf diese T-Zellen erfolgte, weil in vielen Untersuchungen zur OT festgestellt wurde, dass Treg notwendig für die OT sind (Kim et al., 2016; Weiner et al., 2011). Auf der anderen Seite sind entzündliche Th17 Zellen ein direkter Gegenspieler zu Treg (Bettelli et al., 2006). So ist z.B. die Balance zwischen Treg und Th17 Zellen für die OT entscheidend (Matteoli et al., 2010) und bei der Durchbrechung der OT durch TCDD sind mehr Th17 Zellen in den MLN vorhanden (Chmill et al., 2010). Außerdem ist der AhR als Modulator für die Differenzierung von Treg und Th17 Zellen bekannt (Quintana et al., 2008).

Im naiven Zustand zeigten die AhR-Ko Mäuse im Vergleich zu den Wildtypwurfgeschwistern keine signifikanten Unterschiede für CD4, Treg oder Th17 Zellen in LP oder MLN (Abbildung 3-13). Eine mögliche Erklärung ist, dass die AhR-Defizienz bei sauber gehaltenen Mäusen (SPF-Bedingungen) und ohne eine immunologische Belastung zu keiner Verschiebung der Balance zwischen Treg und Th17 Zellen in den untersuchten Organen führt. Ähnliches wurde schon für die AhR-Aktivierung durch TCDD von Quintana und Kollegen beschrieben. Sie zeigten, dass die alleinige TCDD-Belastung nicht zu einer Veränderung der Treg Anzahl im ableitenden Lymphknoten von der Injektion führt. Erst durch eine zusätzliche Immunisierung stieg die Anzahl der Treg im Lymphknoten an (Quintana et al., 2008).

Um festzustellen, ob sich aufgrund der Immunisierungen und Verstärkungsinjektionen in den OT-Versuchen mit AhR-Ko Mäusen die Zusammensetzung der T-Zellen in den OT-relevanten Organen verändert, wurden diese Organe auch am Ende der OT-Versuche durchflusszytometrisch analysiert. Die Tiere erhielten mehrere Immunisierungen, die insbesondere aufgrund des CFA zu entzündlichen Reaktionen an der Injektionsstelle führen können. Bei starken Entzündungen des Darmgewebes, wie bei einer DSS-induzierten Kolitis, führt die AhR-Defizienz zu mehr Th17 Zellen im Darm (Brandstätter et al., 2016). Aus diesem Grund wurden am Ende eines OT-Versuches mehr Th17 Zellen im Darm von AhR-Ko Mäusen erwartet. Diese Vermutung konnte aber nicht bestätigt werden, da keine signifikanten Unterschiede bei Treg oder Th17 Zellen in LP oder MLN zu Wt-Wurfgeschwistern gefunden wurden (Abbildung 3-16). Somit wurde die Balance zwischen Treg und Th17 Zellen durch die vier Immunisierungen nicht verändert. Dementsprechend liegt bei der instabilen OT von AhR-Ko Mäusen keine Entzündung vor, die zu mehr Th17 Zellen im Darm führt, wie es bei einer DSS-induzierten Kolitis der Fall ist (Brandstätter et al., 2016).

Neben der Balance von Treg und Th17 Zellen ist auch die Anzahl der Lymphozyten für den Verlauf einer Lebensmittelallergie oder Entzündung entscheidend. Dies konnte schon bei Untersuchungen gezeigt werden, in denen eine starke Verringerung der CD4 Zellen und Treg in der LP zur erhöhten Anfälligkeit einer Lebensmittelallergie führten (Kim et al., 2016). Bei induzierten Kolitis-Modellen führt eine Verringerung der Treg in LP und MLN zu einem schwereren Verlauf der Kolitis (Wang et al., 2015).

Bei meinen OT-Versuchen unter systemischer AhR-Defizienz zeigten ausschließlich die mit OVA gefütterten Wildtypmäuse (OVA-Wt) im MLN eine signifikant höhere Frequenz an CD4 Zellen. Die OVA-gefütterten AhR-Ko Mäuse zeigten hingegen den gleichen Anteil an CD4 Zellen, wie die PBS-Kontrollgruppen beider Genotypen (Abbildung 3-16-B). Eine mögliche Erklärung, warum AhR-Ko Mäuse durch die OVA-Fütterung nicht mehr CD4 Zellen im MLN aufweisen als die PBS-Kontrolltiere, kann die geringere *il10*-Expression im Darmgewebe von AhR-Ko Mäusen sein (Abbildung 3-12). Sie deutet auf eine geringere T-Zellproliferation im Darmgewebe hin und dadurch stehen auch weniger T-Zellen zur Auswanderung in den MLN zur Verfügung. Inwieweit die geringere Anzahl an CD4 Zellen im MLN ursächlich für die instabilere OT der AhR-Ko Mäuse ist, konnte nicht geklärt werden. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig. Zum einen müsste geklärt werden, ob eine geringere *il10*-Expression im Darmgewebe ursächlich für den geringeren Anteil an CD4 Zellen im MLN sein kann. Diese Frage könnte durch eine zusätzliche orale Gabe von IL10-Antikörpern während eines OT-Versuches untersucht werden. Zum anderen muss geklärt werden, ob der geringere Anteil an CD4 Zellen im MLN ausreichend ist, um eine instabile OT zu verursachen.

Durch die *ex vivo* T-Zellstimulation konnte der Mechanismus der instabilen OT auch nicht genauer geklärt werden (Abbildung 3-26). Bei der *ex vivo* T-Zellstimulation werden alle T-Zellen angesprochen, wodurch mögliche Unterschiede bei AhR-defizienten T-Zellen in der Messung deutlich werden sollten. Denn in der *in vivo* Situation, also bei den OT-Versuchen, werden durch die Immunisierung und Verstärkungsinjektionen nicht alle T-Zellen, sondern nur OVA-spezifische T-Zellen angesprochen. Deshalb könnten *in vivo* zu wenig Zellen betroffen gewesen sein, um einen Unterschied messen zu können.

Die Aktivierungsmarker (CD69, CD25) wurden in der *ex vivo* T-Zellstimulation betrachtet, weil eine schwächere Aktivierung der Treg bzw. eine stärkere der Th17 Zellen mögliche Ursachen für eine instabile OT darstellen.

Zwischen AhR-defizienten T-Zellen und den Wt-Kontrollzellen wurden aber keine Unterschiede für CD4, CD8 oder den Treg, Th17 Zellen gefunden. Der einzige Unterschied war ein signifikant größerer Anteil an Th17 Zellen bei den Milzzellen von AhR-Ko Tieren (Abbildung 3-26-A). Eine solche Erhöhung der Th17 Zellanzahl war aber in den *in vivo* Situationen sowohl bei naiven AhR-Ko Tieren (Abbildung 3-13), als auch bei AhR-Ko Tieren am Ende des OT-Versuches (Abbildung 3-16) nicht signifikant gemessen worden. Es wäre daher sehr interessant, nur die OVA-spezifischen CD4 T-Zellen *in vivo* analysieren zu können. Dadurch könnte der gefundene *ex vivo* Anstieg von Th17 Zellen unter AhR-Defizienz im *in vivo* Model überprüft werden. Die antigenspezifische Färbung von CD4 Zellen mit MHC-II Tetrameren wäre eine mögliche Methode dafür, sie ist aber noch nicht kommerziell erhältlich (Kurtulus & Hildeman, 2013; Landais et al., 2009; Vollers & Stern, 2008).

In den Analysen der T-Zellen wurde sich auf T-Helferzellen (CD4 T-Zellen) konzentriert, weil in der Literatur kein Bezug von zytotoxischen T-Zellen (CD8 T-Zellen) zur OT bekannt ist. Es ist in der Literatur aber bekannt, dass unter AhR-Defizienz weniger CD8 Zellen in der LP vorliegen (Brandstätter et al., 2016; Y. Li et al., 2011). Diesen Befund konnte ich bestätigen (Anhang, Abbildung 6-1), habe ihn aber im Zusammenhang mit der OT nicht weiter untersucht.

4.1.1. Induktion und Stabilität der OT wird nicht von AhR-Defizienz im Darmepithel, DCs oder einer AhR-ligandenfreien Diät beeinflusst

Die Induktion einer OT beginnt im Darmgewebe mit der Aufnahme der Antigene von den IECs und der Antigen-Prozessierung in DCs, weswegen diese Zelltypen insbesondere an der Induktionsphase der OT beteiligt sind. Die IECs und DCs exprimieren den AhR, weshalb die Auswirkung der AhR-Defizienz in diesen Zellen auf die OT untersucht wurde. Weder führte die zellspezifische *ahr*-Deletion in DCs noch in IECs zur Destabilisierung der OT (Abbildung 3-18 und Abbildung 3-20). Somit hat der AhR in diesen beiden Zelltypen keine Auswirkung auf die Induktion oder Aufrechterhaltung der OT.

Unter systemischer AhR-Defizienz wurden aber signifikante Unterschiede bei den DCs gefunden. In der LP von naiven AhR-Ko Tieren sind signifikant mehr DCs und dementsprechend auch mehr CD103 DCs vorhanden (Abbildung 3-8-A). Wäre das Abwandern dieser DCs vom Darm in die MLN gestört, könnte dies eine schlechtere Induktion der OT bedeuten. In MLN von AhR-Ko Mäusen und Wt-Wurfgeschwistern wurde aber die gleiche Anzahl an DCs gefunden, sodass das Abwandern der CD103 DCs unter AhR-Defizienz nicht gestört zu sein scheint (Abbildung 3-8). Die DCs und CD103 DCs in LP und MLN wurden auch bei AhR^{ΔCD11c} Mäuse betrachtet, wobei am Ende eines OT-Versuches kein Unterschied gemessen wurde (Daten nicht gezeigt).

Die erhöhte Anzahl an CD103 DCs in der LP unter AhR-Defizienz hat vermutlich sogar einen positiven Einfluss auf das entzündungshemmende Milieu im Darmgewebe. Denn die CD103 DCs fördern die Differenzierung von Treg und unterdrücken gleichzeitig die Entstehung von Th17 Zellen aufgrund ihrer Produktion von Retinsäure (Matteoli et al., 2010). Falls eine erhöhte Retinsäurekonzentration im Darmgewebe von AhR-Ko Mäusen vorliegt, könnte diese per Massenspektrometrie bestimmt werden. Dadurch könnte geklärt werden, ob die erhöhte Anzahl von CD103 DCs unter AhR-Defizienz eine mögliche Entzündungsreaktion kompensiert.

Die Bedeutung der AhR-Liganden in der Nahrung für die OT wurde ebenfalls untersucht, denn es konnte schon gezeigt werden, dass AhR-Liganden das Immunsystem des Darms beeinflussen. So verringert die ALFD nach drei Wochen die Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen im Dünndarm bei Mäusen um ein Viertel (Y. Li et al., 2011) und die Anzahl der ILFs ist ebenfalls reduziert (Kiss et al., 2011). Für meine Diätstudien nutzte ich das gleiche Futter, welches in Li et al. und Kiss et al. verwendet wurde. Ich konnte auch zeigen, dass die ALFD zu einer geringeren Expression von *cyp1a1* im Darmgewebe führt (Abbildung 3-4 bzw. Li et al. 2011). Dies veranschaulicht eine geringere AhR-Aktivität im Dünndarm der Mäuse auf ALFD und es wird angenommen, dass die beschriebenen Veränderungen im Darmgewebe wie bei Li et al. und Kiss et al. ebenfalls vorhanden waren.

Überraschenderweise führte die ALFD aber nicht zu einer Destabilisierung der OT (Abbildung 3-5). Dementsprechend führen die beschriebenen Veränderungen des Darmgewebes unter ALFD und die fehlenden AhR-Liganden aus der Nahrung nicht zu einer schlechteren Induktion der OT und haben auch keinen Einfluss auf deren Stabilität. Die von Li et al. beschriebene Reduzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen im Darm reichte trotz deren Bedeutung für die OT (Ke et al., 1997), nicht aus, um die OT zu beeinflussen. Dies spricht für die oben schon genannte Interpretation, dass die Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen sehr stark reduziert sein muss, um die OT zu beeinflussen.

Weiterhin erschließt sich, dass die AhR-Aktivität in T-Zellen auch unter ALFD ausreichend ist, um die Stabilität der OT zu gewährleisten. Vermutlich wird diese AhR-Aktivierung durch endogene AhR-Liganden, z.B. ITE oder FICZ, induziert (Esser & Rannug, 2015) und nicht durch direkte Nahrungsmittelliganden. Hingegen ist es unwahrscheinlich, dass der Zeitraum der Diät-Umstellung auf ALFD vor OT-Induktion mit drei Wochen zu kurz war. Denn drei Wochen ALFD-Diät reichten aus, um Veränderung im Darmgewebe hervorzurufen (Kiss et al., 2011; Y. Li et al., 2011) oder sogar den Wasserverlust durch die Hautbarriere zu erhöhen (persönliche Kommunikation mit Katharina Haas).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass der AhR in T-Zellen für die Stabilität der OT von Bedeutung ist, dies aber nicht in einer verschobenen Treg/Th17-Balance begründet liegt. Hingegen ist der AhR im Darmepithel oder in DCs für die Stabilität der OT nicht notwendig und eine AhR-Defizienz hat keine Auswirkungen auf die Induktion der OT. Bei dem verwendeten Fütterungsprotokoll zeigten AhR-Liganden in der Nahrung keine Auswirkung auf die Induktion oder die Stabilität der OT.

Bei der Interpretation dieser Erkenntnisse ist es wichtig, dass sie immer in Bezug auf das verwendete OT-Protokoll gesetzt werden. Unterschiede in verschiedenen OT-Protokollen werden in Abschnitt 4.3.1 diskutiert.

4.2. TCDD verursacht Destabilisierung der OT, aber gleichzeitig eine Immunsuppression

Eine immunsuppressive Wirkung von TCDD tritt schon bei einer sehr geringen Dosis (1 μ g/kg) auf (Vorderstrasse et al., 2003). Bei der von Chmill et al. (2010) durchgeführten Untersuchung zu TCDD und OT wurde eine zehnfach höhere Dosis (10 μ g/kg) vor OT-Induktion verabreicht. Dabei wurde eine Destabilisierung der OT nach zwei Verstärkungsinjektionen beobachtet, wobei angenommen wurde, dass die Mäuse zu diesem Zeitpunkt immer noch mit mehr als 1 μ g/kg TCDD belastet waren (Chmill et al., 2010). Durch die Gabe von TCDD-Erhaltungsdosen untersuchte ich, wie sich eine durchgehende

Belastung mit TCDD auf die Stabilität der OT auswirkt. Ich konnte zeigen, dass die Erhaltungsdosen zur starken Immunsuppression führen, die an der 70% verringerten Antikörperproduktion der PBS-TCDD-Gruppe zu erkennen ist (Abbildung 3-3). Weiterhin trat wie bei Chmill und Kollegen eine Destabilisierung der OT auf. Dies bedeutet, dass trotz der starken Immunsuppression die TCDD belasteten Tiere mehr Antikörper gegen OVA produzierten als die tolerante DMSO-Kontrolle.

Der immunsuppressive Effekt von TCDD wird direkt über Immunzellen und AhR-abhängig verursacht (Nancy I. Kerkvliet, 2002) und betrifft auch spezifisch die Effektorfunktion von CD4 und CD8 T-Zellen (Nancy I Kerkvliet et al., 2002). Zu der Destabilisierung der OT von TCDD belasteten Mäusen kommt es durch mehr IL6 produzierende CD103 DCs und eine Verschiebung der Treg/Th17-Balance im MLN (Chmill et al., 2010). Vergleichbare Befunde konnte ich bei AhR-Ko Mäusen, mit destabilisierter OT, nicht nachweisen. Dadurch wird deutlich, dass zwei unterschiedliche Mechanismen für die OT-Destabilisierung durch TCDD-Belastung bzw. bei systemischer AhR-Defizienz vorliegen. Hierbei ist interessant, dass eine Abweichung der natürlichen AhR-Aktivität, sowohl ins Stärkere durch TCDD, als auch die AhR-Defizienz die gleiche Auswirkung auf die OT haben.

Es ist bekannt, dass die Wirkung der AhR-Aktivierung eine Immuntoleranz stärken oder schwächen kann. So führt die TCDD-vermittelte AhR-Aktivierung bei der Untersuchung der OT zu deren Verschlechterung und entsprechend zu vermehrter Antikörperproduktion (Chmill et al., 2010; Kinoshita et al., 2006). Aber andersherum wirkt TCDD förderlich auf die Toleranz von Transplantaten oder die Inhibierung einer Autoimmunität durch die Erhöhung der Anzahl von Treg (Hauben et al., 2008; Zhang et al., 2010). Wie es zu dieser unterschiedlichen bzw. sogar gegensätzlichen Wirkung einer AhR-Aktivierung kommt, ist eine aktuelle Frage in der Forschung und der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht bekannt. Zu dieser Thematik gibt es aber verschiedene Hypothesen, wobei eine davon vielversprechend ist und diese gegensätzliche Wirkung erklären würde (Merches et al., 2017). Es besteht die Annahme, dass die AhR-Aktivierung ein bestimmtes Optimum besitzt und eine Abweichung ins Schwächere oder Stärkere zu pathologischen Effekten führt. Dieses Optimum ist unter entzündlichen Bedingungen verschoben, sodass eine stärkere AhR-Aktivierung notwendig ist, um das Optimum zu erreichen. Eine mögliche Begründung dafür könnte das in Entzündungsstellen höhere Vorkommen von weiteren AhR-Bindungspartnern sein, wie z.B. NFκB. Dies würde erklären, warum TCDD im gesunden Zustand zu adversen Immunreaktionen führt, sich aber bei einer entzündlichen Autoimmunerkrankung positiv auf die Immuntoleranz auswirkt.

4.3. Die Analyse der oralen Toleranz im Mausmodell

In diesem Abschnitt wird darauf eingegangen, in welchem Maß das verwendete OT-Modell mit der natürlichen Situation einer OT übereinstimmt und inwieweit es einen Bezug zu einer Lebensmittelallergie besitzt.

4.3.1. Modelle der OT sind nur Annäherungen an die natürliche Situation

Bei dem OT-Modell ist die OVA-Dosis für die OT-Induktion entscheidend. Hühnereier enthalten durchschnittlich 1,9g OVA im Eiweiß (Yamamoto & Kim 1997, Seite 14, Tabelle 1). Eine 20g schwere Maus erhält über fünf Tage insgesamt 60mg OVA (3x 20mg OVA, vgl. Abbildung 2-1). Um 60mg OVA auf natürlichem Weg aufzunehmen, müsste die Maus im selben Zeitraum nur 1/30 eines Hühnereies essen, was ca. 2g sind. Dies ist durchaus eine vorstellbare Menge, bei einem Tagesverzehr von 2-3g Haltungsfutter (persönliche Messungen, Daten nicht gezeigt).

Um abzuschätzen, welche Dosis bei Menschen dies entsprechen würde, muss zuerst die Dosis für eine Maus (3x1g OVA/ kg) an die Physiologie des Menschen angepasst werden. In der Pharmakologie und Toxikologie wird für die Extrapolation von murinen Dosen unter anderem die Methode „Dosis bei Faktor“ verwendet, um die äquivalente Dosis für den Menschen zu erhalten. Dieser Faktor berücksichtigt Unterschiede im Metabolismus und im Verhältnis von Körpervolumen zu Körperoberfläche (Sharma & McNeill, 2009). Ein 65kg schwerer Mensch müsste dieser Berechnung entsprechend in fünf Tagen 7,1 Eier zu sich nehmen. Dies wäre eine durchaus große Menge an Eiern, aber dennoch realistisch. Mit diesen Vergleichen wird deutlich, dass die verwendete Dosis für die OT-Induktion (3x20mg i.g.) im Rahmen einer natürlichen Nahrungsaufnahme liegt.

Neben der Dosis ist auch wichtig, über welchen Zeitraum und mit welcher Frequenz das Protein aufgenommen wird, wobei ein längerer Zeitraum zur stabileren OT führt (Faria et al., 2003; Oliveira et al., 2015). Beim Vergleich der mittleren und geringen Dosis aus Abbildung 3-2 wird dies sehr deutlich. Durch die fünfmalige OVA-Gabe über 10 Tage wurde eine stabilere OT induziert, als durch eine einmalige Gabe von OVA. Das für die Versuche verwendete OT-Protokoll (3x20mg i.g.) berücksichtigt also eine angemessene Dosis und auch Frequenz für die OVA-Gabe und ist daher gut mit der natürlichen Aufnahme von Nahrung und OT-Induktion vergleichbar. Darüber hinaus induziert es eine stabile OT, die für die Fragestellung dieser Doktorarbeit nötig war.

Dennoch gibt es Unterschiede zwischen dem Mausmodell und einer natürlichen Nahrungsaufnahme des Menschen. Bei der intragastralen Fütterung mit einer Schlundsonde wird das Protein direkt in den Magen gegeben und hat dementsprechend keinen Kontakt mit den Schleimhäuten des Mundes und der Speiseröhre. Zusätzlich wird die gesamte Dosis auf

einmal verabreicht. Bei einer Aufnahme von OVA z.B. über das Trinkwasser wären diese Unterschiede minimiert, was auch Auswirkungen auf die OT-Induktion hat (Faria et al., 2003). Weiterhin scheint eine sehr häufige Verwendung der Schlundsonde (täglich für 14 Tage) die OT-Induktion zu verhindern, wohingegen die gleiche OVA-Dosis eine OT induzierte, wenn sie langsam und tropfenweise in den Mund der Mäuse gegeben wurde (Kinder et al., 2014). Dies deutet auf eine Beteiligung der Schleimhäute von Mund und Speiseröhre an der OT-Induktion hin.

Ob die AhR-Defizienz bzw. eine zellspezifische *ahr*-Deletion Auswirkungen bei einer OT-Induktion durch OVA-Trinkwasser hat, ist nicht bekannt. Ein erster Versuch deutet dies an, wurde aber mit nur sehr wenigen Tieren durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dies sollte bei Weiterführung des Projektes untersucht werden, weil nicht auszuschließen ist, dass ein anderes OT-Protokoll zu anderen Ergebnissen führen könnte. Dementsprechend sind die gewonnenen Erkenntnisse dieser Doktorarbeit immer im Bezug zu dem verwendeten OT-Protokoll zu setzen.

4.3.2. Beim OT-Modell wird keine Lebensmittelallergie ausgelöst

Neben dem Vergleich des OT-Modells zur natürlichen Situation der OT ist es auch notwendig zu beachten, inwieweit das OT-Modell Aussagen zu einer Lebensmittelallergie ermöglicht. Dadurch soll geklärt werden, ob Rückschlüsse für mögliche Immuntherapien gemacht werden können, die den Mechanismus der OT nutzen.

Ich verwendete ein OT-Protokoll, welches in der Literatur vielfach angewendet und demzufolge als geeignet angesehen wird, um orale Toleranz zu untersuchen (a M. Faria et al., 1998; Kinoshita et al., 2006; Oliveira et al., 2015). Als Analyseparameter diente der α -OVA-IgG1-Titer, welcher widerspiegelt, dass das Immunsystem auf das Protein reagiert, was aber nicht mit einer Lebensmittelallergie gleichzusetzen ist. Bei der tierexperimentellen Forschung von Lebensmittelallergien zeigen die Versuchstiere sichtbare Körperreaktion wie Nasejucken, gerötete Augen, Diarrhöe bis hin zum Tod (Helm, 2002). Solche Körperreaktionen traten bei dem verwendeten Fütterungs- und Immunisierungsprotokoll nicht auf. Dementsprechend ist es unwahrscheinlich, dass das verwendete OT-Protokoll eine Lebensmittelallergie bei den Tieren auslöste.

Dass zwischen einer Lebensmittelallergie und einer OT ein Bezug besteht, gilt als sehr wahrscheinlich. Es wurde bisher nicht eindeutig gezeigt, aber es wird in der Literatur von verschiedenen Autoren angenommen, dass eine Lebensmittelallergie bei Erwachsenen durch eine durchbrochene OT verursacht wird (Bryce, 2016; Chehade & Mayer, 2005). Außerdem weisen Erfolge mit der oralen Immuntherapie auf einen Zusammenhang zwischen OT und Lebensmittelallergien hin. Bei dieser Therapie nehmen z.B. Lebensmittelallergie-Patienten

geringe Mengen des Allergens oral ein, um dadurch eine systemische Desensibilisierung zu erreichen (Cabrera & Urra, 2015). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass der AhR-Ligand I3C, der Teil einer natürlichen Ernährung ist, die OT und auch eine Lebensmittelallergie beeinflusst. Durch die zusätzliche Gabe von I3C in einem OT-Modell wurde die OVA-spezifische Antikörperkonzentration verringert und dementsprechend die OT stabilisiert. Ebenso verringerte I3C den Schweregrad der Symptome einer experimentell ausgelösten Erdnussallergie (Hammerschmidt-Kamper et al., 2017).

4.4. Reduzierte Antikörperproduktion bei verändertem AhR-Signalweg?

In den durchgeführten Experimenten wurde die Auswirkung auf die OT durch eine Veränderung des AhR-Signalweges auf unterschiedliche Weise untersucht. Zum einen durch die Überaktivierung des AhR mit Hilfe von TCDD und zum anderen durch die vollständige oder zellspezifische Inaktivität durch genetische Modifikationen bzw. durch eine reduzierte Aktivität aufgrund fehlender Nahrungsmittelliganden. Die jeweils nicht OT-induzierten Mäuse der PBS-Gruppe dienten als Kontrolle, um die Auswirkung des Genotyps bzw. der Behandlung auf die Immunisierung zu überprüfen. Damit konnte sichergestellt werden, dass nicht alleine aufgrund des Genotyps oder der Behandlung die Antikörperproduktion schon verändert ist.

In diesem Kapitel wurden die Behandlungen bzw. die Genotypen nur zwischen den nicht OT-induzierten Kontrollgruppen miteinander verglichen. So z.B. PBS-DMSO zu PBS-TCDD (Abbildung 3-3) oder PBS-Wt zu PBS-Ko (Abbildung 3-14). Denn der Vergleich innerhalb der PBS-Gruppe zeigte bei allen Experimenten immer den gleichen Trend zu einem geringeren Antikörpertiter bei verändertem AhR-Signalweg. Dieser Trend wird im Folgenden genauer betrachtet.

Bei der Untersuchung der Auswirkung von TCDD auf die OT wurde der AhR bei den TCDD-belasteten Tieren persistent aktiviert. Innerhalb der PBS-Gruppe lag ein signifikanter Unterschied vor, der auf die bekannte immunsupprimierende Wirkung von TCDD zurückgeführt werden kann (Abbildung 3-3 bzw. Kerkvliet & Brauner 1990). Die Behandlungen bzw. die Genotypen in allen anderen Experimenten hatten innerhalb der PBS-Gruppen eine verminderte Antikörperproduktion, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Um diese Verminderung zwischen allen Experimenten leichter zu vergleichen, wurden die verschiedenen PBS-Gruppen in der Abbildung 4-1 zusammengefasst.

In den Darstellungen der verschiedenen Experimente wurde der Antikörpertiter der jeweiligen Kontrolle (PBS-DMSO; PBS-ND; PBS-Wt; PBS-Cre-) auf 100% gesetzt, um eine direkte Aussage zu erhalten, wie stark die Behandlung bzw. der Genotyp die Antikörperproduktion beeinflusst. In Abbildung 4-1 sind diese 100% als Linie dargestellt

und die prozentualen Antikörpertiter der zugehörigen Behandlungen bzw. Genotypen (PBS-TCDD; PBS-ALFD; PBS-Ko; PBS-Cre+) werden als Punkte gezeigt. Dadurch kann direkt verglichen werden, wie stark sich die jeweilige Behandlung bzw. der Genotyp auf die Immunisierungen und die Produktion von Antikörpern auswirkte.

Als erstes wird deutlich, dass nur die TCDD-Behandlung eine signifikante Reduktion der α -OVA-IgG1-Produktion bewirkte. Diese immunsupprimierende Wirkung von TCDD ist bekannt, aber der Mechanismus noch nicht genauer verstanden (Nancy I. Kerkvliet, 2002).

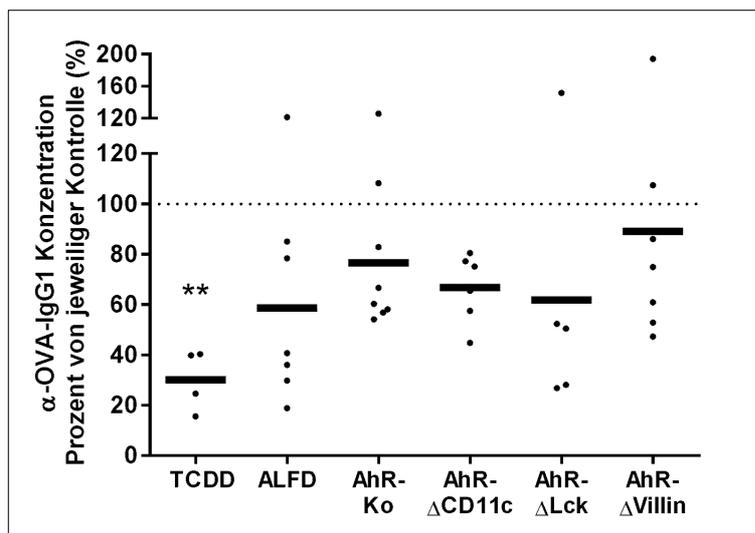


Abbildung 4-1 AhR-Deletion in Immunzellen führt zu einer tendenziell geringeren Antikörperproduktion
 Aus den verschiedenen Experimenten zur Untersuchung der OT wurden nur die α -OVA-IgG1-Titer der PBS-Gruppen in dieser Graphik verglichen. Die jeweiligen PBS-Kontrollen wurden auf 100% gesetzt, was als gepunktete Linie gezeigt wird und die Titer der zugehörigen Behandlungen bzw. Genotypen sind im prozentualen Bezug dazu gesetzt worden. Die Mittelwerte (—) und zusätzlich die einzelnen Werte der Versuchstiere (•) aus den jeweiligen Experimenten werden angegeben. Innerhalb der PBS-Gruppe wurde die Signifikanzberechnung zwischen Kontrolle und Behandlungen bzw. Genotypen im jeweiligen Experiment mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (** \leq 0,01).

Interessant ist aber, dass bei allen Versuchen die Mittelwerte unterhalb der 100% der jeweiligen Kontrolle liegen, was deutlich macht, dass keine der durchgeführten Behandlungen oder getesteten Genotypen zu einer stärkeren Antikörperproduktion führte. Es lässt sich vermuten, dass die Veränderung des AhR-Signalweges generell zu einer schwächeren Antikörperproduktion führte und dass dies stärker ausfiel, wenn die AhR-Defizienz Immunzellen betraf. Denn die geringste Veränderung in der Antikörperproduktion wurde bei AhR ^{Δ Villin} Mäusen gemessen, bei denen nur die intestinalen Epithelzellen AhR-defizient waren.

Ein wichtiger Unterschied zwischen der Behandlung mit TCDD und allen anderen Behandlungen bzw. Genotypen war, dass TCDD eine persistente AhR-Aktivierung auslöst und bei den anderen Versuchen eine *ahr*-Deletion oder fehlende AhR-Liganden vorlagen. Es

konnte in dieser Arbeit schon gezeigt werden, dass sowohl eine AhR-Überaktivierung als auch eine AhR-Inaktivität zu dem gleichen Effekt führten. So zeigten die drei Versuche mit der TCDD-Behandlung (Abbildung 3-3), mit AhR-Ko Mäusen (Abbildung 3-14) oder mit AhR^{ΔLck} Mäusen (Abbildung 3-23) die gleiche Verschlechterung der OT-Stabilität. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass die AhR-Inaktivität ebenfalls eine immunsupprimierende Wirkung hat, wie die bekannte AhR-Überaktivierung durch TCDD. Denn wie schon beschrieben, können die Inhibierung oder Aktivierung des AhR eine ähnliche Auswirkung hervorrufen (Merches et al., 2017). Dennoch sind die besprochenen Unterschiede bei der AhR-Inaktivität nicht signifikant (Abbildung 4-1), weshalb die mögliche immunsupprimierende Wirkung nicht als Ergebnis, sondern nur als interessanter Hinweis für eine neue Fragestellung zu verstehen ist. Diese Fragestellung sollte weiter untersucht werden, um zu klären, ob eine AhR-Inaktivität ebenfalls eine immunsupprimierende Wirkung hat.

5. Referenzen

- Andreola, F., Fernandez-Salguero, P. M., Chiantore, M. V., Petkovich, M. P., Gonzalez, F. J., & De Luca, L. M. (1997). **Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism.** *Cancer Research*, 57(14), 2835–8.
- Apetoh, L., Quintana, F. J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., ... Kuchroo, V. K. (2010). **The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27.** *Nature Immunology*, 11(9), 854–61.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). **Immunobiology of dendritic cells.** *Annual Review of Immunology*, 18(Figure 1), 767–811.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., & Kuchroo, V. K. (2006). **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature*, 441(7090), 235–8.
- Billiau, a, & Matthys, P. (2001). **Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases.** *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 849–860.
- Bock, K. W. (2017). **Human and rodent aryl hydrocarbon receptor (AHR): from mediator of dioxin toxicity to physiologic AHR functions and therapeutic options.** *Biological Chemistry*, 398, 455-464.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., ... Merad, M. (2009). **Origin of the lamina propria dendritic cell network.** *Immunity*, 31(3), 513–25.
- Boismenu, R., & Havran, W. L. (1994). **Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells.** *Science (New York, N.Y.)*, 266(5188), 1253–5.
- Brandstätter, O., Schanz, O., Vorac, J., König, J., Mori, T., Maruyama, T., ... Förster, I. (2016). **Balancing intestinal and systemic inflammation through cell type-specific expression of the aryl hydrocarbon receptor repressor.** *Scientific Reports*, 6(April), 26091.
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. (2008). **Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue.** *Mucosal Immunology*, 1(1), 31–7.
- Bryce, P. J. (2016). **Balancing Tolerance or Allergy to Food Proteins.** *Trends in Immunology*, 37(10), 659–667.
- Cabrera, C. M., & Urra, J. M. (2015). **Food allergy and the oral immunotherapy approach.** *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63(1), 31–9.
- Caton, M. L., Smith-Raska, M. R., & Reizis, B. (2007). **Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8⁻ dendritic cells in the spleen.** *The Journal of Experimental Medicine*, 204(7), 1653–64.
- Cerovic, V., Houston, S. A., Scott, C. L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A. M., & Milling, S. W. F. (2013). **Intestinal CD103⁻ dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells.** *Mucosal Immunology*, 6(1), 104–13.
- Chehade, M., & Mayer, L. (2005). **Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities.** *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 3–12; quiz 13.
- Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W. L., & Boismenu, R. (2002). **Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14338–43.

- Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (1995). **Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance.** *Nature*, 376(6536), 177–80.
- Chmill, S., Kadow, S., Winter, M., Weighardt, H., & Esser, C. (2010). **2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs stable establishment of oral tolerance in mice.** *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 118(1), 98–107.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Cárceo, C. V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., & Powrie, F. (2007). **A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.** *The Journal of Experimental Medicine*, 204(8), 1757–64.
- De Faria, A. M., Ficker, S. M., Speziali, E., Menezes, J. S., Stransky, B., Silva Rodrigues, V., & Vaz, N. M. (1998). **Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice.** *Mechanisms of Ageing and Development*, 102(1), 67–80.
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). **Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 309–34.
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., & Bonati, L. (2002). **Ligand binding and activation of the Ah receptor.** *Chemico-Biological Interactions*, 141(1-2), 3–24.
- Denning, T. L., Norris, B. A., Medina-Contreras, O., Manicassamy, S., Geem, D., Madan, R., Karp, C. L., & Pulendran, B. (2011). **Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(2), 733–47.
- Diliberto, J. J., DeVito, M. J., Ross, D. G., & Birnbaum, L. S. (2001). **Subchronic exposure of [3H]-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female B6C3F1 mice: Relationship of steady-state levels of disposition and metabolism.** *Toxicological Sciences*, 61(2), 241–255.
- Dong, B., Cheng, W., Li, W., Zheng, J., Wu, D., Matsumura, F., & Vogel, C. F. A. (2011). **FRET analysis of protein tyrosine kinase c-Src activation mediated via aryl hydrocarbon receptor.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810(4), 427–31.
- Esser, C., & Rannug, A. (2015). **The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology.** *Pharmacological Reviews*, 67(2), 259–79.
- Faria, a M., Ficker, S. M., Speziali, E., Menezes, J. S., Stransky, B., Verdolin, B. a, Lahmann, W. M., Rodrigues, V. S., & Vaz, N. M. (1998). **Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas E Biologicas*, 31(1), 35–48.
- Faria, A. M. C., Maron, R., Ficker, S. M., Slavin, A. J., Spahn, T., & Weiner, H. L. (2003). **Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Journal of Autoimmunity*, 20(2), 135–45.
- Faria, A. M. C., & Weiner, H. L. (2005). **Oral tolerance.** *Immunological Reviews*, 206(5), 232–59.
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2010). **Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures.** *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 47–59.
- Fowler, E., & Weiner, H. L. (1997). **Oral tolerance: elucidation of mechanisms and application to treatment of autoimmune diseases.** *Biopolymers*, 43(4), 323–35.
- Frericks, M., Meissner, M., & Esser, C. (2007). **Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(3), 320–32.

- Friedman, A., & Weiner, H. L. (1994). **Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6688–92.
- Fritsche, E., Schäfer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., ... Krutmann, J. (2007). **Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 8851–6.
- Gallucci, S., & Matzinger, P. (2001). **Danger signals: SOS to the immune system.** *Current Opinion in Immunology*.
- Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E. J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H. L., & Quintana, F. J. (2010). **Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells.** *Nature Immunology*, 11(9), 846–53.
- Garvin, A. M., Abraham, K. M., Forbush, K. A., Farr, A. G., Davison, B. L., & Perlmutter, R. M. (1990). **Disruption of thymocyte development and lymphomagenesis induced by SV40 T-antigen.** *International Immunology*, 2(2), 173–80.
- Garvin, A. M., Pawar, S., Marth, J. D., & Perlmutter, R. M. (1988). **Structure of the murine lck gene and its rearrangement in a murine lymphoma cell line.** *Molecular and Cellular Biology*, 8(8), 3058–64.
- Golde, W. T., Gollobin, P., & Rodriguez, L. L. (2005). **A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet.** *Lab Animal*, 34(9), 39–43.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., ... Pabst, O. (2011). **Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria.** *Immunity*, 34(2), 237–46.
- Hammerschmidt-Kamper, C., Biljes, D., Merches, K., Steiner, I., Daldrup, T., Bol-Schoenmakers, M., Pieters, R. H. H., & Esser, C. (2017). **Indole-3-carbinol, a plant nutrient and AhR-Ligand precursor, supports oral tolerance against OVA and improves peanut allergy symptoms in mice.** *Plos One*, 12(6), e0180321.
- Hauben, E., Gregori, S., Draghici, E., Migliavacca, B., Olivieri, S., Woisetschläger, M., & Roncarolo, M. G. (2008). **Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells.** *Blood*, 112(4), 1214–22.
- Helm, R. M. (2002). **Food allergy animal models: an overview.** *Ann N Y Acad Sci*, 964, 139–50.
- Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. a., & Marth, J. D. (1995). **T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12070–4.
- Hoeppli, R. E., Wu, D., Cook, L., & Levings, M. K. (2015). **The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome.** *Frontiers in Immunology*, 6(FEB), 61.
- Hollingshead, B. D., Beischlag, T. V., Dinatale, B. C., Ramadoss, P., & Perdew, G. H. (2008). **Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells.** *Cancer Research*, 68(10), 3609–17.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., & Kawajiri, K. (2004). **Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2), 545–50.

- Inui, H., Itoh, T., Yamamoto, K., Ikushiro, S.-I., & Sakaki, T. (2014). **Mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and coplanar polychlorinated biphenyls.** *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14044–57.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., & Song, S.-Y. (2004). **Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.** *Immunity*, 21(4), 527–38.
- Jeuken, A., Keser, B. J. G., Khan, E., Brouwer, A., Koeman, J., & Denison, M. S. (2003). **Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5478–87.
- Johansson-Lindbom, B., & Agace, W. W. (2007). **Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa.** *Immunological Reviews*, 215(1), 226–42.
- Jux, B., Kadow, S., & Esser, C. (2009). **Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11), 6709–17.
- Kadow, S., Jux, B., Zahner, S. P., Wingerath, B., Chmill, S., Clausen, B. E., Hengstler, J., & Esser, C. (2011). **Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gamma delta T cells in the murine epidermis.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(6), 3104–10.
- Kasarekło, K., Gadamski, R., Piotrowski, P., Kurzepa, K., Kwiatkowska-Patzer, B., & Lipkowski, A. W. (2015). **Effect of oral administration of pig spinal cord hydrolysate on clinical and histopathological symptoms of experimental allergic encephalomyelitis in rats.** *Folia Neuropathologica*, 53(2), 128–38.
- Ke, Y., Pearce, K., Lake, J. P., Ziegler, H. K., & Kapp, J. A. (1997). **Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(8), 3610–8.
- Kerkvliet, N. I. (2002). **Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity.** *International Immunopharmacology*, 2(2-3), 277–91.
- Kerkvliet, N. I., & Brauner, J. A. (1990). **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).** *Environmental Research*, 52(2), 146–54.
- Kerkvliet, N. I., Shepherd, D. M., & Baecher-Steppan, L. (2002). **T lymphocytes are direct, aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): AhR expression in both CD4+ and CD8+ T cells is necessary for full suppression of a cytotoxic T lymphocyte response by TCDD.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 185(2), 146–52.
- Kim, K. S., Hong, S.-W., Han, D., Yi, J., Jung, J., Yang, B.-G., Lee, J. Y., Lee, M., & Surh, C. D. (2016). **Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine.** *Science (New York, N.Y.)*, 351(6275).
- Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., & Kishimoto, T. (2008). **Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9721–6.
- Kinder, J. M., Then, J. E., Hansel, P. M., Molinero, L. L., & Bruns, H. A. (2014). **Long-term repeated daily use of intragastric gavage hinders induction of oral tolerance to ovalbumin in mice.** *Comparative Medicine*, 64(5), 369–76.

- Kinoshita, H., Abe, J., Akadegawa, K., Yurino, H., Uchida, T., Ikeda, S., Matsushima, K., & Ishikawa, S. (2006). **Breakdown of mucosal immunity in gut by 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 11(5), 256–63.
- Kiss, E. a, Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., & Diefenbach, A. (2011). **Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles**. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1561–5.
- Koffeman, E. C., Genovese, M., Amox, D., Keogh, E., Santana, E., Matteson, E. L., ... Albani, S. (2009). **Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial**. *Arthritis and Rheumatism*, 60(11), 3207–16.
- Kolasa, E., Houlbert, N., Balaguer, P., & Fardel, O. (2013). **AhR- and NF- κ B-dependent induction of interleukin-6 by co-exposure to the environmental contaminant benzo[a]anthracene and the cytokine tumor necrosis factor- α in human mammary MCF-7 cells**. *Chemico-Biological Interactions*, 203(2), 391–400.
- Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). **Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system**. *Scientific Reports*, 5(May), 10775.
- Kraus, T. A., Brimnes, J., Muong, C., Liu, J., Moran, T. M., Tappenden, K. A., Boros, P., & Mayer, L. (2005). **Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-deficient, ligated small bowel loops**. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2234–43.
- Kurtulus, S., & Hildeman, D. (2013). **Assessment of CD4(+) and CD8 (+) T cell responses using MHC class I and II tetramers**. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 979(1), 71–9.
- Lahvis, G. P., & Bradfield, C. a. (1998). **Ahr null alleles: distinctive or different?** *Biochemical Pharmacology*, 56(7), 781–7.
- Landais, E., Romagnoli, P. A., Corper, A. L., Shires, J., Altman, J. D., Wilson, I. A., Garcia, K. C., & Teyton, L. (2009). **New design of MHC class II tetramers to accommodate fundamental principles of antigen presentation**. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(12), 7949–57.
- Levine-Fridman, A., Chen, L., & Elferink, C. J. (2004). **Cytochrome P450A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity**. *Molecular Pharmacology*, 65(2), 461–9.
- Li, W., Donat, S., Döhr, O., Unfried, K., & Abel, J. (1994). **Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(2), 279–84.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D. R., Roberts, N. a, Gallagher, A. R., Grigorieva, E. F., Wilhelm, C., & Veldhoen, M. (2011). **Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation**. *Cell*, 147(3), 629–40.
- Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H., & Kim, C. H. (2005). **Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells**. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(7), 4180–3.
- Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013). **Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium**. *Mucosal Immunology*, 6(4), 666–77.
- Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E., & Gumucio, D. L. (2002). **Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical**

- (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine.** *The Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33275–83.
- Marcus, R. S., Holsapple, M. P., & Kaminski, N. E. (1998). **Lipopolysaccharide activation of murine splenocytes and splenic B cells increased the expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287(3), 1113–8.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I. D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., & Rescigno, M. (2010). **Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction.** *Gut*, 59(5), 595–604.
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., & Rescigno, M. (2014). **Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1+ macrophages to CD103+ dendritic cells.** *Immunity*, 40(2), 248–61.
- McGuire, J., Whitelaw, M. L., Pongratz, I., Gustafsson, J. A., & Poellinger, L. (1994). **A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor.** *Molecular and Cellular Biology*, 14(4), 2438–46.
- Melamed, D., & Friedman, A. (1994). **In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression.** *European Journal of Immunology*, 24(9), 1974–1981.
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2010). **Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens.** *Mucosal Immunology*, 3(3), 247–59.
- Menning, A., Loddenkemper, C., Westendorf, A. M., Szilagyi, B., Buer, J., Siewert, C., Hamann, A., & Huehn, J. (2010). **Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation.** *European Journal of Immunology*, 40(9), 2539–48.
- Merchant, M., Morrison, V., Santostefano, M., & Safe, S. (1992). **Mechanism of action of aryl hydrocarbon receptor antagonists: inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(2), 389–94.
- Merches, K., Haarmann-Stemmann, T., Weighardt, H., Krutmann, J., & Esser, C. (2017). **AHR in the skin: From the mediator of chloracne to a therapeutic panacea?** *Current Opinion in Toxicology*, 2, 79–86.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1999). **Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function.** *Genes & Development*, 13(1), 20–5.
- Morales, J. L., & Perdew, G. H. (2007). **Carboxyl terminus of hsc70-interacting protein (CHIP) can remodel mature aryl hydrocarbon receptor (AhR) complexes and mediate ubiquitination of both the AhR and the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in vitro.** *Biochemistry*, 46(2), 610–21.
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). **Regional specialization within the intestinal immune system.** *Nat Rev Immunol*, 14(10), 667–685.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007). **Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid.** *Science (New York, N.Y.)*, 317(5835), 256–60.

- Murphy, K. M., Heimberger, A. B., & Loh, D. Y. (1990). **Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes in vivo.** *Science (New York, N.Y.)*, 250(4988), 1720–3.
- Nguyen, L. P., & Bradfield, C. a. (2008). **The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor.** *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), 102–16.
- Noack, M., & Miossec, P. (2014). **Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases.** *Autoimmunity Reviews*, 13(6), 668–677.
- Notter, R. H. (2000). *Lung Surfactants: Basic Science and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Oliveira, R. P., Santiago, A. F., Ficker, S. M., Gomes-Santos, A. C., & Faria, A. M. C. (2015). **Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects.** *Journal of Immunological Methods*, 421, 36–43.
- Orban, P. C., Chui, D., & Marth, J. D. (1992). **Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 6861–5.
- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). **The Fibroblast Growth Factor signaling pathway.** *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 4(3), 215–66.
- Owen, R. L., & Jones, A. L. (1974). **Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles.** *Gastroenterology*, 66(2), 189–203.
- Pabst, O., & Mowat, a M. (2012). **Oral tolerance to food protein.** *Mucosal Immunology*, 5(3), 232–9.
- Pohjanvirta, R., Korkalainen, M., McGuire, J., Simanainen, U., Juvonen, R., Tuomisto, J. T., ... Tuomisto, J. (2002). **Comparison of acute toxicities of indolo[3,2-b]carbazole (ICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive rats.** *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(7), 1023–32.
- Qiu, J., & Zhou, L. (2013). **Aryl hydrocarbon receptor promotes ROR γ t group 3 ILCs and controls intestinal immunity and inflammation.** *Seminars in Immunopathology*, 35(6), 657–70.
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., & Weiner, H. L. (2008). **Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor.** *Nature*, 453(7191), 65–71.
- Schmidt, J. V, Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C., & Bradfield, C. a. (1996). **Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6731–6.
- Schütt, C., & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwartz, R. H. (2003). **T cell anergy.** *Annual Review of Immunology*, 21(1), 305–34.
- Scott, C. L., Aumeunier, A. M., & Mowat, A. M. (2011). **Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance?** *Trends in Immunology*, 32(9), 412–9.
- Sharma, V., & McNeill, J. H. (2009). **To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation.** *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 907–21.
- Siddiqui, K. R. R., & Powrie, F. (2008). **CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells.** *Mucosal Immunology*, 1 Suppl 1(November), S34–8.

- Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). **Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.** *Pharmacological Reviews*, 56(3), 387–437.
- Smith, W. L., Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1996). **Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2.** *The Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33157–60.
- Song, J., Clagett-Dame, M., Peterson, R. E., Hahn, M. E., Westler, W. M., Sicinski, R. R., & DeLuca, H. F. (2002). **A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14694–9.
- Spahn, T. W., Fontana, A., Faria, A. M., Slavin, A. J., Eugster, H. Pietro, Zhang, X., ... Weiner, H. L. (2001). **Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches.** *European Journal of Immunology*, 31(4), 1278–87.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., ... Vivier, E. (2013). **Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature.** *Nature Reviews. Immunology*, 13(2), 145–9.
- Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., & Duarte, J. H. (2014). **The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system.** *Annual Review of Immunology*, 32, 403–32.
- Sun, Y. V., Boverhof, D. R., Burgoon, L. D., Fielden, M. R., & Zacharewski, T. R. (2004). **Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences.** *Nucleic Acids Research*, 32(15), 4512–4523.
- Thomas, S. M., & Brugge, J. S. (1997). **Cellular functions regulated by Src family kinases.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 513–609.
- Thomson, A. W., & Knolle, P. a. (2010). **Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment.** *Nature Reviews. Immunology*, 10(11), 753–66.
- Tsuji, N. M., Mizumachi, K., & Kurisaki, J.-I. (2003). **Antigen-specific, CD4+CD25+ regulatory T cell clones induced in Peyer's patches.** *International Immunology*, 15(4), 525–34.
- Van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H., & Olson, J. R. (1994). **The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity.** *Critical Reviews in Toxicology*, 24(1), 1–74.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., & Stockinger, B. (2008). **The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins.** *Nature*, 453(7191), 106–9.
- Vicente-Suarez, I., Larange, A., Reardon, C., Matho, M., Feau, S., Chodaczek, G., ... Cheroutre, H. (2015). **Unique lamina propria stromal cells imprint the functional phenotype of mucosal dendritic cells.** *Mucosal Immunology*, 8(1), 141–51.
- Vogel, C., Boerboom, a M., Baechle, C., El-Bahay, C., Kahl, R., Degen, G. H., & Abel, J. (2000). **Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway.** *Carcinogenesis*, 21(12), 2267–74.
- Vollers, S. S., & Stern, L. J. (2008). **Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects.** *Immunology*, 123(3), 305–13.
- Vorderstrasse, B. A., Bohn, A. A., & Lawrence, B. P. (2003). **Examining the relationship between impaired host resistance and altered immune function in mice treated with TCDD.** *Toxicology*, 188(1), 15–28.
- W. Quimby, F., & H. Luong, R. (2007). **Chapter 6 - Clinical Chemistry of the Laboratory Mouse BT - The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)** (pp. 171–216). Burlington: Academic Press.

- Wagner, M., Rajasekaran, a K., Hanzel, D. K., Mayor, S., & Rodriguez-Boulan, E. (1994). **Brefeldin A causes structural and functional alterations of the trans-Golgi network of MDCK cells.** *Journal of Cell Science*, 107 (Pt 4, 933–43.
- Walisser, J. A., Glover, E., Pande, K., Liss, A. L., & Bradfield, C. A. (2005). **Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17858–63.
- Wang, L., Ray, A., Jiang, X., Wang, J., Basu, S., Liu, X., ... Chu, Y. (2015). **T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis.** *Mucosal Immunology*, 8(6), 1297–312.
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., & Wu, H. (2011). **Oral tolerance.** *Immunological Reviews*, 241(1), 241–59.
- Wheeler, J. L. H., Martin, K. C., Resseguie, E., & Lawrence, B. P. (2014). **Differential consequences of two distinct AhR ligands on innate and adaptive immune responses to influenza A virus.** *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 137(2), 324–34.
- Whitelaw, M., Pongratz, I., Wilhelmsson, A., Gustafsson, J. a, & Poellinger, L. (1993). **Ligand-dependent recruitment of the Arnt coregulator determines DNA recognition by the dioxin receptor.** *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2504–14.
- Whitlock, J. P. (1999). **Induction of cytochrome P4501A1.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 103–25.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Förster, R., & Pabst, O. (2006). **Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells.** *The Journal of Experimental Medicine*, 203(3), 519–27.
- Wu, H., Suzuki, T., Carey, B., Trapnell, B. C., & McCormack, F. X. (2011). **Keratinocyte growth factor augments pulmonary innate immunity through epithelium-driven, GM-CSF-dependent paracrine activation of alveolar macrophages.** *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14932–40.
- Yanagida, N., Sato, S., Asaumi, T., & Ebisawa, M. (2016). **Comparisons of outcomes with food immunotherapy strategies: efficacy, dosing, adverse effects, and tolerance.** *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 16(4), 396–403.
- Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S.-Y., & Iwata, M. (2009). **GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity.** *International Immunology*, 21(4), 361–77.
- Zaher, H., Fernandez-Salguero, P. M., Letterio, J., Sheikh, M. S., Fornace, A. J., Roberts, A. B., & Gonzalez, F. J. (1998). **The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis.** *Molecular Pharmacology*, 54(2), 313–21.
- Zhang, L., Ma, J., Takeuchi, M., Usui, Y., Hattori, T., Okunuki, Y., ... Goto, H. (2010). **Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells via activation of aryl hydrocarbon receptor.** *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(4), 2109–17.

6. Anhang

Tabelle 6-1 zu Abbildung 3-1

OVA gefütterte Tiere zeigen eine stabile orale Toleranz

Der relative α -OVA-IgG1-Titer von Mäusen, die OVA bzw. nur das Lösungsmittel PBS dreimal intragastral verabreicht bekamen (3x20mg i.g.), ist hier zu verschiedenen Zeitpunkten angegeben. Nach der Immunisierung mit OVA in CFA (nach 1°) wurden Verstärkungsinjektionen mit OVA in IFA (2°-4°) durchgeführt. Der Mittelwert der Antikörperkonzentration von PBS- und OVA-Gruppe ist in Relation zum Standard (rs) angegeben. Die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet (** $\leq 0,001$).

Immunisierung	PBS (rs)	OVA (rs)	p-Wert
nach 1°	0,46 \pm 0,09	0,01 \pm 0,004	< 0,001
nach 2°	1,72 \pm 0,29	0,03 \pm 0,01	< 0,001
nach 3°	3,66 \pm 1,5	0,04 \pm 0,02	< 0,001
nach 4°	5,54 \pm 2,22	0,06 \pm 0,03	< 0,001

Tabelle 6-2 zu Abbildung 3-2

Fütterung einer mittleren oder geringen Antigendosis führt zu einer instabilen OT

Zwei unterschiedliche Protokolle zur Induktion oraler Toleranz durch eine mittlere (1x20mg i.g.) oder geringe Antigendosis (5x0,5mg i.g.) wurden hier verglichen. Der Antikörpertiter ist in Relation zum Standard (rs) angegeben. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test für die jeweiligen Behandlungstage durchgeführt (* $\leq 0,05$). Beim Vorliegen von nur zwei Messwerten wurde keine Signifikanzberechnung durchgeführt.

Dosis	Immunisierung	PBS (rs)	OVA (rs)	p-Wert
1 x 20mg i.g.	nach 1°	0,15 \pm 0,02	0,21 \pm 0,13	0,504
	nach 2°	1,76 \pm 0,06	1,05 \pm 0,41	0,036

Dosis	Immunisierung	PBS (rs)	OVA (rs)	p-Wert
5 x 0,5mg i.g.	nach 1°	0,11 \pm 0,05	0,03 \pm 0,01	-
	nach 2°	0,8 \pm 0,28	0,17 \pm 0,02	-
	nach 3°	1,09 \pm 0,07	0,27 \pm 0,01	-

Tabelle 6-3 zu Abbildung 3-3

TCDD-Behandlung destabilisiert OT und führt gleichzeitig zur Immunsuppression

OT-Induktion mit OVA (3x20mg i.g.) bzw. nur PBS unter TCDD Belastung bzw. als Kontrolle nur mit DMSO. Der relative α -OVA-IgG1-Titer der Kontrollgruppe PBS-DMSO wurde auf 100% gesetzt und die Titer der anderen Gruppen auf diesen bezogen (% von PBS-Kontrolle). Der Mittelwert der Titer an Tag 47 und somit die Auswirkung der letzten Verstärkungsinjektion werden angegeben. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test für DMSO zu TCDD innerhalb der jeweiligen Gruppe durchgeführt (** $\leq 0,01$).

Gruppe	DMSO	TCDD	p-Wert
PBS	100% \pm 24,1%	30,1% \pm 12,1%	0,002
OVA	1,53% \pm 2,16%	6,17% \pm 1,43%	0,006

Tabelle 6-4 zu Abbildung 3-4

ALFD beeinflusst die Genexpression von *cyp1a1* und *ahr*

Analyse der *ahr* und *cyp1a1* mRNA Expression in Darmabschnitten von Mäusen auf AhR-ligandenfreier Diät (ALFD) und normaler Diät (ND). Die Expressionswerte sind im Verhältnis zu dem Haushaltsgen *rps6* angegeben (Relation zum Haushaltsgen, rhg). Die Signifikanzen wurden mit dem Student'schen t-Test berechnet.

Gen	Darmabschnitt	Gruppe	ND (in rhg)	ALFD (in rhg)	p-Wert
<i>ahr</i>	Jejunum	PBS	4,44 ±0,23	5,03 ±1,18	0,361
		OVA	3,96 ±0,3	2,1 ±1,17	0,004
	Ileum	PBS	3,67 ±0,40	3,7 ±0,62	0,948
		OVA	3,42 ±0,46	2,71 ±1,72	0,353
<i>cyp1a1</i>	Jejunum	PBS	64,1 ±19,7	3,63 ±1,65	0,001
		OVA	52,9 ±42,0	3,04 ±1,57	0,016
	Ileum	PBS	5,12 ±2,63	1,63 ±1,51	0,061
		OVA	4,27 ±1,63	1,75 ±1,02	0,009

Tabelle 6-5 zu Abbildung 3-5

OT wird durch fehlende AhR-Liganden in der Nahrung nicht beeinflusst

C57BL/6-Mäuse erhielten eine AhR-ligandenfreie Diät (ALFD) oder weiterhin die normale Diät (ND). Mit der Fütterung der Diäten wurde bereits 21 Tage vor der Toleranzinduktion (3x20mg i.g.) gegen OVA- bzw. vor PBS-Gabe an die Kontrolltiere begonnen. An Tag 47 wurde der α -OVA-IgG1-Titer im Blutserum bestimmt. Der Antikörpertiter der PBS-Gruppe mit ND wurde auf 100% gesetzt und die anderen auf diesen bezogen (% von PBS-ND). Die Berechnung der Signifikanz wurden mit dem Student'schen t-Test für ND zu ALFD innerhalb der jeweiligen Gruppe durchgeführt. Die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind zusammengefasst.

Gruppe	ND	ALFD	p-Wert
PBS	100% ±48,3%	58,6% ±37,2%	0,098
OVA	4,1% ±2,08%	2,22% ±1,05%	0,119

Tabelle 6-6 zu Abbildung 3-6

AhR-Defizienz führt zur Reduktion von $\gamma\delta$ T-Zellen in der IEL-Fraktion

Die intestinale Epithelschicht wurde zusammen mit den darin liegenden IELs isoliert und am Durchflusszytometer untersucht. Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden durch CD3 und den $\gamma\delta$ TCR definiert und der prozentuale Anteil an allen CD3 Zellen ist angegeben. Der prozentuale Anteil der CD3 Zellen von allen lebenden Zellen in der Messung wird gezeigt. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (***) ($\leq 0,001$).

Zellpopulation	Anteil von	AhR-Wt	AhR-Ko	p-Wert
$\gamma\delta$ T-Zellen	CD3 Zellen	41,8% ±11,2%	16,0% ±5,6%	<0,001
CD3	lebenden Zellen	45,4% ±10,4%	9,5% ±6,6%	0,444

Tabelle 6-7 zu Abbildung 3-8

Erhöhung der CD103 DC-Anzahl in der LP von AhR-Ko Mäusen

Analysen der DCs von mesenterialen Lymphknoten (MLN) und der Lamina propria (LP) von AhR-Ko Mäusen und Wt-Wurfgeschwistern. Die LP und die MLN wurden auf DCs (CD11c MHCII) und CD103 DCs hin untersucht. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (** $\leq 0,01$).

Organ	Zellpopulation	Anteil von	AhR-Wt	AhR-Ko	p-Wert
LP	DCs	lebenden Zellen	0,96% $\pm 0,25\%$	2,32% $\pm 0,52\%$	0,006
	CD103 DCs	lebenden Zellen	0,65% $\pm 0,26\%$	1,87% $\pm 0,47\%$	0,007
	CD103 DCs	DCs	65,5% $\pm 15,7\%$	80,6% $\pm 2,73\%$	0,167
MLN	DCs	lebenden Zellen	0,81% $\pm 0,24\%$	0,84% $\pm 0,28\%$	0,887
	CD103 DCs	lebenden Zellen	0,73% $\pm 0,21\%$	0,76% $\pm 0,26\%$	0,897
	CD103 DCs	DCs	90,8% $\pm 2,34\%$	90,1% $\pm 7,01\%$	0,848

Tabelle 6-8 zu Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10

Expression von *gm-csf*, *kgf* und *fgfr2IIIb* ist durch AhR-Defizienz nicht verändert

Das Gewebe der einzelnen Dünndarmabschnitte von AhR-Wt und AhR-Ko wurde per qPCR untersucht. Die Expression von *kgf*, *fgfr2IIIb* und *gm-csf* ist im Verhältnis zu dem Haushaltsgen *gapdh* dargestellt (Relation zum Haushaltsgen, rhg). Die Darmabschnitte (Du: Duodenum, Je: Jejunum, IL: Ileum) wurden analysiert und der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt.

Gen	Darmabschnitt	AhR-Wt (in rhg)	AhR-Ko (in rhg)	p-Wert
<i>kgf</i>	Du	0,32 $\pm 0,2$	0,12 $\pm 0,08$	0,103
	Je	0,38 $\pm 0,05$	0,25 $\pm 0,14$	0,131
	IL	2,55 $\pm 1,28$	1,68 $\pm 0,2$	0,227
<i>fgfr2IIIb</i>	Du	8,08 $\pm 2,93$	7,61 $\pm 4,85$	0,887
	Je	9,86 $\pm 3,09$	8,73 $\pm 3,54$	0,646
	IL	33,5 $\pm 6,94$	27,8 $\pm 5,56$	0,247
<i>gm-csf</i>	Du	32,6 $\pm 10,7$	49,6 $\pm 8,56$	0,067
	Je	85,8 $\pm 26,9$	78,5 $\pm 17,5$	0,665
	IL	3,15 $\pm 2,01$	6,44 $\pm 2,63$	0,094

Tabelle 6-9 zu Abbildung 3-11

GM-CSF Sezernierung in ex vivo Kultur zeigt keinen Unterschied bei AhR-Defizienz

Darmabschnitten von AhR-Ko Mäusen und Wt-Wurfgeschwistern wurden für 4h *ex vivo* kultiviert. Im Mediumüberstand wurde die GM-CSF Konzentration per ELISA gemessen und ist in pg/mL mit der Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet.

Darmabschnitt	Wt (pg/mL)	Ko (pg/mL)	p-Wert
Du	4,31 $\pm 1,0$	3,95 $\pm 1,29$	0,511
Je	1,93 $\pm 1,06$	1,48 $\pm 0,57$	0,321
IL	1,33 $\pm 1,29$	0,98 $\pm 0,47$	0,505

Tabelle 6-10 zu Abbildung 3-12

Geninaktivität des AhR führt zur Änderung der Zytokin-Genexpression

In den drei verschiedenen Abschnitten des Dünndarms von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern wurde per qPCR die Genexpression von verschiedenen Zytokinen gemessen und im Verhältnis zum Haushaltsgen *gapdh* angegeben (Relation zum Haushaltsgen, rhg). Die Darmabschnitte (Du: Duodenum, Je: Jejunum, IL: Ileum) wurden analysiert. Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben und die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (* ≤ 0,05 / ** ≤ 0,01).

Gen	Darmabschnitt	AhR-Wt (in rhg)	AhR-Ko (in rhg)	p-Wert
il10	Du	5,45 ±3,3	1,5 ±0,32	0,108
	Je	9,46 ±4,88	3,23 ±1,23	0,048
	IL	10,5 ±4,18	4,17 ±2,7	0,044
tgfβ	Du	15,6 ±2,46	15,7 ±4,63	0,961
	Je	11,7 ±1,45	8,63 ±1,47	0,025
	IL	12,4 ±2,13	10,8 ±3,95	0,511
il6	Du	0,85 ±0,12	0,4 ±0,13	0,014
	Je	0,7 ±0,16	0,25 ±0,04	0,002
	IL	0,48 ±0,07	0,45 ±0,24	0,847

Tabelle 6-11 zu Abbildung 3-13

AhR-Defizienz verändert nicht die Treg oder Th17 Zellanzahl in LP und MLN

T-Zellen wurden aus den MLN und der LP von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern wie im Methodenteil erläutert (2.2.4 bzw. 2.2.6) isoliert und vor der Durchflusszytometer-Analyse für CD4, FoxP3 und IL17a gefärbt. Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben und die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test durchgeführt (** ≤ 0,01).

Organ	Zellpopulation	Anteil von	AhR-Wt	AhR-Ko	p-Wert
LP	CD4	lebenden Zellen	10,2% ±3,62%	8,03% ±2,44%	0,355
	CD4 FoxP3	CD4	9,48% ±4,03%	9,12% ±4,67%	0,910
	CD4 IL17a	CD4	1,46% ±1,0%	5,41% ±4,22%	0,119
MLN	CD4	lebenden Zellen	37,6% ±2,69%	33,9% ±4,48%	0,208
	CD4 FoxP3	CD4	6,97% ±1,39%	6,64% ±0,79%	0,693
	CD4 IL17a	CD4	0,026% ±0,01%	0,035% ±0,026%	0,613

Tabelle 6-12 zu Abbildung 3-14

AhR-Ko zeigt eine destabilisierte orale Toleranz

In der PBS-Gruppe erhielten AhR-Ko Mäuse und Wurfgeschwister nur PBS, während bei den Tieren der OVA-Gruppe die orale Toleranz durch 3x20mg OVA i.g. induziert wurde. Alle Tiere wurden immunisiert und erhielten Verstärkungsinjektionen. Der α-OVA-IgG1-Titer an Tag 47 wird angegeben, wobei der Antikörpertiter der PBS-Wt Tiere auf 100% gesetzt ist und die anderen auf diesem bezogen sind (% von PBS-Wt). Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test für Wt zu Ko innerhalb der jeweiligen Gruppe durchgeführt (* ≤ 0,05). Die Daten sind aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko	p-Wert
PBS	100% ±40,2%	76,6% ±26,9%	0,185
OVA	1,0% ±0,5%	5,3% ±5,3%	0,037

Tabelle 6-13 zu Abbildung 3-15

Verteilung der DCs und CD103 DCs am Ende eines OT-Experimentes bei AhR-Ko Tieren

Am Ende des OT-Versuchs wurde die LP und die MLN isoliert und am Durchflusszytometer auf die Verteilung von DCs (CD11c MHCII) und die Expression von CD103 analysiert. Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak durchgeführt. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Analyse der LP (Abb. 3-15-A)

Zellpopulation	Anteil von	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
DCs	lebenden Zellen	PBS	10,0% ±3,81%	9,74% ±3,53%
		OVA	7,26% ±2,92%	7,99% ±2,79%
CD103 DCs	DCs	PBS	66,9% ±11,2%	75,1% ±15,4%
		OVA	55,8% ±16,1%	68,9% ±16,2%

		p-Wert			
Zellpopulation	Anteil von	Wt zu Wt	Ko zu Ko	PBS (Wt zu Ko)	OVA (Wt zu Ko)
DCs	lebenden Zellen	0,397	0,814	0,999	0,989
CD103 DCs	DCs	0,531	0,92	0,812	0,375

Analyse der MLN (Abb. 3-15-B)

Zellpopulation	Anteil von	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
DCs	lebenden Zellen	PBS	1,47% ±0,49%	1,77% ±0,59%
		OVA	1,41% ±0,47%	1,63% ±0,78%
CD103 DCs	DCs	PBS	50,7% ±5,39%	45,3% ±8,75%
		OVA	55,3% ±5,97%	47,1% ±10,1%

		p-Wert			
Zellpopulation	Anteil von	Wt zu Wt	Ko zu Ko	PBS (Wt zu Ko)	OVA (Wt zu Ko)
DCs	lebenden Zellen	0,999	0,99	0,903	0,91
CD103 DCs	DCs	0,756	0,99	0,732	0,139

Tabelle 6-14 zu Abbildung 3-16

Analyse von T-Zellen am Ende des OT-Versuchs bei AhR-Ko

Die LP und MLN wurden am Ende des OT-Versuches mit AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern isoliert und per Durchflusszytometrie auf die Verteilung von CD4 Zellen und deren Expression von FoxP3 bzw. IL17a untersucht. Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet (* ≤ 0,05). Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Analyse der LP (Abb. 3-16-A)

Zellpopulation	Anteil von	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
CD4	lebenden Zellen	PBS	17,8% ±2,8%	15,1% ±2,59%
		OVA	16,2% ±5,42%	13,3% ±3,09%
CD4 FoxP3	CD4	PBS	19,5% ±6,56%	8,93% ±3,4%
		OVA	14,4% ±5,99%	11,4% ±7,62%
CD4 IL17a	CD4	PBS	6,59% ±2,47%	3,89% ±1,85%
		OVA	4,53% ±1,94%	3,6% ±1,97%

Zellpopulation	Anteil von	p-Wert			
		Wt zu Wt	Ko zu Ko	PBS (Wt zu Ko)	OVA (Wt zu Ko)
CD4	lebenden Zellen	0,891	0,884	0,624	0,483
CD4 FoxP3	CD4	0,673	0,978	0,205	0,903
CD4 IL17a	CD4	0,223	0,998	0,095	0,836

Analyse der MLN (Abb. 3-16-B)

Zellpopulation	Anteil von	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
CD4	lebenden Zellen	PBS	30,3% ±5,44%	28,8% ±3,77%
		OVA	38,9% ±5,09%	33,4% ±8,21%
CD4 FoxP3	CD4	PBS	2,38% ±1,03%	2,19% ±0,65%
		OVA	1,82% ±0,75%	2,39% ±1,43%
CD4 IL17a	CD4	PBS	0,38% ±0,24%	0,37% ±0,13%
		OVA	0,43% ±0,23%	0,46% ±0,21%

Zellpopulation	Anteil von	p-Wert			
		Wt zu Wt	Ko zu Ko	PBS (Wt zu Ko)	OVA (Wt zu Ko)
CD4	lebenden Zellen	0,023	0,459	0,984	0,219
CD4 FoxP3	CD4	0,684	0,995	0,996	0,705
CD4 IL17a	CD4	0,986	0,928	0,999	0,998

Tabelle 6-15 zu Abbildung 3-18

Keine Destabilisierung der OT in AhR^{ΔVillin} Mäusen

Der AhR wurde konditional nur in den intestinalen Epithelzellen (AhR^{ΔVillin}) ausgeschaltet, indem AhR^{fllox} x Villin^{Cre} Tiere verpaart wurden. Cre^{neg}-Wurfgeschwister wurden als Kontrolle zu den AhR^{ΔVillin} Tieren verwendet. Beide Genotypen erhielten OVA zur Induktion der OT (3x20mg i.g.) oder nur das Lösungsmittel PBS. Gezeigt ist der prozentuale α-OVA-IgG1-Titer vom Behandlungstag 47 bezogen auf die PBS-Kontrollgruppe, welche gleich 100% gesetzt wurde. Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben (% von PBS-Kontrolle). Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test für Kontrolle zu AhR^{ΔVillin} innerhalb der jeweiligen Gruppe durchgeführt. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Gruppe	Kontrolle	AhR ^{ΔVillin}	p-Wert
PBS	100% ±63,1%	89,1% ±50,7%	0,746
OVA	2,76% ±2,26%	3,39% ±2,75%	0,636

Tabelle 6-16 zu Abbildung 3-20

AhR^{fllox} x CD11c^{Cre} Tiere zeigen keinen Unterschied in der OT

Orale Toleranz gegen OVA wurde bei AhR^{ΔCD11c} Mäusen, die eine *ahr*-Deletion in DCs haben und bei Cre^{neg}-Wurfgeschwistern (Kontrolltiere) induziert (3x20mg i.g.). Mäuse beider Genotypen wurden ebenfalls nur mit dem Lösungsmittel PBS gefüttert. Nach Immunisierung und Verstärkungsinjektionen wurde die Stabilität der OT durch den α-OVA-IgG1-Titer im Blutserum bestimmt. Die Antikörpertiter von Tag 47 sind auf die PBS-Kontrollgruppe bezogen (% von PBS-Kontrolle). Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben. Die Berechnung der Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test innerhalb der jeweiligen Gruppe durchgeführt. Die Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Gruppe	Kontrolle	AhR ^{ΔCD11c}	p-Wert
PBS	100% ±44,1%	66,8% ±13,7%	0,103
OVA	3,39% ±2,84%	1,63% ±1,3%	0,162

Tabelle 6-17 zu Abbildung 3-22-A

γδ T-Zellen in AhR^{fllox} x Lck^{Cre} Tieren

Die IELs von vier AhR^{ΔLck} Mäusen und vier Cre^{neg}-Wurfgeschwistern (Kontrolltiere) wurden nach einer Gradientenzentrifugation am Durchflusszytometer untersucht. Die γδ T-Zellen wurden anhand der Expression des γδ TCR und CD8 definiert und deren Anteil von allen lebenden Zellen in der jeweiligen Probe bestimmt. Die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet.

γδ T-Zellen	Kontrolle	AhR ^{ΔLck}	p-Wert
Anteil von lebenden Zellen	32,1% ±8,34%	34,1% ±9,57%	0,772

Tabelle 6-18 zu Abbildung 3-23

Zellspezifische AhR-Inaktivität bei T-Zellen führt zur Destabilisierung der OT

AhR^{flox} x Lck^{Cre} Mäuse wurden auf die Stabilität der OT untersucht, indem AhR^{ΔLck} Tiere und deren Cre^{neg}-Wurfgeschwister (Kontrolle) mit OVA gefüttert (3x20mg i.g.) und anschließend immunisiert wurden. Durch den α-OVA-IgG1-Titer im Blutserum am Behandlungstag 47 wird die OT-Stabilität bestimmt. Die Antikörpertiter werden prozentual auf den Titer der PBS-Kontrolltiere bezogen, welcher gleich 100% gesetzt ist. Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben und die Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test berechnet (* ≤ 0,05).

Gruppe	Kontrolle	AhR ^{ΔLck}	p-Wert
PBS	100% ±2,5%	83,6% ±2,8%	-
OVA	3,1% ±1,6%	5,4% ±1,1%	0,032

Tabelle 6-19 zu Abbildung 3-24

CD4 und CD8 Zellanzahl bei *in vitro* Stimulation

Durchflusszytometer-Analyse von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwister Milzzellen, die auf T-Zellen angereichert und mit CD3/CD28 für 16h stimuliert wurden. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur in Medium inkubiert. Die gemessene Zellanzahl von CD4 und CD8 Zellen wurde auf 1000 mitgemessene *counting beads* normalisiert (Zellanzahl (x10⁴) pro 1000 *counting beads*). Der Mittelwert ist angegeben und die Signifikanzen wurden durch ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet (* ≤ 0,05).

Zellpopulation	Gruppe	AhR-Wt (x10 ⁴)	AhR-Ko (x10 ⁴)
CD4	unstimuliert	2,02 ±0,78	1,86 ±0,22
	stimuliert	2,1 ±0,71	1,97 ±0,38
CD8	unstimuliert	1,07 ±0,3	0,89 ±0,23
	stimuliert	1,08 ±0,32	0,8 ±0,18

Zellpopulation	p-Wert			
	Wt zu Wt	Ko zu Ko	unstimuliert (Wt zu Ko)	stimuliert (Wt zu Ko)
CD4	0,999	0,998	0,992	0,997
CD8	0,999	0,982	0,836	0,508

Tabelle 6-20 zu Abbildung 3-26

Expression von Aktivierungsmarkern, FoxP3 und IL17a bei T-Zell Stimulation

Milzzellen von AhR-Ko und Wt-Wurfgeschwistern wurden auf T-Zellen aufgereinigt und mit CD3/CD28 für 16h stimuliert, wobei die unstimulierte Kontrolle nur in Medium inkubiert wurde. Nach der Stimulation wurden die Zellen per Durchflusszytometer auf CD25, CD69, IL17a, FoxP3 analysiert und deren Anteil an CD4 bzw. CD8Zellen bestimmt (% von CD4 bzw. CD8 Zellen). Der Mittelwert einer Gruppe ist angegeben und die Signifikanzen wurden durch ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet (* ≤ 0,05 / ** ≤ 0,01 / *** ≤ 0,001).

Anteil von CD4 Zellen (%) (Abb. 3-26-A)

Zellpopulation	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
CD4 CD25	unstimuliert	3,76% ±2,06%	4,2% ±2,83%
	stimuliert	30,7% ±5,8%	34,4% ±8,79%
CD4 CD69	unstimuliert	3,17% ±0,65%	2,5% ±0,19%
	stimuliert	86,9% ±1,17%	85,9% ±1,63%
CD4 FoxP3	unstimuliert	1,92% ±0,12%	1,79% ±0,86%
	stimuliert	1,36% ±0,14	1,16% ±0,75%
CD4 IL17a	unstimuliert	0,01% ±0,01%	0,01% ±0,01%
	stimuliert	0,05% ±0,01%	0,16% ±0,09%

Zellpopulation	p-Wert			
	Wt zu Wt	Ko zu Ko	unstimuliert (Wt zu Ko)	stimuliert (Wt zu Ko)
CD4 CD25	< 0,001	< 0,001	0,999	0,835
CD4 CD69	< 0,001	< 0,001	0,859	0,588
CD4 FoxP3	0,584	0,474	0,997	0,982
CD4 IL17a	0,778	0,002	0,999	0,014

Anteil von CD8 Zellen (%) (Abb. 3-26-B)

Zellpopulation	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
CD8 CD25	unstimuliert	0,23% ±0,12%	0,25% ±0,11%
	stimuliert	55,7% ±6,16%	61,1% ±4,83%
CD8 CD69	unstimuliert	5,46% ±1,67%	4,65% ±1,31%
	stimuliert	76,2% ±4,26%	73,4% ±2,03%

Zellpopulation	p-Wert			
	Wt zu Wt	Ko zu Ko	unstimuliert (Wt zu Ko)	stimuliert (Wt zu Ko)
CD8 CD25	< 0,001	< 0,001	0,999	0,432
CD8 CD69	< 0,001	< 0,001	0,988	0,499

Tabelle 6-21 zu Abbildung 4.1

Vergleich der prozentualen α -OVA-IgG1-Titer der PBS-Gruppen

Von allen PBS-Gruppen sind die α -OVA-IgG1-Titer in Bezug auf die jeweilige Kontrolle (Genotyp bzw. Behandlung) mit der SD angegeben. Die Angaben sind in Prozent (%).

TCDD	ALFD	AhR-Ko	AhR ^{ΔCD11c}	AhR ^{ΔLck}	AhR ^{ΔVillin}
30,1 ±12,1	58,6 ±37,2	76,6 ±26,9	66,8 ±13,7	61,9 ±51,7	89,1 ±50,7

Tabelle 6-22 zu Abbildung 6-1

CD8a Zellen am Ende eines OT-Versuches in LP und MLN

Organ	Anteil von	Gruppe	AhR-Wt	AhR-Ko
LP	lebenden Zellen	PBS	4,63% ±0,59%	3,07% ±1,16%
		OVA	3,88% ±0,42%	2,6% ±1,4%
MLN	lebenden Zellen	PBS	31,0% ±3,06%	32,6% ±0,89%
		OVA	33,8% ±2,1%	30,4% ±5,31%

Organ	Anteil von	p-Wert			
		Wt zu Wt	Ko zu Ko	PBS (Wt zu Ko)	OVA (Wt zu Ko)
LP	lebenden Zellen	0,623	0,933	0,164	0,117
MLN	lebenden Zellen	0,643	0,842	0,958	0,367

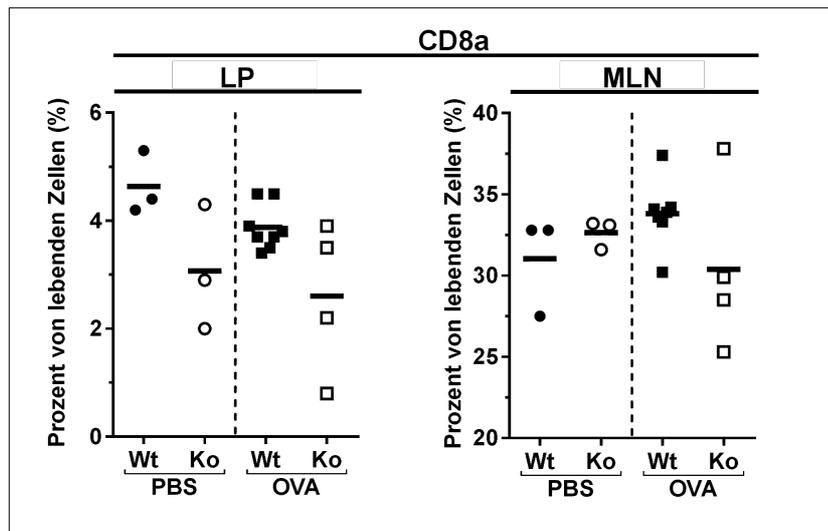


Abbildung 6-1 CD8a Zellen am Ende eines OT-Versuches in LP und MLN

Am Ende des OT-Versuchs wurde die LP und die MLN isoliert und am Durchflusszytometer auf CD8a Zellen hin untersucht. Jeder Wert (●,○,■,□) entspricht einem Versuchstier (AhR-Wt oder AhR-Ko) und der Mittelwert ist mit dargestellt. Die Signifikanz wurde mit ANOVA und anschließendem-paarweisen-multiplen-Vergleichstest nach Holmes-Sidak berechnet.

7. Danksagung

Mit dieser Danksagung möchte ich allen Menschen danken, die mich während der Promotionszeit begleitet und die Anfertigung dieser Dissertation erst ermöglicht haben.

Mein herzlichster Dank geht an Frau Professor Charlotte Esser für die Übergabe des interessanten Projektes und die Übernahme der Betreuung. Weiterhin für Ihr Interesse an meiner Arbeit und die kompetente Beratung der Ergebnisse mit sehr anregenden, fachlichen Diskussionen.

Ebenfalls herzlichen Dank an Herrn Professor Peter Proksch für die Übernahme des Korreferates und das Interesse an meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön an die Arbeitsgruppe Esser für das schöne Arbeitsklima, den hilfreichen Austausch und natürlich auch für die gemeinsame Zeit. Insbesondere vielen Dank für die großartige Hilfe an den langen „Präp-Tagen“ der OT-Versuche, welche ohne diese Hilfe nicht möglich gewesen wären. Vielen Dank an Dr. Christiane Hammerschmidt-Kamper, Dr. Katja Merches, Dr. Katharina Haas und Dr. Imke Bargen für fachliche Beratung zu Ergebnissen und die vielen schönen Diskussionen. Vielen Dank an Babette Martiensen, Swantje Steinwachs und Andrea Droste für die exzellente Hilfe und Unterstützung im Labor.

Für die kompetente Pflege der Versuchstiere danke ich dem Personal des Tierhauses, insbesondere Petra Groß, die stets engagiert und immer hilfsbereit war.

An meine Eltern, meine Geschwister und meine Freunde ein großes Dankeschön für die stets verständnisvolle Unterstützung in allen Lebenslagen. Vielen Dank für die vielen schönen Gespräche, das Interesse an meiner Arbeit und die dadurch immer wieder entstandene Freude und Motivation.

8. Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation „Der Arylhydrocarbonrezeptor ist in T-Zellen notwendig für die Aufrechterhaltung der oralen Toleranz“ von mir selbständig und ohne unzulässige, fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden im Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH (IUF) durchgeführt. Diese Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Hamburg, 29. Dezember 2018

Daniel Biljes