



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

UNIVERSITÄTSmedizin.
MAINZ

-Die Niedrigzonentoleranz-
Mechanismen und Einflüsse
auf die murinen Modelle
der allergischen Kontaktdermatitis,
der Colitis
und des Diabetes mellitus Typ I

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

dem Fachbereich der Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von:

Talkea Schmidt

geboren am 21.07.1984 in Rotenburg (Wümme)

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichtstatterin:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2016

*FÜR MEINE ELTERN
UND MEINEN BRUDER*

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Unterschrift

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGEN	X
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Allergische Reaktionen	1
1.1.1 Systematik der allergischen Reaktionen.....	1
1.1.2 Die allergische Kontaktdermatitis und das murine Modell der Contact Hypersensitivity (CHS)	2
1.2 Toleranzmechanismen.....	6
1.2.1 Zentrale und periphere Toleranz.....	6
1.2.2 Niedrigzonentoleranz (NZT)	9
1.2.3 Orale Toleranz	11
1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	12
1.3.1 Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa.....	12
1.3.2 Mausmodell der TNBS-induzierte Colitis.....	13
1.4 Diabetes	14
1.4.1 Diabetes mellitus Typ I.....	14
1.4.2 Die NOD-Maus als murines Modell des Diabetes Typ I.....	15
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	16
2. MATERIAL & METHODEN.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte & Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2 Chemikalien & Enzyme.....	18
2.1.3 Kit-Systeme	20
2.1.4 Antikörper.....	20
2.1.5 Medien & Puffer	21
2.1.5.1 Zellkulturmedium	21
2.1.6 Versuchstiere	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 CHS/NZT Versuchsdurchführung	23
2.2.1.1 CHS/NZT-Protokoll.....	23
2.2.1.2 <i>In vivo</i> -Parameter – Ohrschwellung.....	23
2.2.2 Colitis Versuchsdurchführung	23
2.2.2.1 Colitis-Protokoll.....	23
2.2.2.2 <i>In vivo</i> -Parameter - Endoskopie.....	24
2.2.3 Organentnahmen.....	25
2.2.3.1 Gewinnung und Aufreinigung der axillären, inguinalen und zervikalen Lymphknoten	25
2.2.3.2 Gewinnung der mesenterialen Lymphknoten	25

2.2.3.3	Entnahme des Enddarms.....	25
2.2.4	Aufreinigung der Lymphknoten.....	26
2.2.5	Hapten-spezifische Restimulierung.....	26
2.2.6	T-Zell-Proliferationstest.....	27
2.2.7	T-Zell-Anreicherung.....	28
2.2.7.1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs-Anreicherung.....	28
2.2.8	Färbung der Tregs mittels Calcein.....	29
2.2.9	Protokoll zur Depletion CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs mittels PC61.....	29
2.2.10	Protokoll zur Depletion von Foxp3 ⁺ Zellen mittels Diphterie Toxin in DERE Mäusen.....	29
2.2.11	Adoptiver Transfer.....	29
2.2.12	Durchflusszytometrische Untersuchungen: Prinzip.....	30
2.2.12.1	Durchführung Standard-Durchflusszytometrische-Messung.....	30
2.2.12.2	Durchführung Intrazelluläre Durchflusszytometrische Messung von Foxp ⁺ T-Zellen.....	31
2.2.13	ELISA: Prinzip.....	31
2.2.13.1	ELISA: Durchführung.....	32
2.2.14	Histologie.....	33
2.2.15	Diabetes-Modell der NOD-Maus.....	34
2.2.15.1	Blutzuckerbestimmung.....	34
2.2.15.2	Behandlung mit Insulin.....	34
2.2.16	Statistik.....	34
3.	ERGEBNISSE.....	35
3.1	Die Funktion von Tregs und CD11c ⁺ DCs in der Induktionsphase der NZT.....	35
3.1.1	Einfluss der NZT auf eine Kontakthypersensibilitätsreaktion (CHS).....	35
3.1.2	Interaktion der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatorischer T-Zellen mit CD11c ⁺ DCs in den Haut-drainierenden Lymphknoten.....	37
3.1.3	Die Funktion von gap junctions in der Interaktion zwischen Tregs und CD11c ⁺ DCs.....	40
3.2	Induktion einer oralen und epikutanen NZT im Colitis Modell.....	43
3.2.1	Protokoll.....	43
3.2.2	<i>In vivo</i> Entzündungsreaktion.....	44
3.2.3	Mini-Endoskopie & Histologie.....	45
3.2.4	T-Zell-Antwort.....	47
3.3	Während der Induktions-Phase der NZT sind regulatorische T-Zellen für die Inhibition der Colitis notwendig.....	48
3.3.1	Depletion CD25 ⁺ Tregs durch Gabe eines anti-CD25-Antikörpers (PC61).....	49
3.3.1.1	Protokoll.....	49
3.3.1.2	Treg-Depletion.....	50
3.3.1.3	<i>In vivo</i> Entzündungsreaktion.....	51
3.3.1.4	Mini-Endoskopie & Histologie.....	53
3.3.1.5	T-Zell-Antwort.....	55
3.3.2	Depletion Foxp3 ⁺ Tregs durch die Gabe von Diphterie Toxin in DERE Mäusen.....	57
3.3.2.1	Protokoll.....	58
3.3.2.2	Depletion der Tregs.....	58
3.3.2.3	<i>In-vivo</i> Entzündungsreaktion und T-Zell-Proliferation.....	59
3.3.3	IL-10 ist notwendig für die NZT zur Verhinderung der Colitis.....	60
3.3.4	Die Hapten-spezifische Wirkung der NZT in der TNBS-induzierten Colitis ..	62
3.4	Einfluss der NZT auf Autoimmunerkrankungen am Beispiel des Diabetes Typ I.....	64

4. DISKUSSION	66
4.1 Interaktion der Tregs mit CD11c ⁺ DCs über gap junctions in der NZT im Modell der CHS	66
4.2 Orale und epikutane Toleranzinduktion in der TNBS-induzierten Colitis.....	69
4.2.1 CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs sind essentiell für die orale und epikutane NZT-Induktion.....	72
4.2.2 Die Induktion der NZT ist IL-10 abhängig	73
4.2.3 Die epikutane NZT-Induktion in der TNBS-induzierten Colitis.....	74
4.2.4 Die Induktion der NZT zur Verhinderung einer TNBS-induzierten Colitis ist Hapten-spezifisch	76
4.3 Die präventive Rolle der NZT in einem spontan auftretenden Autoimmunkrankheitsmodell.....	77
4.4 Zusammenfassende Übersicht	78
5. ZUSAMMENFASSUNG	79
6. SUMMARY	80
DANKSAGUNG.....	81
LITERATURVERZEICHNIS	82
LEBENS LAUF	97

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der murinen Kontakthypersensibilisierung (CHS)...	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Niedrigzonentoleranz (NZT).....	10
Abbildung 3: Lokalisation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Aufbau der Darmwand.	13
Abbildung 4: Zielsetzung zur Untersuchung der NZT in der TNBS-induzierten Colitis.	16
Abbildung 5: Endoskopische Einstufung der Colitis (Endoscore).....	25
Abbildung 6: Schematisches Protokoll zur Induktion einer NZT und CHS.	36
Abbildung 7: Kutane Entzündungsreaktion und T-Zell-Proliferation in der CHS und NZT...	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Fragestellung: Interaktion der Tregs mit CD8 ⁺ CD11c ⁺ DCs in der NZT.	37
Abbildung 9: Schematisches Protokoll zur Interaktion von Tregs mit CD11c ⁺ DCs mittels Immunhistotologie.	38
Abbildung 10: Interaktion der Tregs mit CD11c ⁺ DCs in den Haut-drainierenden Lymphknoten.	39
Abbildung 11: Protokoll zur Untersuchung von Calcein-gelabelten Tregs mit Immunzellen.	40
Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse Calcein gelabelter Zellen.	41
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Calcein-Übertragung auf CD11c ⁺ DCs, CD4 ⁺ T-Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen und B220 Zellen.	42
Abbildung 14: Schematischer Versuchsablauf Colitis.....	44
Abbildung 15: <i>In vivo</i> -Parameter: Entzündungsreaktion im Darm (Endoscore).	45
Abbildung 16: Endoskopie- und Histologiebild entsprechend dem Durchschnitts-Endoscore der jeweiligen Gruppe.....	46
Abbildung 17: <i>In vitro</i> -Parameter: T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion nach Colitis-Standardprotokoll.	47
Abbildung 18: Anzahl der Tregs nach oraler und epikutaner NZT-Induktion im Vergleich zur Colitis.	48
Abbildung 19: Zeittafel des modifizierten Colitisversuch zur Depletion der CD25 ⁺ T-Zellen.	50
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen nach anti-CD25 mAb Gabe.....	51
Abbildung 21: Vergleich des Gesamt-Endoscores und den jeweiligen Einzelparametern nach anti-CD25-Depletion in der oralen und epikutanen NZT.....	52
Abbildung 22: Endoskopie und Histologie nach Depletion der Tregs während der Toleranzinduktion.	54
Abbildung 23: T-Zell-Antwort nach Depletion von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs während der Toleranzinduktion.	56
Abbildung 24: Protokoll zur Depletion der Foxp3 ⁺ Tregs mit DT in DEREK-Mäusen während der Induktionsphase der NZT.	58
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der Depletion der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen nach DT-Behandlung in DEREK-Mäusen.	59
Abbildung 26: Endoskopie und T-Zell-Proliferation nach Depletion der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen mittels DT in DEREK-Mäusen in der Induktionsphase der NZT zur Prävention einer Colitis.....	60

Abbildung 27: IL-10 ist notwendig für die epikutane und orale Toleranz zur Verhinderung einer Colitis.	61
Abbildung 28: Protokoll zur Prüfung der Antigen-Spezifität in einer NZT zur Inhibition einer Colitis durch das Hapten DNCB/DNFB.	62
Abbildung 29: Antigen-Spezifität in der epikutanen und oralen NZT zur Verhinderung einer Colitis.	63
Abbildung 30: Protokoll der NZT-Induktion in NOD-Mäusen.	64
Abbildung 31: Einfluss der NZT auf den Erkrankungsstatus in NOD-Mäusen.	65
Abbildung 32: CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Tregs interagieren über gap junctions mit tolerogenen CD8 ⁺ CD11c ⁺ DCs in der NZT.	67
Abbildung 33: Übersicht der Mechanismen über die orale und epikutane NZT zur Verhinderung einer TNBS-induzierten Colitis.	76

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
α	<i>alpha</i>
β	<i>beta</i>
γ	<i>gamma</i>
(d)H ₂ O	(destilliertes)Wasser
(D)	Deutschland
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod
AOO	Aceton Olivenöl
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AT	Adoptiver Transfer
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CHS	Kontakthypersensibilisierung
CTLA-4	zytotoxische T Lymphozyten Antigen 4
CpA	Capture Antikörper
cpm	<i>counts per minute</i>
d.h.	das heißt
DA	Detection Antikörper
DAMPS	<i>damage associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zelle
dDC	dermale dendritische Zelle
DNCB	1-Chloro-2,4-Dinitrochlorbenzol

DNFB	1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol
DT	Diphtherie Toxin
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Enzym Reagent
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Foetal Bovine Serum
Foxp3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>intracellular adhesionmolecule</i>
ICOS	<i>Inducible Costimulator</i>
IFN- γ	Interferon gamma
kDA	kilo Dalton
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
iTregs	induzierbare regulatorische T-Zellen
L	Liter
LC	Langerhans Zellen
LK	Lymphknoten
MACS	Magnetische Zell Separation
mg	Milligramm
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
MHC	<i>Major Histokompatibility Complex</i>
MLR	Mixed Lymphocyte Reaktion
min	Minute
mM	Millimol pro Liter
NaCl	Natrium Chlorid
NK-Zelle	<i>Natural Killer- Zelle</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor protein 3</i>

NMS	normales Maus Serum
NLRP3	<i>NOD-like receptor protein 3</i>
NOD-Maus	<i>Non obese diabetic</i> -Maus
NZT	Niedrigzonentoleranz
nTregs	natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SSC	Side Scatter
Tc	zytotoxische T-Zelle
TGF- β -	Tumor Growth Factor beta
Th	T-Helfer Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNBC	2,4,6-Trinitro-1-Chlorbenzol
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tr	T regulatory Typ
Treg	regulatorische T-Zelle
z.B.	zum Beispiel

EINLEITUNG

1.1 Allergische Reaktionen

Eine allergische Reaktion (Allergie) ist gekennzeichnet durch eine unangemessene Überempfindlichkeit des Immunsystems auf körperfremde, dennoch unschädliche Substanzen (Allergene), die keine Bedrohung für den menschlichen Körper darstellen.

Ursprung des Begriffes Allergie sind hierbei die altgriechischen Wörter *állos* (= fremd) und *érgon* (= die Reaktion). Bereits Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurde das Phänomen dieser unangemessenen Reaktion des Immunsystems von C. Pirquet beschrieben und 1963 von P. Gell und R. Coombs in vier unterschiedliche Typen aufgrund ihrer pathophysiologischen Mechanismen klassifiziert^{1,2}.

1.1.1 Systematik der allergischen Reaktionen

Die Einteilung der vier Typen (I-IV) der Hypersensitivität wurde nach den Pathomechanismen vorgenommen. Drei sind hierbei dem humoralen Zweig des Immunsystems zugehörig und werden durch Antikörper oder Antigen-Antikörper Komplexe vermittelt. Die Abwehrreaktion auf Allergene kann kurz nach dem Kontakt mit dem Allergen einsetzen oder erst nach einiger Zeit auftreten. Man spricht deshalb von einer Sofort – bzw. einer Spättypreaktion³.

Der Sofort-Typ I ist der am weitesten verbreitete und auch bekannteste Typ. Der Erstkontakt führt zu einer asymptomatischen Sensibilisierungsphase, bei dem Immunglobulin E (IgE) produzierende B-Zellen gebildet werden. Die IgE-Antikörper binden dann unter anderem an die α -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors (FceR1) auf Mastzellen. Bei erneutem Kontakt des Organismus mit demselben Allergen werden die Antigene innerhalb von Minuten von den IgE

besetzten Mastzellen erkannt. Es entsteht eine Kreuzvernetzung der FcεR1-Rezeptoren und die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel (z.B.) Histamin, die zu einer Erweiterung der Blutgefäße (Rötung der Haut), Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen für Wasser und Plasmaproteine (Schwellung und Bläschenbildung) oder Kontraktion der glatten Muskulatur (Bronchospasmus, Koliken) führen und so die bekannten Allergiesymptome, wie beispielsweise Heuschnupfen, Urtikaria und allergisches Asthma, verursachen³⁻⁵.

Die zytotoxische Reaktion (Typ II) ist IgM- oder IgG-vermittelt und opsoniert körperzellgebundene Antigene. Durch die gebildeten Immunkomplexe wird die Aktivierung des Komplementsystems ausgelöst und setzt zytotoxische Substanzen frei, die die Zelle schließlich lysieren. Zu den zytotoxischen Reaktionen gehört die Transfusionsreaktion (Blutgruppenunverträglichkeit) oder die Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Medikamenten (z.B. Hämolytische Anämie durch Phenacetin)³.

Die Typ III Reaktion entsteht durch die Bildung von IgG-Antikörper an lösliche Antigene. Die Bildung der Antigen-Antikörper Immunkomplexe führt zu einer Anlagerung an körpereigene Körperzellen, wie z.B. den Gefäßwänden. Dadurch wird die Komplementkaskade aktiviert, wodurch u.a. Neutrophile angelockt und gewebeschädigende Enzyme freigesetzt werden, die auch körpereigene Gewebe angreifen und zerstören. Allergien von diesem Typus sind verzögert und treten erst nach Stunden oder in manchen Fällen erst nach ein paar Tagen auf⁶. Ein typisches Beispiel für diesen Allergietyp ist die Vaskulitis oder Serumkrankheit.

Die Typ IV Reaktionen sind zellulär bedingt und werden somit nicht durch Immunglobuline, sondern durch T-Zellen vermittelt (Spät-Typ). Sie wird als eine Spät-Typreaktion bezeichnet, da klinische Symptome erst nach 24-72 h auftreten. Sie beinhalten die Tuberkulinreaktion, die Transplantatabstoßung und die allergische Kontaktdermatitis⁷.

1.1.2 **Die allergische Kontaktdermatitis und das murine Modell der Contact Hypersensitivity (CHS)**

Die Prävalenz mit der ein allergisches Kontaktekzem in der Allgemeinbevölkerung auftritt, liegt bei 15-20 % (1,7-7 Fälle pro 1000 Einwohner in Deutschland)⁷⁻¹⁰. Patienten beschreiben die Symptome an den Stellen der Haut, an denen der auslösende Stoff mit der Haut in Kontakt getreten ist, mit einer entzündlichen Reaktion, die sich mit Rötungen, Schwellung und Blasenbildung äußert. Um eine Kontaktallergie nachzuweisen und den auslösenden Stoff auffindig zu machen, wird in Menschen der Epikutantest verwendet¹¹. Hierbei werden die zu

testenden Stoffe stark verdünnt in Testkammern auf die gesunde Rückenhaut aufgebracht. Die Ablesung und Beurteilung erfolgt dann nach 48-72 h. Bis sich eine allergische Reaktion jedoch klinisch sichtbar äußert, haben die betroffenen Personen zunächst eine asymptotische Sensibilisierungsphase (Induktionsphase) durchlaufen. Diese Phase kann im Menschen mehrere Tage bis Monate andauern bis bei erneutem Kontakt ein allergisches Kontaktekzem ausgelöst wird. Diese Phase wird dann als Auslösephase (Effektorphase) bezeichnet. Da eine wiederholte Exposition mit Kontaktallergenen oft berufsbedingt entsteht, und die einzig effektive Therapiemaßnahme die strikte Vermeidung des Stoffes beinhaltet, ist die allergische Kontaktdermatitis eine der häufigsten Berufserkrankungen und hat einen erheblichen sozioökonomischen Einfluss auf die westlichen Industrieländer⁷⁻⁹.

Die allergische Kontaktdermatitis wird hauptsächlich durch Haptene induziert. Haptene sind kleine niedermolekulare Substanzen (< 500 Dalton), die aufgrund ihrer kleinen Größe und lipophilen Eigenschaften die Haut durchdringen können. Alleine sind Haptene nicht immunogen, doch da die meisten Haptene elektrophile Moleküle sind, binden sie kovalent mit den Nukleophilen eines Proteins^{12, 13}. Erst durch Bindung mit einem körpereigenen Protein (Hapten-Carrier-Komplexe) werden sie zu einem vollständigen Antigen, das vom Immunsystem erkannt werden kann^{12, 14}. Diese Eigenschaft einer chemischen Substanz charakterisiert ein Hapten und so ein potentielles Kontaktallergen. Es existieren rund 3000 Kontaktallergene¹⁵. Als Beispiele sind Nickel, Duftstoffe (Perubalsam), Kobalt und verschiedene Biozide zu nennen. Aber auch halogenierte Nitrobenzole wie z.B. TNCB (2,4,6-Trinitro-1-Chlorbenzol) und DNFB (1-Fluro-2,4-dinitrobenze)^{16, 17}. Diese finden Verwendung in dem murinen Modell der „Contact Hypersensitivity“ (CHS), das das murine Modell zur allergischen Kontaktdermatitis und eine T-Zell-vermittelte Reaktion darstellt (Abb. 1). Sie dient zur Aufklärung der Pathophysiologie. Für die Sensibilisierung werden die Mäuse 1-2 x mit einer hohen Dosis eines Kontaktallergens und anschließend mit einer geringeren Testdosis behandelt.

Die in der Haut angesiedelten Langerhanszellen (LC) gehören zu den dendritischen Zellen und bilden ein Netzwerk in der Haut¹⁸. Da sie in der Haut angesiedelt sind, stellen sie, wenn Pathogene und auch Kontaktallergene die Hornschicht der Haut durchquert haben, die erste Barriere für diese exogenen „Gefahrenstoffe“ dar^{18, 19}. LC, aber auch dermale dendritische Zellen (dDCs) nehmen die Hapten-Carrier-Komplexe auf und prozessieren diese^{20, 21}. Zusätzlich gehen sie, durch den Einfluss verschiedener proinflammatorischer Interleukine (IL)-1 α , IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF-) α , von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand als antigenpräsentierende Zelle (APC) über und präsentieren die prozessierten haptensierten

Peptidbestandteile über den Histokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC-I) und MHC II auf der Zelloberfläche^{12, 22}. Während dieser Zeit migrieren die LC und dDC von der Haut zu den Haut-Drainierenden LK und präsentieren dort die Peptide der haptensierten Proteine den T-Zell Rezeptor der naiven T-Zellen (Signal 1)²³. Dieser erste Kontakt ist außerdem abhängig und Adhäsionsmolekülen (z.B. Inducible Costimulator (ICOS)), intracellular adhesionmolecule-1 (ICAM-1), aber auch kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80 (B7-1)) und CD86 (B7-2)), die vermehrt auf den aktivierten APC exprimiert werden (Signal 2)^{12, 24}. Dies führt zu einer Aktivierung von vorwiegend zytotoxische CD8⁺ Zellklone Diese Differenzierung ist abhängig von Zytokinen, die während der APC – T-Zell-Interaktion freigesetzt werden (IL-12, INF- γ und IL-2) (Signal 3)^{12, 24}. CD4⁺ T-Zellen regulieren die Ausprägung des Ekzems hierbei über die Zytokine IL-4 und IL-10²⁵.

Neben IFN- γ und IL-2 wurde dem Zytokin IL-17 auch eine Rolle zugesprochen²⁴. Zunächst wurden in menschlichen Zellen T-Zell-Klone identifiziert, die in einer Kontaktallergie geprimed auf Nickel IL-17 freisetzen²⁶. Dies wurde in einem murinen Modell bestätigt, indem beobachtet werden konnte, dass IL-17 Knock-out Mäuse eine abgeschwächte Form der CHS ausbilden²⁷. Weitere Versuche zeigten, dass es sich dabei um IL-17 produzierende CD8⁺ T-Zellen handelt, die neben den bekannten INF- γ CD8⁺ T-Zellen zu der Entstehung einer CHS beitragen²⁸. Diese aktivierten T-Zellen proliferieren in den LK und differenzieren zu Gedächtnis T-Zellen, die über die efferenten Lymphbahnen in die Zirkulation auswandern und durch das Gewebe patrouillieren¹².

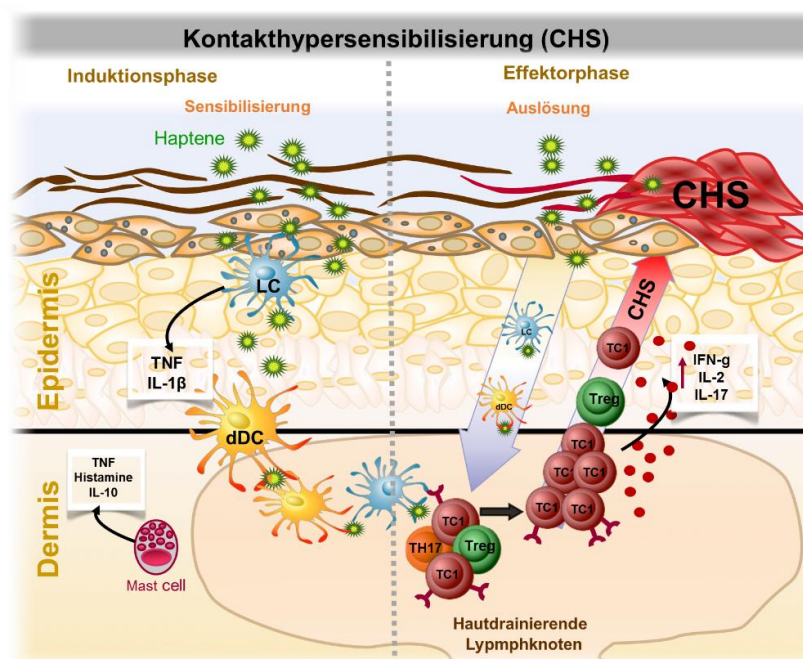


Abbildung 1: Schematische Darstellung der murinen Kontakthypersensibilisierung (CHS).

Erst der wiederholte Kontakt mit dem Allergen führt zu der sogenannten Auslösephase (auch Effektorphase genannt). Die im Gewebe vorhandenen Gedächtnis-T-Zellen werden aktiviert und migrieren zu der Stelle, an der das Hapten mit der Haut erneut in Kontakt getreten ist. Dies äußert sich mit einer zytotoxischen CD8⁺ (Tc1) Zell-Antwort, bei der proinflammatorische Zytokine wie INF- γ und IL-2 aber auch IL-17 im Vordergrund stehen^{9, 12, 25, 28, 29}. Von CD4⁺ T-Zellen sezernierte Zytokine, wie IL-4 und IL-10, regulieren die Ausprägung der allergischen Reaktion²⁵. Aufgrund der proinflammatorischen Zytokinausschüttung kommt es zu einer lokalen Einwanderung von Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und Eosinophilen, die sich klinisch als Ekzem mit Rötung, Juckreiz und Blasenbildung äußert³⁰.

Aktuelle Publikationen zeigen, dass innerhalb der ersten 24 h nach der Auslösephase eine Clusterbildung von dDCs und T-Zellen entsteht, die für die T-Zell-Reaktion wichtig sind^{31, 32}. Hierbei wurde deutlich, dass zunächst Makrophagen in der perivaskulären Zone auf IL-1 α , welches von den Keratinozyten nach Allergenstimulus ausgeschüttet wird, reagieren. Dies führt zu einer erhöhten Expression des Chemokin Liganden CXCL-2 aus den Makrophagen. dDC exprimieren den CXC Rezeptor 2 (CXCR 2) und reagieren auf das CXCL-2 der Makrophagen, indem sie zu den perivaskulären Zonen migrieren, wodurch die Chemokin-Expression weiter induziert wird und eine Cluster Bildung von dDCs entsteht^{32, 33}. CD8⁺ T-Zellen werden zu den dDC-Clustern rekrutiert und es entsteht eine klonale Expansion dieser T-Zellen. Hierbei werden von den CD8⁺ T-Zellen proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2 freigesetzt²⁴.

Th9 Zellen wurden erst kürzlich als eine neue Subpopulation in der CHS entdeckt³⁴⁻³⁶. Studien zeigen zum einen regulatorische (*in vivo*) als auch proinflammatorische (*in vitro*) Eigenschaften, je nachdem in welchem Kontext das Zytokin gebildet wurde. In einer DNFB induzierten CHS wurde IL-9 defizienten Mäuse eine verstärkte Form einer DNFB induzierten CHS mit erhöhter IFN- γ Ausschüttung im Ohr beobachtet³⁶.

In den letzten Jahren wurde vermehrt das angeborene Immunsystem fokussiert und inwieweit es zur Aktivierung der LC und dDCs beiträgt. Es zeigte sich, dass in den ersten Stunden nach der Sensibilisierung Wechselwirkungen zwischen Keratinozyten und LC entstehen. Nachdem die Hautzellen Hapten-bedingt beschädigt wurden, induzieren sie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, was zu einer Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP) und möglichen anderen sogenannten „damage associated molecular patterns“ (DAMPs) sowie zu der Generation von niedermolekularer Hyaluronsäure (HA) führt^{20, 24, 37, 38}. Das ATP wird durch den ATP abhängigen P2X7 Rezeptor in nahegelegenden Hautzellen wahrgenommen und aktiviert das NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) Inflammasom. Dies resultiert in einer

Aktivierung der Caspase 1 und Freisetzung von IL-1 β und IL-18^{24, 38}. Die niedermolekulare HA ist ein Ligand für Toll-like Rezeptoren (TLR). Es konnte gezeigt werden, dass die niedermolekulare HA an die TLR2 und TLR4 bindet und dadurch eine erhöhte Expression von pro-IL-1 β und pro-IL-18 induziert. Diese werden dann als proinflammatorische Zytokine freigesetzt und führen so zu einer indirekten Hapten-Erkennung und Aktivierung der APCs^{24, 37}.

1.2 Toleranzmechanismen

Das intakte Immunsystem erkennt eine enorme Diversität an körperfremden Antigenen, während es gleichzeitig in der Lage ist, körpereigene Antigene zu tolerieren. Da die Ausbildung der Immunmechanismen auf potentiell pathogene Antigene zu reagieren auch die Gefahr birgt, körpereigene Antigene zu erkennen, haben sich im Laufe der Evolution unterschiedliche Kontrollmechanismen entwickelt, die unter den Begriffen der zentralen und peripheren Toleranz zusammengefasst sind^{39, 40}.

1.2.1 Zentrale und periphere Toleranz

Die zentrale Toleranz wird während der Entwicklung der T-Zellen durch Elimination autoreaktiver T-Zellen im Thymus erworben.

Hierbei durchlaufen T-Zellen Selektionsprozesse, bei denen sie entweder positiv oder negativ selektiert werden. Zellen, die mit zu geringer Affinität an ein körpereigenes MHC Molekül binden, erhalten kein Überlebenssignal. Auch wenn die T-Zellen eine sehr starke Affinität gegenüber einem körpereigenen MHC Molekül (potentiell autoreaktiv) aufzeigt, unterliegt sie der Apoptose. Dieser Schritt wird als Negativselektion bezeichnet und trifft ca. 95% der T-Lymphozyten. Ein positives Überlebenssignal erhalten nur T-Zellen, die mit einer intermediären Affinität an den Autoantigen-MHC Komplex im Thymus binden (positive Selektion)^{40, 41}.

Aus diesem Grund ist der Prozess der zentralen Toleranz unvollständig, da potentiell autoaggressive T-Lymphozyten in die Peripherie gelangen. Um autoimmunologische Prozesse und die dadurch entstehenden Autoimmunerkrankungen zu verhindern, haben sich zusätzlich periphere Toleranzmechanismen entwickelt^{6, 42}. Dazu zählen die Ignoranz, die Anergie, die Apoptose sowie die Suppression von autoreaktiven T-Zellen. Diese Mechanismen dienen

jedoch auch zur Kontrolle von Immunreaktionen bei Allergien und Infektionen⁴². Eine Ignoranz entsteht, wenn die antigenen Epitope nicht wahrgenommen werden. Dieses Phänomen tritt auf, wenn die Epitope nur minimal auf der Oberfläche der APCs exprimiert werden und so eine Aktivierung nicht ausreicht oder in Regionen, die durch eine Blut-Gewebe Schranke immunprivilegiert sind (z.B. Linse des Auges, Plazenta)⁴³

Im Toleranzmechanismus der Anergie überleben die T-Zellen zwar, aber die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung zur Effektorzelle bleibt aus. Die Anergie tritt auf, wenn intrinsische Signale zur Aktivierung der T-Zellen vermindert sind. Hierbei erhält die T-Zelle zwar ihr antigenspezifisches Signal (Signal 1), hat aber kein kostimulatorisches Signal durch CD28 vermittelt bekommen (Signal 2)⁴⁴. Dies geschieht, indem sie durch koinhibitorische Signale ausgeschaltet werden, die für eine Antigenerkennung nötig sind. Ein Beispiel hierfür ist die Signalübermittlung durch das zytotoxische T Lymphozyten Antigen (CTLA-4), welches inhibitorisch auf die Bindung zwischen dem CD28 Rezeptor und dem dazugehörigen Ligand B7 wirkt. Dies resultiert daraus, dass CTLA-4 u.a. eine höhere Affinität zu B7 besitzt als CD28. Ist eine Zelle anerg, reagiert die Zelle nicht mehr (prolifert nicht und produziert kein IL-2), selbst wenn die Stimulation vollständig ist (Signal 1 + 2). Die Anergie beschreibt somit den Zustand der funktionellen Reaktionslosigkeit⁴⁴⁻⁴⁶. Ist die Möglichkeit der Zellen eingeschränkt (z.B. in CTLA-4 Knock-out-Mäusen) entwickeln diese eine systemische Autoimmunität mit fatalen Multiorganversagen⁴⁷.

Bei der Apoptose (Aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD)) werden die T-Zellen durch die Bindung von einem FAS Molekül an den zugehörigen FAS Liganden (FASL) geführt. Diese Signaltransduktionskaskade wird induziert, wenn z.B. eine CD4⁺ T-Zelle in kurzen Abständen wiederholt stimuliert wird. FasL wird dann vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert und es bindet an das FAS-Molekül auf derselben oder naheliegender Zellen. Es aktiviert eine Kaskade von Caspasen (Caspase 8), die die Zelle in Apoptose führen. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil in der peripheren Deletion autoreaktiver T-Zellen^{48, 49}.

In dem Toleranzmechanismus der Suppression sind regulatorische T-Zellen beteiligt. Man unterscheidet hierbei zwei Kategorien von CD4⁺ regulatorischer T-Zellen, die sich aufgrund des Ortes ihrer Entstehung unterscheiden^{50, 51}. Zum einen spielen natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (nTregs) und die peripher induzierten CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Tregs (iTregs) eine Rolle. Sie unterscheiden sich grundsätzlich darin, wo und unter welchen Bedingungen sie generiert werden. nTregs entwickeln sich im Thymus, wenn sie infolge der Erkennung von Selbstpeptid mit MHC Komplexen auf APCs im Thymus ein starkes T-Zell-Rezeptor-Signal erhalten haben, welches jedoch nicht stark genug für eine

Negativselektion war^{52, 53}. Hingegen werden Foxp3⁺ iTregs in den peripheren lymphatischen Organen aus naiven T-Zellen gebildet. Dies konnte in Mausmodellen gezeigt werden und ist hauptsächlich von der T-Zell-Rezeptor Stimulation und den Zytokinen IL-2 und TGF- β abhängig^{51, 54, 55}.

Die Treg-Populationen zeigen jedoch einen ähnlichen Phänotyp. Sie exprimieren die α -Kette des IL-2 Rezeptors sowie den forkhead box P3 (Foxp3) Transkriptionsfaktor⁵⁶. In murinen Zellen stellt Foxp3 einen spezifischen Marker für regulatorische T-Zellen dar, während humane konventionelle Th Zellen auch CD25 und Foxp3 hochregulieren, welches eine eindeutige Identifizierung erschwert⁵⁷. Durch Depletionsversuche in gesunden Mäusen konnte demonstriert werden, dass nTregs eine wichtige Rolle in Autoimmunerkrankungen spielen⁵⁸. Außerdem erkranken Mäuse, die eine Mutation im Foxp3 Gen aufweisen, an lymphoproliferativen Autoimmunerkrankungen^{56, 59}.

Beide Treg-Populationen weisen neben dem ähnlichen Phänotyp auch ähnliche funktionelle Eigenschaften auf⁵⁰. Sie produzieren vor einer Aktivierung zunächst wenig Zytokine und verhalten sich anerg⁶⁰. Nach einer Aktivierung wird ihre suppressorische Funktion über einen direkten Zellkontakt induziert. Zytoplasmatisches cAMP wurde zum Beispiel als ein Mediator dieser direkten Zell-Zellkontakte identifiziert⁶¹. Tregs bilden nach ihrer Aktivierung vermehrt diesen sekundären Botenstoff, der sich intrazellulär in der Zelle befindet und unter der Ausbildung von gap junctions in T-Effektorzellen übertragen wird⁶². Dies führt dann zu einer Blockade der IL-2 Produktion und so zur Inhibition der Aktivierung und Expansion der T-Effektorzellen zusätzlich wird die Reifung der DCs beeinträchtigt^{63, 64, 65}.

Es gibt noch weitere Subsets induzierter CD4⁺ Tregs, wie z.B. T-regulatory-typ-1 (Tr-1) oder T-Helfer-Typ 3 (Th3)⁶⁶⁻⁶⁸. Es handelt sich hierbei um eine kleine Subpopulation der peripheren CD4⁺ T-Zellen, die bereits im Thymus entstehen oder aber auch später in der Peripherie aktiviert oder aus CD4⁺ T-Zellen gebildet werden können. Sie wirken, indem sie Einfluss auf reaktive T-Zellen nehmen und deren Aktivierung oder Differenzierung unterdrücken^{67, 69}. Th3-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie hohe Mengen von TGF- β sezernieren und so die antigenspezifische Aktivierung von T-Effektorzellen inhibieren können. Ihre Entstehung ist gekoppelt an eine inhibierte Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen in der Gegenwart von IL-10 und TGF- β ^{67, 70}.

Tr-1 Zellen entstehen durch eine fortwährende Aktivierung von T-Effektorzellen in Anwesenheit von IL-10⁷¹. Sie sind durch eine geringe Proliferation, aber auch durch eine Sekretion von IL-10 gekennzeichnet, welches u.a. die stimulatorischen Eigenschaften von APCs hemmt und dadurch eine weitere Aktivierung von T-Zellen verhindert^{66, 71}.

Die Suppressionsvermittlung der verschiedenen Subpopulationen unterscheidet sich insofern, dass Th3 und Tr-1 Zellen vermehrt über die Sekretion von Zytokinen hemmen, während die Suppression durch nTregs von einem direkten Zellkontakt abhängig ist.

1.2.2 Niedrigzonentoleranz (NZT)

Das Modell der Niedrigzonentoleranz (NZT engl. Low zone tolerance (LZT)) stellt eine mögliche Erklärung dafür dar, warum es möglich ist, dass Menschen zwar mit einer Vielzahl von Kontaktallergenen tagtäglich in Berührung kommen, jedoch nicht jedes Individuum allergisch darauf reagiert. In der Arbeitsgruppe (AG) Steinbrink wurde über die Jahre das Modell der NZT etabliert (Abb. 2). Hierbei werden Toleranzmechanismen in Gang gesetzt, noch bevor die eigentliche Sensibilisierung und Auslösung in der Haut induziert wird. Um eine NZT auszulösen, wird die Haut von Mäusen vor der Sensibilisierung und Auslösung an mehreren Tagen mit subimmunogenen Mengen, d.h. in so geringen Mengen, dass die Haptene keinen Hapten-Carrier Komplex mit Proteinen bilden, der eine allergische Immunantwort hervorrufen würde, eines Kontaktallergens (z.B. TNCB, DNCB oder Oxazolone) behandelt.

Die Haptene durchdringen die Haut, aber aktivieren nicht die LCs der Haut, wie es in dem CHS Modell der Fall ist⁷². Auch dDCs und B-Zellen konnten als APCs bereits ausgeschlossen werden⁷³. Welcher Mechanismus kurz nach Eindringen der Haptene in die Haut eine Rolle spielt, konnte bis dato noch nicht genau geklärt werden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Allergene in die lymphatischen Organe abgeschwemmt werden. Dort werden IL-10 produzierende CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs Hapten-unspezifisch aktiviert⁷⁴. Außerdem sind CD8⁺CD11c⁺ DCs beteiligt und es werden Hapten-spezifische Suppressor CD8⁺ T-Zellen gebildet^{74, 75}. Diese stellen die Effektorzellen der NZT dar und sind in der Lage, Tc2 immunregulierende Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β freizusetzen⁷⁶. Arbeiten der AG Steinbrink zeigen weiterhin auf, dass die CD8⁺ Effektor T-Zellen der NZT direkt auf CD8⁺CD11c⁺ DCs wirken und sie zu sogenannten „killer-DCs“ heranreifen lassen⁷⁷.

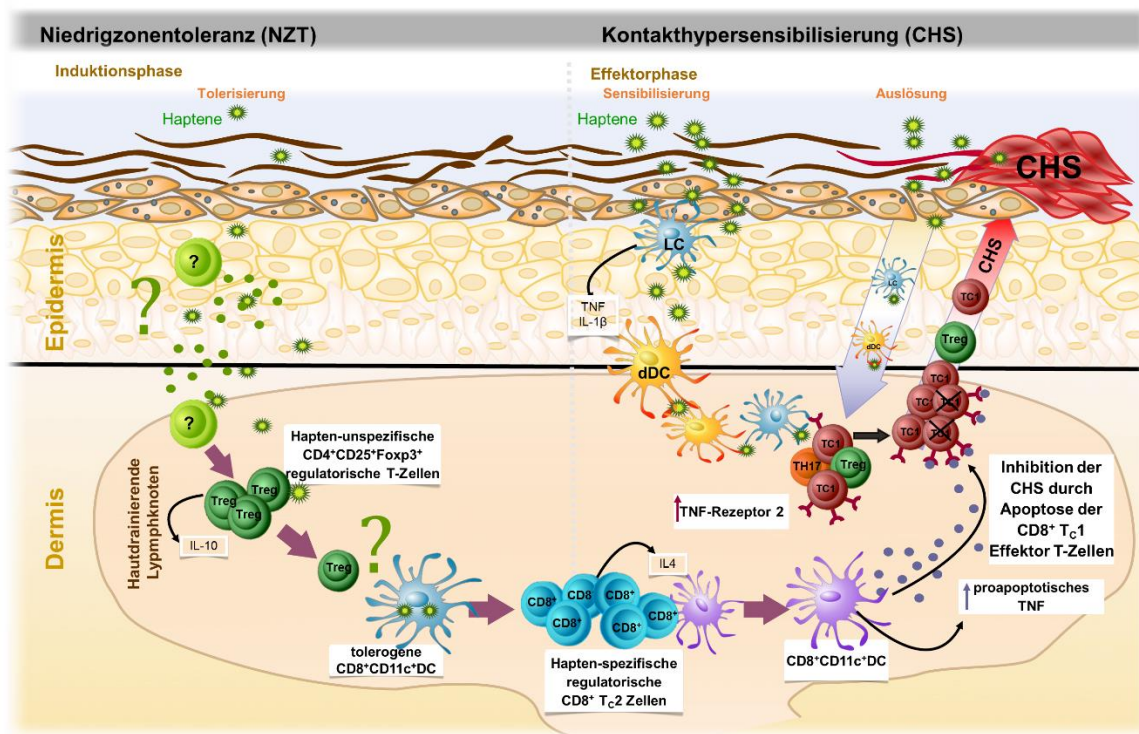


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Niedrigzontoleranz (NZT).

Durch die mehrmalige epikutane Applikation subimmunogener Dosen TNCB auf die Haut wird eine NZT ausgelöst. Sie ist in der Lage, eine CD8⁺ Tc1-vermittelte CHS zu inhibieren.

Diese killer-DCs sind dadurch charakterisiert, dass sie vermehrt proapoptotisches TNF freisetzen. Diese spielen in der Effektorphase der NZT eine wichtige Rolle. Wie in der Literatur beschrieben, werden CD8⁺ Effektor T-Zellen während der Sensibilisierung gebildet (siehe 1.1.2)^{12, 25}. Maurer et al. konnte dabei zeigen, dass in einer CHS der TNF-Rezeptors 2 auf diesen Effektor T-Zellen hochreguliert wird. Sind nun bereits CD8⁺CD11c⁺ killer DCs während der NZT-Induktion herangereift, führt die Freisetzung des TNFs dazu, dass eine Apoptose in den Effektorzellen der CHS ausgelöst wird und so die CHS inhibiert wird⁷⁷. Die supprimierenden Zytokine der CD8⁺ Tc2 Effektor T-Zellen der NZT limitieren die Ausbildung der CHS zusätzlich.

Apoptive Transfer (AT) -Versuche belegten, dass die NZT durch Hapten-unspezifische CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, tolerogene CD8⁺CD11c⁺ DCs als auch die Hapten-spezifische CD8⁺ Effektor T-Zellen auf naive Mäuse übertragen werden kann^{74, 75, 77}.

Eine NZT kann nicht nur durch die epikutane Applikation von Kontaktallergenen induziert werden. Es ist auch möglich, eine NZT durch intravenöse (i.v.) und orale Gabe eines Kontaktallergens hervorzurufen⁷⁸.

1.2.3 Orale Toleranz

Unter dem Phänomen der oralen Toleranz versteht man ein komplexes Netzwerk aus immunologischen Mechanismen, die eine Toleranz regulieren. Dabei werden hohe Anforderungen an das Immunsystem gestellt, da es mit einer Vielzahl von Antigenen, sei es aus Nahrung, körpereigener endogener Flora und pathogenen Organismen in Kontakt kommt und dabei zwischen gesundheitsschädigenden und Antigenen der natürlichen Darmflora und der Nahrung unterscheiden muss⁶⁸.

Hierbei existieren verschiedene Toleranzmechanismen bei denen unterschiedliche T-Zell-Antworten generiert werden können. Nach Antigenaufnahme im Darm-assoziierten, lymphoiden Gewebe (GALT) wird prozessiertes Antigen mit Hilfe von MHC II Komplexen T-Zellen präsentiert. Dabei modulieren Kosignale die T-Zell-Antwort. Im Gegensatz zu den kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80 und CD86), die proinflammatorische T-Zellen induzieren, schwächen koinhibitorische Moleküle (z.B. B7-H1, B7-H2, B7-H3) eine T-Zell-Antwort ab⁷⁹. Treffen nun sehr hohe Mengen (Hochdosis) eines Antigens (z.B. Ovalbumin; OVA) auf die Darmmukosa, führt dies zu einer Toleranzinduktion durch (eine APC-vermittelte) T-Zell Anergie oder T-Zell Apoptose (Deletion)⁸⁰⁻⁸². Neben diesen beiden Toleranzinduktionen wird vor allen Dingen bei niedrigen Antigenkonzentrationen (Niedrigdosis) Tregs eine tragende Rolle zugeschrieben⁶⁸. Die Antigene können das Darmepithel entweder durch Lücken zwischen Tight-Junctions durchqueren oder werden im GALT durch sogenannte M-Zellen aufgenommen⁸³. Diese befinden sich oberhalb der Peyerschen Plaques und präsentieren die Antigene den DCs, welche sie dorthin transportieren. DCs können die Antigene durch ihren Dendriten direkt aus dem Lumen aufnehmen ohne die Tight-Junctions des Epithels dabei zu beschädigen⁸⁴. Im GALT präsentieren APCs (DCs, Makrophagen, aber auch Plasma Zellen) den Tregs das Antigen, die dann über Zell-Zell-Kontakte oder die Produktion von IL-10, IL-4 und TGF- β eine Immunsuppression vermitteln⁸⁵⁻⁸⁷.

TGF- β hat für die orale Toleranz eine zentrale Bedeutung, da nach einer Neutralisierung des Zytokins keine orale Toleranzinduktion mehr möglich ist⁸⁸. Das TGF- β wird nach oraler Tolerisierung vorwiegend von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den Peyerschen Plaques und den mesenterialen LK ausgeschüttet, wobei diese eine spezifische Treg-Subklasse namens Th3 Zellen darstellt^{67, 68, 70, 89}. Durch das sezernierte TGF- β können auch andere konventionelle CD4⁺ T-Zellen in Foxp3⁺ Zellen umgewandelt werden und einen regulatorischen Phänotyp einnehmen. Außerdem wirkt TGF- β auf nTregs um Th1 Antworten abzuschwächen⁹⁰. Tr-1

Zellen, die IL-10 ausschütten, erhöhen die Produktion von TGF- β , welches auch natürlich vorkommende Tregs anregt⁶⁶. Obwohl Tr-1 Typ Zellen vorzugsweise durch nasales Antigen induziert werden, wurde gezeigt, dass IL-10 sezernierende Tr-1 Zellen eine Rolle in der oralen Toleranz, die durch niedrige Dosen von Antigenen induziert wurde, spielen können^{68, 91}.

Es ist auch möglich, eine orale Toleranz mit Haptenen auszulösen. Es wurde dabei gezeigt, dass im Gegensatz zu der oralen Toleranz gegenüber Proteinen, die Peyerschen Plaques nicht von Bedeutung sind⁸⁹.

Untersuchungen in denen hohe Mengen DNFB und TNCB oral verabreicht wurden, konnten bereits die Intensität einer CHS verringern⁹²⁻⁹⁵. Auch eine NZT kann durch die orale Gabe von subimmunogenen Mengen eines Kontaktallergens induziert werden und so eine CHS verhindern⁷⁸.

1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Unter einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) wird das Resultat einer inadäquaten und ständigen (rezidivierende) Aktivierung des Immunsystems in der Darmmukosa verstanden^{96, 97}. Unter den klinischen Symptomen können Schmerzen im Abdominalbereich, Fieber, Erbrechen, Diarrhö, Mangelerscheinungen bis zum Gewichtsverlust genannt werden. Morbus Crohn und Colitis ulzerosa sind die häufigsten Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung und betreffen rund 2,2 Millionen Einwohner in Europa^{98, 99}.

1.3.1 Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa

Die Ätiologie der CED ist noch nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die abweichende Immunantwort durch eine genetische Disposition zusammen mit einer noch nicht geklärten Interaktion zwischen Umweltfaktoren (bakterielle und virale Faktoren, Konsumgewohnheiten wie Rauchen oder Stress), der endogenen Darmflora und dem intestinalen Immunsystem bedingt ist^{100, 101}. Bei beiden Formen der CED können neben den lokalen auch systemische Komplikationen auftreten, die die Therapie zusätzlich erschweren¹⁰². Durch die immer wiederkehrende Entzündung ist das Krebsrisiko im Darm ebenfalls erhöht⁹⁸. Die Colitis ulzerosa und Morbus Crohn unterscheiden sich in ihrer Pathogenese. Die Colitis ulzerosa ist auf den Dickdarm begrenzt. Die Entzündung breitet sich zwar kontinuierlich aus,

findet sich aber nur in den oberflächlichen Schichten der Darmwand wieder¹⁰³. Das Epithel wird nekrotisch und es finden sich hämorrhagische Episoden mit Ödemen vor. In den dadurch entstehenden Kryptenabzessen sind vorwiegend Ansammlungen von Neutrophilen zu beobachten⁹⁶. Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine Th2-vermittelte T-Zell-Antwort, während der Morbus Crohn Th1/Th17-vermittelt ist^{96, 104}.

Entzündliche Prozesse beim Morbus Crohn können im Gegensatz zu der Colitis ulcerosa den gesamten Verdauungstrakt betreffen, jedoch nicht kontinuierlich, sondern abschnittsweise mit einem Schwerpunkt im terminalen Ileum und dem Übergang vom Dünndarm zum Dickdarm (Abb. 3)⁹⁶. Die Entzündung betrifft alle Gewebsschichten des Darms (transmural) und das zelluläre Infiltrat der Läsionen besteht hauptsächlich aus T und B-Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen^{105, 106}.

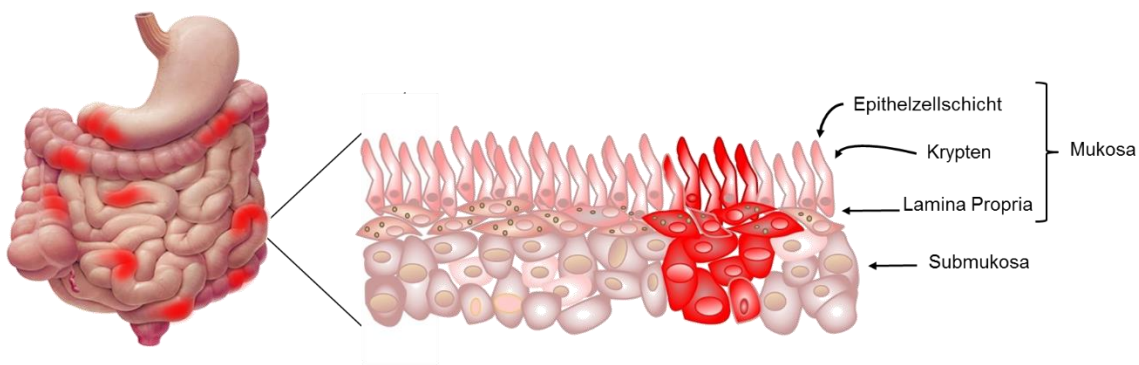


Abbildung 3: Lokalisation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Aufbau der Darmwand.

Der Morbus Crohn ist durch eine diskontinuierliche, transmurale Entzündung gekennzeichnet, die den gesamten Gastro-Intestinaltrakt vom Mund bis zum After betreffen kann. Die Entzündungen sind dadurch charakterisiert, dass sie alle Gewebsschichten der Darmschleimhaut betreffen

1.3.2 Mausmodell der TNBS-induzierte Colitis

Die TNBS-induzierte Colitis gilt als zuverlässiges Modell entzündlicher Darmerkrankungen und kann Aufschluss über deren Mechanismen geben. Sie ähnelt in histopathologischer und immunologischer Hinsicht der Morbus Crohn Erkrankung und ist deswegen ein nützliches Modell um die Mechanismen, die zur Morbus Crohn Erkrankung führen, zu analysieren und mögliche Therapiemaßnahmen aufzudecken. Neurath et al. etablierte das heutige Standard-Modell der TNBS-Colitis in Mäusen¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Durch die intrarektale Applikation von TNBS gelöst in 25-50%igen Ethanol, nach vorheriger TNBS-Sensibilisierung, kann in dafür empfindlichen Mäusestämmen eine Darmentzündung induziert werden. Das Ethanol dient der Durchbrechung der Darmbarriere¹⁰⁸. Die akute TNBS-induzierte Colitis ist gekennzeichnet durch eine transmurale Infiltration von Lymphozyten und resultiert in einer Verdickung der Schleimhaut und einer

Verminderung der Becherzellen¹¹⁰. Das Modell zeigt die Charakteristika eines direkten CD4⁺ Th1-Entzündungsmodells mit den damit assoziierten Zytokinen TNF- α , IFN- γ und IL-2^{96, 104}. Neuere Erkenntnisse beinhalten, dass zudem eine IL-17-produzierende Klasse der T-Zellen (Th17-Zellen) an der Pathogenese der TNBS-induzierten Colitis, sowie an der des Morbus Crohn beteiligt ist^{111, 112}. In der TNBS-induzierten Colitis werden nach Antigenpräsentation CD40 Liganden (CD40L) auf T-Zellen exprimiert. Bei der Interaktion mit einem CD40-CD40-Liganden zwischen APC und T-Zelle wird eine vermehrte IL-12 Sekretion induziert¹¹³. Durch die IL-12 Stimulation unterziehen sich die T-Zellen einer Th1-Differenzierung und produzieren IFN- γ und TNF- α ¹¹⁴. Durch eine positive Rückkopplung werden die APCs weiter angeregt, IL-12 zu produzieren, was die Th1 Antwort verstärkt. Weiterhin wirken diese Zytokine auf Makrophagen die weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-6 ausschütten¹⁰⁴.

1.4 Diabetes

Der Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die 8,3 % der Weltbevölkerung betrifft. Sie wird in 2 Haupttypen, dem Diabetes mellitus Typ I (betrifft ca. 5 %) und dem Diabetes mellitus Typ II (betrifft ca. 90%), unterteilt¹¹⁵. Weitere Formen entstehen durch Erkrankungen des Pankreas, haben genetische oder medikamentöse Ursachen oder treten während der Schwangerschaft (Gestationsdiabetes) auf. Alle Diabetestypen haben als gemeinsames Charakteristikum, die Hyperglykämie. Während der Typ II Diabetes häufig auf Lebensgewohnheiten zurückzuführen ist, handelt es sich bei dem Typ I Diabetes um eine Autoimmunerkrankung^{116, 117}.

1.4.1 Diabetes mellitus Typ I

Der Diabetes mellitus Typ I ist eine chronische, T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung. Hierbei werden die Insulin-produzierenden β -Zellen im Pankreas durch das Immunsystem angegriffen und zerstört, was zu einem absoluten Insulinmangel führt¹¹⁶. Als Folge muss das fehlende Insulin lebenslang durch künstliche Insulinpräparate zugefügt werden. Ein weiteres Problem stellen Folgeerkrankungen des Diabetes dar, die durch erhöhte Blutzuckerwerte entstehen. Zu ihnen gehören u.a. das Nierenversagen, Erblindung und Polyneuropathien¹¹⁵. Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischen, immunologischen und äußeren

Umweltfaktoren angenommen¹¹⁶. Zu dem Verständnis und der Aufklärung der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I konnte ein Tiermodell, die „non obese diabetic“ (NOD)-Maus, wesentlich beitragen¹¹⁸.

1.4.2 Die NOD-Maus als murines Modell des Diabetes Typ I

Die NOD-Maus entwickelt spontan einen Diabetes, der sich durch klassische Symptome wie Hyperglykämie und daraus folgend Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust äußert. Die NOD-Maus stammt ursprünglich von ICR/Jcl Mäusen ab. In den 70er Jahren bemerkte man, dass Mäuse aus diesem Stamm an spontanen Diabetes erkrankten und durch eine gezielte Zucht wurde der NOD-Maus Stamm gebildet¹¹⁸⁻¹²⁰. Die Inzidenz ist zwischen den Geschlechtern stark unterschiedlich. Während sich in ca. 80% der Weibchen nach 30 Wochen ein Diabetes manifestiert hat, erkranken nur 20 % der Männchen¹¹⁸.

Es wird angenommen, dass die Pathogenese des Diabetes beginnt, wenn β -Zellen absterben (z.B. durch exogene Trigger wie virale Infektionen)¹²⁰. β -Zell-Antigene werden durch APCs aufgenommen, prozessiert und folgend in den pankreatischen LK den T-Zellen präsentiert, woraufhin autoreaktive $CD4^+$ T-Zellen über MHC II aktiviert werden¹²¹. Diese autoreaktiven T-Zellen sollten unter normalen Umständen bereits im Thymus durch die zentrale Toleranz oder später durch Tregs der peripheren Toleranz supprimiert werden^{122, 123}. Die auf β -Zellen geprimten T-Zellen infiltrieren in die Inselzellen und beschädigen weitere β -Zellen und setzen $IFN-\gamma$ und $IL-2$ frei, was weitere Immunzellen rekrutiert. Die Zerstörung der Zellen ist dann hauptsächlich durch Granzyme und Perforin, welches von $Tc1$ $CD8^+$ T Zellen gebildet wird, sowie von Zytokinen wie $IFN-\gamma$ und $IL-17$ mediiert¹²⁴. Weitere Immunzellen, wie Makrophagen, DCs und natural killer (NK)- Zellen, sind ebenfalls an der Zerstörung der β -Zellen im Pankreas und somit an der Entstehung des Diabetes mellitus Typ I beteiligt¹²⁵.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit wird in drei Teile untergliedert. Untersucht werden Mechanismen und Einflüsse der NZT auf die CHS, die TNBS-induzierte Colitis und dem Diabetes mellitus Typ I.

Teil 1: Im ersten Teil liegt der Fokus auf den Mechanismen des CHS/NZT Modells. Hierbei wird die Interaktion der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und der $CD11c^+$ DCs während der Induktionsphase der NZT untersucht.

Teil 2: Es wird überprüft, ob das Modell der NZT neben der Tc1 $CD8^+$ T-Zell-vermittelten CHS auch eine Th1/Th17 $CD4^+$ vermittelte TNBS-induzierte Colitis inhibieren kann. Nach der Feststellung werden weitere Mechanismen untersucht, u.a. die Beteiligung von $CD4^+CD25^+$ Tregs und IL-10 und ob es sich hierbei um einen Hapten-spezifischen Mechanismus handelt (Abb. 4).

Teil 3: In diesem Teil wird untersucht, ob eine NZT-Induktion Einfluss auf das Auftreten von einem spontan auftretenden Diabetes mellitus Typ I in der NOD-Maus nehmen kann.

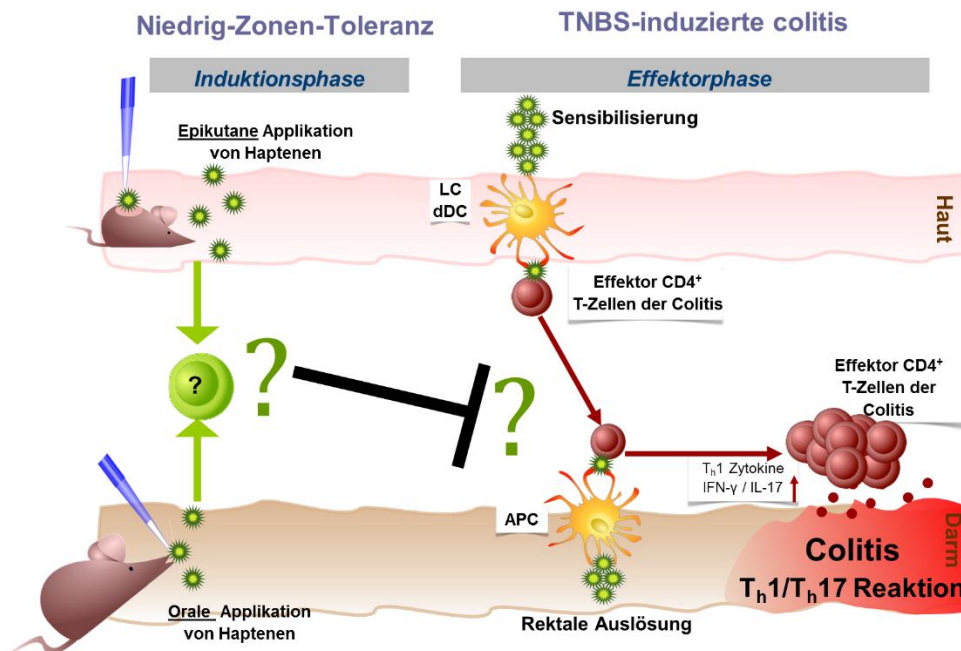


Abbildung 4: Zielsetzung zur Untersuchung der NZT in der TNBS-induzierten Colitis.

Es wird überprüft, ob eine epikutane und orale Applikation zu einer Verhinderung einer Th1/Th17 vermittelten TNBS-induzierten Colitis führen kann. Im weiteren Verlauf wird untersucht, ob $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs und IL-10 an der Entstehung der NZT zur Prävention der Colitis beteiligt sind und ob dieser Mechanismus Hapten-spezifisch ist.

MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte & Verbrauchsmaterialien

<i>Artikel</i>	<i>Firma</i>
β-Szintillationscounter	LKB, Bromma, Schweden
96-Well-Mikrotiterplatte	NUNC, Wiesbaden, (D)
96-Well-Zellkulturplatte	BD Falcon, Schwerte, (D)
Analysenfeinwagen	MC 1 Laboratory LC2200 P, Fa. Sartorius, Göttingen, (D) MC1 Analytic A C210S, Fa. Sartorius, Göttingen(D)
Autoklav	Scout pro, Ohaus , Pine Brook, USA
Blutzuckermessgerät	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, (D)
Blutzuckermessstreifen	Freestyle Lite, Abbot, Wiesbaden (D)
Brutschrank	Freestyle Lite Teststreifen, Abbot, Wiesbaden (D)
Coldlab	Typ HERACell, Kendro, Hanau, (D)
Deckgläser	LKB Bromma, 2023 Minicoldlab,(D)
Einmal-Feindosierungsspritze	Waldemar Knittel Glasbereitung GmbH, Braunschweig, (D)
ELISA Microplate Reader	(1ml) BRAUN, Melsungen, (D)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Model 450, Bio-Rad Laboratories, München, (D)
FACS-Röhrchen	(0,5 ml/1ml) Eppendorf AG, Hamburg, (D)
Fluoreszenzmikroskop	5 ml Polystyrene Round- Bottom-Tube, BD Falcon™, Heidelberg, (D)
Kanülen (steril)	Olympus IX81, Olympus, Center Valley, PA, USA
Kanülen (steril)	BD Microlance™3, Heidelberg, (D)
Lichtmikroskope	Sterican® (21 G x 1 1/2", Gr.2) Braun, Melsungen, (D)
	IMT2, Olympus, Hamburg, (D)

	DIAPLAN, Leitz, Wetzlar, (D)
	Axiovert 135, Zeiss, (D)
Lichtmikroskop Kamera	Model 3.2.0, Visitron Sytems GmbH, USA
Software	Metavue, Version 6.2r2, Universal Imaging Goup
Magnetrührer	MR2002, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, (D)
Mini-Endoskop	Coloview System, 1,9mm, Karl Storz, Tuttlingen(D)
Mikrometerschraube	Öditest, Kroeplin GmbH&Co.KG, Schlüchtern, (D)
MACS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Objektträger	(25 x 75 x 1mm), Menzel GmbH & CoKG, Braunschweig, (D)
Paraffin-Einbett-Maschine	Tissue-Tek, TEC TM , Sakura, Torrance, USA
pH-Meter	CG841, Mitlacher Laboratoriumstechnik, Schott, Mainz, (D)
Pipettenspitzen	(10 µl/200 µl/1000 µl), Greiner GmbH, Frickenhausen, (D)
Printed Filtermat	(A 102 x 258 mm), Wallac, Turau, Finnland
Probeneinschweißfolie	Sample Bag (102 x 258 mm), Wallac, Turau, Finnland
Spülkanüle	Acufirm, Dreieich, (D)
Sterilbank	HERAsafe, Heraeus, Kendro, Hanau, (D)
TNBS- Schlauch	Certofix-Mono, Melsungen, (D)
Wasserbad	TW12, Julabo, Seelbach, (D)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Merck, Wiesbaden, (D)
Zellsieb	(70µm) BD Falcon, Schwerte, (D)
Zentrifugen	Multifuge 3S-R, Heraeus, Hanau, (D)
	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, (D)
	Minifuge RF, Heraeus, Hanau, (D)
Zentrifugen-Röhrchen	(15ml/50ml) Greiner GmbH, Frickenhausen, (D)

2.1.2 Chemikalien & Enzyme

<i>Artikel</i>	<i>Firma</i>
³ H- Thymidin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, (D)
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, (D)
Aceton	Sigma, Taufkirchen, (D)
Aqua dest.	Apotheke der Universitätsmedizin Mainz, (D)
Calcein	Calcein AM, Invitrogen, Darmstadt, (D)
Bepanthen	Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, (D)
BSA	Bovine Serum Albumin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
DNCB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzol, Sigma Aldrich, Hamburg (D)
DNFB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, Sigma-Aldrich, Hamburg (D)
Diphtherie Toxin	Corynebacterium diphtheriae, Calbiochem, San Diego, CA, USA
EDTA	Merck, Darmstadt, (D)

Ethanol	(70 %/100 %)Brüggemann Alcohol, Heilbronn, (D)
Eosin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)
FCS	Foetal Bovine Serum Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich (zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45 min bei 56 °C im Wasserbad erhitzt)
Formaldehydlösung	Roti-Histofix (4,5 %) Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, (D)
Hematoxylin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)
HBSS	Cambrex, Verviers, Belgien
Ketamin	500mg/10ml Injektionslösung Ratiopharm GmbH, Ulm, (D)
Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
NaHCO ₃	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
NaN ₃	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
Olivenöl	Apotheke Des Klinikums der Universität-Mainz, (D)
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
TBS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
TNBS	Picrylsulfonsäure, Sigma, Taufkirchen, (D)
TNCB	2,4,6-Trinitro-1-Chlorbenzol, VeZerf Laborsynthesen GmbH, Idar-Oberstein, (D)
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, (D)
Tween 20	Sigma, Taufkirchen, (D)
Xylazin	2 %, (Rompun) 25ml, Bayer Healthcare, Leverkusen, (D)
Xyol	Baack, Schwerin, (D)

2.1.3 Kit-Systeme

ELISA

Artikel

Mouse IL-2
 Mouse IL-17
 Mouse INF- γ

Firma

OptEIA™ Set, Becton Dickinson, Heidelberg, (D)
 Ready Set Go! Set, eBioscience, San Diego, CA, USA
 Ready Set Go! Set, eBioscience, San Diego, CA, USA

MACS Zell-Anreicherung

Artikel

CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells
 CD11c⁺ Micro Beads

Firma

MACS System (mouse); Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, (D)
 MACS System (mouse); Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, (D)

Immunhistologie

Artikel

TSA Cy3
 TSA Cy5

Firma

TSA Fluorescein System, Perkin Elmer, (D)
 TSA Fluorescein System, Perkin Elmer, (D)

Intrazelluläres Foxp3-Detektions-Kit

Artikel

Foxp3 Staining Set

Firma

Anti-mouse Foxp3 Staining Set, eBioscience, San Diego, CA, USA

2.1.4 Antikörper

Artikel

B220 (Klon: RA3-6B2)
 CD4 (Klon: G K1.5)
 CD8a (Klon: 53-6.7)
 CD11c (Klon: N418)
 CD16/32 (Fc-Block; Klon: 93)
 CD25 (Klon: 3C7)
 CD45.2 (Klon: 104)
 CD45.1 (Klon: A20)
 CD90.2 (Klon: 53-2.1)
 Foxp3 (Klon: FJK-16s)

Firma

eBioscience, San Diego, CA, USA
 Biosciences Heidelberg, (D)
 eBioscience, San Diego, CA, USA
 eBioscience San Diego, CA, USA
 eBioscience, San Diego, CA, USA
 Biosciences Heidelberg, (D)
 eBiosciences San Diego, CA, USA
 eBiosciences San Diego, CA, USA
 eBioscience, San Diego, CA, USA
 eBioscience, San Diego, CA, USA

Depletions-Antikörper**Artikel**

Anti-CD25 mAb (Klon: PC61)
Anti-IgG

Firma

AG Schild, Institut für Immunologie, Mainz, (D)
Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA,
USA

2.1.5 Medien & Puffer

10x PBS	402 g NaCl und 69 g NaH ₂ PO ₄ *1 H ₂ O mittels H ₂ O _{dest} auf 5 L aufgefüllt pH-Wert = 6,6
1x PBS	hergestellt aus 10 x PBS pH = 7,2
Erylyse-Puffer	ACK Lysing Buffer, Cambrex, Belgien
Abstopplösung (ELISA)	2 N H ₂ SO ₄
Assay-Diluent (IL-2/4/10 ELISA)	10 % FCS in 1x PBS, pH-Wert 7,0
Assay-Diluent (IFN- γ -ELISA)	0,1 % BSA; 0,05 % Tween-20 in TBS,
pH-Wert 7,2 - 7,4	
Betäubung	24 % Katemin; 8 % Rompun in 1x PBS
Carbonatpuffer (IL-2 ELISA)	0,1 M Carbonatpuffer (8,4 g NaHCO ₃ ; 3,56 g Na ₂ CO ₃) in 1L H ₂ O bidest, pH-Wert 9,5
FACS-Puffer	1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5% BSA
Farbsubstratlösung (ELISA)	TMB Substrate Reagent Set, BD Pharmingen TM, (D), das Substrat A (Tetramethylbenzidin) mit dem Substrat B (H ₂ O ₂) im Verhältnis 1:1 mischen.
Insulin	Levemir (Insulin detemir), Novo Nordisk Bagsvaerd, Dänemark
MACS Puffer	1x PBS + 5 mM EDTA + 0,5 % FCS
Normales Maus Serum	Normales Maus Serum (NMS), Harlan, Rossdorf, (D)
TNBS-Lösung	10 mM TNBS in HBSS, pH-Wert = 7,2
Trypanblau-Lösung	0,04 % Trypanblau in 1x PBS
Wasch-Puffer (ELISA)	0,05 % Tween-20 in 1x PBS

2.1.5.1 Zellkulturmedium

Komplettes RPMI-Medium wird immer frisch angesetzt und bei 4°C gelagert:

RPMI 1640	500 ml	Cambrex, Verviers, Belgien
Hepes	1 % (v/v)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, (D)
nicht-essentielle Aminosäuren	1 % (v/v)	Cambrex, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)	Cambrex, Verviers, Belgien
L-Glutamin	1 % (v/v)	Cambrex, Verviers, Belgien
β -Mercaptoethanol	50 mM	Sigma, Taufkirchen, (D)

2.1.6 Versuchstiere

Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 Wildtyp, IL10^{-/-} (C57BL/6 Hintergrund), DEREK Mäuse (Foxp3-DTR-GFP) (C57BL/6 Hintergrund), LY5.2 (CD45.2) (C57BL/6 Hintergrund), Ly5.1 (CD45.1) (C57BL/6 Hintergrund) und non obese diabetic (NOD-Mäuse) wurden verwendet. Diese wurden von der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg Universität oder der Anbieter Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich), Harlan (Rossdorf (D)), Jackson Laboratories (Sulzfeld, (D)) bezogen. Falls nicht anders angegeben lag das Alter bei Versuchsbeginn zwischen 6 und 12 Wochen. Die Tiere werden in keimarmen Räumen (SPF) der zentralen Tierhaltung der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet und gehalten. Die Tiere erhalten Futter und Wasser *ad libitum*. Eine Genehmigung der Aufsichtsbehörde lag für alle Tierversuche vor.

2.2 Methoden

2.2.1 CHS/NZT Versuchsdurchführung

2.2.1.1 CHS/NZT-Protokoll

Für die Induktion einer NZT im CHS Modell werden die Mäuse am Abdomen und Rücken rasiert. Für die Induktionsphase der NZT werden die Mäuse 10 x an jedem anderen Tag, auf immer wechselnden Hautarealen durch epikutanes Auftragen von 4,5 µg TNCB gelöst in 15 µl Aceton Olivenöl (AOO; Verhältnis 3:1) behandelt. Die CHS dient als Kontroll-Gruppe und erhält in dieser Zeit 10 x 15 µl reines AOO. Darauf folgt die Effektorphase der NZT in der 24 h nach der letzten Tolerisierung, jeder Maus 450 µg TNCB (Sensibilisierungsdosis) gelöst in 15 µl AOO (3:1) auf ein noch unbehandeltes Hautareal aufgetragen wird. 5 Tage nach der Sensibilisierung wird die Entzündungsreaktion ausgelöst (Auslösung). Zunächst wird die Dicke des rechten Ohres mittels einer Mikrometerschraube bestimmt. Darauffolgend werden 45 µg gelöst in 15 µl AOO auf das rechte Ohr aufgetragen. 24 h nach Induktion der Auslösung wird die Ohrdicke erneut bestimmt und aus der Differenz ergibt sich die Ohrschwellung der verschiedenen Gruppen. Anschließend werden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet und Organe für weitere *in vitro* Untersuchungen entnommen.

2.2.1.2 *In vivo*-Parameter – Ohrschwellung

Die vor und nach der Auslösung der Entzündung bestimmte Ohrdicke (mittels Mikrometerschraube; (siehe 2.2.1.1)), wird wie folgt ausgewertet:

$\Delta \text{mm} \cdot 10^{-2} = \text{Ohrdicke 24 h nach Auftragen der Entzündungsreaktion} - \text{Ohrdicke vor Auftragen der Entzündungsreaktion}$.

2.2.2 Colitis Versuchsdurchführung

2.2.2.1 Colitis-Protokoll

Wie in dem CHS/NZT-Protokoll ist auch das Colitis-Protokoll in unterschiedliche Phasen unterteilt (siehe 2.2.1.1). In der ersten Phase werden die Mäuse in verschiedene Gruppen aufgeteilt (Colitis, epikutane NZT, orale NZT). Der epikutanen NZT Gruppe wird 8-10 x an

jedem zweiten Tag auf verschiedene Areale der rasierten Haut 4,5 µg TNBC gelöst in 15 µl AOO appliziert. Die Colitis Gruppe erhält während dieser Zeit reines AOO auf die Haut (siehe 2.2.1.1). Der oralen NZT-Gruppe wird an 10 verschiedenen Tagen 45 µg TNBS gelöst in 200 µl PBS durch eine Sonde oral appliziert. Jede Gruppe besteht (soweit in den Ergebnissen nicht anders beschrieben) aus sieben Mäusen. Jede Maus erhält die jeweilige Lösung zehnmal an jedem zweiten Tag. Nach der Tolerisierungsphase folgt die Sensibilisierung. Sie ist aus dem Protokoll der AG Neurath abgeleitet und erfolgt mit 3000 µg TNBS gelöst in AOO (4:1) auf ein rasiertes unbehandeltes Areal auf dem Rücken der Mäuse. Fünf Tage nach der Sensibilisierung auf den rasierten Rücken wird die Entzündung (Colitis) ausgelöst. Hierzu wird jede Maus zunächst markiert und anschließend mit einer Ketamin- (24 %) /Xylazin- (8 %) Lösung (80 µl pro 10 g Körpergewicht/intra peritoneal (i.p.) gespritzt) betäubt. Die Augen werden mit einer Augensalbe (Bepanthen) bedeckt, um ein Austrocknen der Augen zu verhindern. Die rektale Applikation erfolgt mit einem Schlauch, versehen mit einem Luer-Lock Anschluss für eine 1 ml Spritze mit der jeweiligen Lösung, der vorsichtig 4 cm in die Maus eingeführt wird. Folgend wird die Entzündung ausgelöst, indem 100 µl eines 2500 µg TNBS in 25% EtOH /H₂O rektal appliziert werden. 48 – 72 h nach der Auslösung erfolgt die endoskopische Untersuchung der Mäuse.

2.2.2.2 *In vivo*-Parameter - Endoskopie.

Ein *in-vivo*-Parameter der TNBS-induzierten Colitis ist der sogenannte Endoscore, der mit Hilfe der Mini-Endoskopie erstellt wird. Hierbei wird 72 h nachdem die Entzündungsreaktion ausgelöst wurde, der Maus rektal ein Mini-Endoskop eingeführt, um mittels einer Videokamera Bildsequenzen zu übertragen. Die Schwere der Darmentzündung wird anhand von fünf Parametern analysiert: Beschaffenheit des Stuhls, Verästelung der Gefäße, Fibrinablagerungen, Granularität und Durchsichtigkeit der Darmwand (Abb. 5). Jeder dieser Parameter bekommt je nach Schwere der Entzündung einen Wert zwischen 0 und 3 zugeordnet, wobei 0 keine Entzündungsanzeichen und 3 starke Anzeichen einer Entzündung beschreibt. Diese Werte werden addiert und die Maus erhält somit einen Gesamtwert zwischen 0 und 15, je nach Schweregrad der Entzündungsanzeichen^{108, 126}. Anschließend werden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet und die Organe für weitere *in-vitro*-Untersuchungen entnommen.

Endoskopisches Bewertungssystem der Colitis

Konsistenz des Stuhls	Vaskularität (Veränderung der Gefäße)	Fibrin (sichtbar)	Granularität der Mukosaoberfläche	Verdickung der Colonwand (Durchsichtigkeit)	Gesamtwert (Endoscore)
0 – normal + solide	0 – normal	0 – keins	0 – keine	0 – transparent	
1 – noch geformt	1 – mäßig	1 – wenig	1 – mäßig	1 – mäßig	
2 – nicht mehr geformt	2 – stark	2 – stark	2 – stark	2 – stark	
3 – Formlos + verteilt	3 – Blutungen	3 – extrem	3 – extrem	3 – undurchsichtig	
Einzelwert: 0-3	Einzelwert: 0-3	Einzelwert: 0-3	Einzelwert: 0-3	Einzelwert: 0-3	0-15

Abbildung 5: Endoskopische Einstufung der Colitis (Endoscore).

Die Schwere einer Entzündung wird nach den Parametern Stuhl, Gefäßveränderung, Fibrin, Granularität und Durchsichtigkeit ausgewertet. Jedem Parameter wird ein Wert zwischen 0 und 3 zugeordnet, wobei 0 keine Entzündung und eine 3 Zeichen für eine starke Entzündung ist. Diese Werte werden addiert, so dass jede Maus einen Score zwischen 0 und 15 erhält. Bei einem Score von 0 bis 3 ist keine erhebliche Colitis vorzufinden, bei 3,5-7 eine leichte Colitis; bei 7,5-11 eine mittlere Colitis; bei 11,5-15 eine schwere Colitis

2.2.3 Organentnahmen

2.2.3.1 Gewinnung und Aufreinigung der axillären, inguinalen und zervikalen Lymphknoten

Die axillären, inguinalen und zervikalen LK werden unter der Sterilbank entnommen und in 50 ml Greiner-Röhrchen, die mit 20 ml kompletten RPMI gefüllt sind, überführt. Falls in den Ergebnissen nicht anders beschrieben wird pro Gruppe ein Greiner-Röhrchen verwendet.

2.2.3.2 Gewinnung der mesenterialen Lymphknoten

Die mesenterialen LK werden unter der Sterilbank entnommen und in 50 ml Greiner-Röhrchen, die mit 20 ml kompletten RPMI gefüllt sind, überführt. Falls in den Ergebnissen nicht anders beschrieben wird pro Gruppe ein Greiner-Röhrchen verwendet.

2.2.3.3 Entnahme des Enddarms

Nach der Entnahme der axillären, inguinalen, zervikalen und mesenterialen LK wird die Maus weiter geöffnet und das distale Ende des Enddarms entnommen. Um den Darm zu säubern, wird dieser mittels einer Sonde mit PBS gespült und in Formaldehyd eingelegt, um später für histologische Arbeiten genutzt werden zu können (siehe 2.2.15).

2.2.4 **Aufreinigung der Lymphknoten**

Die zuvor entnommenen LK (siehe 2.2.3.) werden in ein Zellsieb überführt, vorsichtig zerrieben und mit kompletten RPMI gespült, bis sie auf 50 ml aufgefüllt sind. Anschließend werden sie bei 4°C bei 1500 rounds per minute (rpm) für 10 min zentrifugiert, um gewaschen zu werden. Der Überstand wird verworfen. Die Erythrozyten in der Zellsuspension werden mit 1 ml ACK Lysing Puffer zerstört (5 min). Die Erythrozytenlyse wird durch Auffüllen mit kompletten RPMI auf 50 ml abgestoppt. Die aufgebrochenen Zellen werden gewaschen (4°C; 1500 rpm; 10 min). Der Überstand wird verworfen und in 20 ml kompletten RPMI resuspendiert. Aufgrund der Empfindlichkeit ist das Protokoll zur Aufreinigung der LK für die mesenterialen LK modifiziert worden. Nachdem die LK in ein Zellsieb überführt und zerrieben wurden, werden sie mit kompletten RPMI gespült und bis auf 25 ml aufgefüllt. Anschließend werden sie zentrifugiert (4°C; 1500 rpm; 10 min) und folgend in 5ml kompletten RPMI Medium aufgenommen.

Zum Prüfen der Viabilität und Zählen der Zellen werden aus der Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypan Blau gemischt. 10 µl werden auf eine Neubauer- Zählkammer aufgetragen, unter einem Lichtmikroskop gezählt und auf ihre Vitalität hin geprüft. Der Farbstoff Trypan Blau kann nur Zellen penetrieren, in denen die Integrität der Plasmamembran zusammengebrochen ist. Tote Zellen färben sich somit blau und werden nicht mitgezählt. Die Berechnung der Zellen geschieht wie folgt:

Zahl der Zellen = gezählte Zellen (Z) x aufgenommene Flüssigkeit x Verdünnungsfaktor x
Kammerfaktor

z. B.: $(Z) \times 20 \times 10 \times 10^4 = \text{Zahl der Zellen.}$

Die Zellen der mesenterialen LK werden ebenfalls unter einem Lichtmikroskop gezählt und ebenfalls auf die Vitalität hin geprüft. Da in diesem modifizierten Protokoll keine Erylyse stattfindet, ist darauf zu achten, dass Erythrozyten nicht mitgezählt werden.

2.2.5 **Hapten-spezifische Restimulierung**

Um die Hapten-spezifische Aktivierung der T-Zellen zu testen, beispielsweise durch eine gesteigerte Zytokinausschüttung oder eine Proliferation, wird ein Teil der Zellen entweder mit TNBS-Lösung Hapten-spezifisch stimuliert. Ein Teil der Zellen wird gewaschen (4°C; 1500 rpm; 10 min), in 10 mM TNBS/HBSS aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Pro 1×10^7 Zellen werden 1 ml 10 mM TNBS/HBSS hinzugefügt. Die Abstopfung der Haptenisierung erfolgt durch Auffüllen der 50 ml Greiner-Röhrchen mit kompletten RPMI. Die Zellen werden anschließend 2 x gewaschen (4°C ; 1500 rpm; 10 min).

Nach dem Waschen werden die Zellen in 10 ml kompletten RPMI aufgenommen und mittels Trypan Blau Färbung auf die Viabilität hin geprüft und gezählt (siehe 2.2.4.1). Es werden 6×10^6 Zellen entnommen und nochmals gewaschen. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets in 600 μl RPMI mit 2 % NMS aufgenommen. Die Zellen werden in 200 μl /Well als Dreifachansatz nebeneinander angesetzt. In die restlichen Reihen der Rundbodenplatte werden 100 μl komplettes RPMI mit 2 % NMS vorgelegt. Durch Heruntertitrieren werden 1 : 2 Verdünnungsreihen angelegt. Die letzte Reihe dient als Medium-Kontrolle. Alle Wells werden mit kompletten RPMI mit 2 % NMS auf 200 μl aufgefüllt. Anschließend werden die Zellen für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert.

Als Kontrolle dienen 6×10^6 nicht-Hapten-spezifische restimulierte Zellen (siehe 2.2.4), die ebenfalls in 1 : 2 Verdünnungsreihen angelegt und in RPMI + 2 % NMS kultiviert werden.

2.2.6 T-Zell-Proliferationstest

Das Ausmaß der T-Zell-Proliferation kann durch einen Proliferationstest ermittelt werden. Hierbei wird radioaktiv markiertes [^3H]-Thymidin dem Kulturmedium hinzugefügt. Das Thymidin wird in neu synthetisierte DNA eingebaut und kann später mit Hilfe eines β -Szintillationscounter ausgewertet werden. Nach 24 h Kultur im Brutschrank werden die LK-Zellen mit 1 μCi ^3H -Thymidin [Methyl- ^3H] gepulst, d.h. pro Well wird 1 Tropfen einer 1:10 verdünnten ^3H -Thymidin/RPMI-Lösung hinzugegeben (entspricht 37 kBq/well). Folgend werden die Zellen für weitere 16 bis 18 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen geerntet. Hierbei werden mit Hilfe eines Zellerntegerätes aus Glasfaser die Zellen auf einen Filter gespült, während überschüssiges ^3H Thymidin und Medium entfernt wird. Anschließend wird der Filter für 15 min getrocknet. Anschließend werden 10 ml Szintillationsflüssigkeit auf den Filter gegeben und in eine Plastikfolie eingeschweisst. Die Szintillationsflüssigkeit ist in der Lage, Zerfallsenergie über die Szintillatormoleküle aufzunehmen. Durch die Übertragung der Energie auf die Szintillatormoleküle werden die Elektronen dieser Moleküle in ein höheres, instabiles Energieniveau gesetzt. Durch die Rückkehr auf das Ursprungsenergieniveau wird Energie in Form von Photonen frei, die von dem β -Szintillationscounters in Form von Lichtblitzen detektiert (counts per minute; cpm) werden und der Counter so die eingebaute Radioaktivität indirekt messen kann.

2.2.7 T-Zell-Anreicherung

Zellpopulationen können mittels Microbeads (Miltenyi Biotec) aus LK-Zellsuspensionen isoliert werden. Bei den Microbeads handelt es sich um superparamagnetische Polyesterolkügelchen an deren Oberfläche Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper erkennen auf den Zelloberflächen spezifisch die entsprechenden Antigene. Die aufgereinigten Zellsuspensionen (siehe 2.2.4) werden dazu mit den Microbeads inkubiert und folgend über eine mit Eisenpartikeln gefüllte MACS-Zellseparationssäule gegeben, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. In den folgenden Schritten werden die Säulen gespült und unmarkierte Zellen können durch die Säulen ungehindert hindurchfließen, während die Zellen, die zuvor mit den Microbeads markiert wurden in der Säule haften bleiben. Erst nachdem man die Säule aus dem Magnetfeld nimmt kann man sie herauspülen. Durch die spezifische Markierung kann man Zellen positiv anreichern (d.h. die letztendlich gewollte Zielzelle wird markiert und verbleibt in der Säule) oder negativ anreichern (d.h. alle Zellen außer den jeweiligen Zielzellen werden mittels Microbeads markiert und in dem Durchfluss befinden sich schließlich die gewollte Zielpopulation).

2.2.7.1 CD4⁺CD25⁺ Tregs-Anreicherung

Für die Anreicherung von CD4⁺CD25⁺ Tregs wurde das CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) verwendet und laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die wichtigsten Schritte der Zellseparation sind dabei folgende: Aufgereinigte Zellen zunächst mit einem Biotin konjugierten Cocktail bestehend aus folgenden Antikörpern CD8a (Ly-2), CD11b (Mac-1), CD45R (B220), CD49b (DX5) und Ter-119 inkubiert. Zeitgleich werden Microbeads hinzugegeben, die mit einem Anti-Biotin Antikörper konjugiert sind. Die Zellen werden über eine LD Säule gegeben, wodurch alle nicht-CD4⁺ T-Zellen in der Säule haften bleiben. Der Durchfluss, der CD4⁺ T-Zellen enthält, wird aufgefangen. Die CD4⁺ T-Zellen werden mit einem PE-markierten anti-CD25 Antikörper (Klon: 7D4) sowie Microbeads, die an einen anti-PE Antikörper gekoppelt sind, inkubiert. Diese werden über die Säule gegeben. In der Säule bleiben nun die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen haften und können, nachdem sie von dem Magnetfeld separiert wurden, aus der Säule gedrückt werden. Ein Teil der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wird durchflusszytometrisch analysiert, um die Reinheit der Zellen zu überprüfen. Der Rest der Zellen kann dann für weitere Versuche genutzt werden. Waschschrte und Inkubationszeiten werden genau nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.8 Färbung der Tregs mittels Calcein

Calcein AM (Invitrogen, Darmstadt) ist ein Farbstoff, der sich von der initial gefärbten Zellpopulation über gap junctions auf andere Zellen überträgt. Dadurch ist es möglich, eine direkte Zellinteraktion zweier Zellpopulationen zu untersuchen. 1×10^7 aufgereinigte $CD4^+CD25^+$ Tregs (siehe 2.2.7.1) werden für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank mit dem Farbstoff Calcein AM inkubiert. Die Konzentration beträgt $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Calcein pro 5×10^6 Zellen/ ml . Im Folgenden wird die Zellpopulation zweimal gewaschen und gezählt. 1×10^4 Zellen werden durchflusszytometrisch untersucht, um die funktionierende Färbung und Aufreinigung der $CD4^+CD25^+$ Tregs zu gewährleisten. $2-3 \times 10^6$ in $100 \mu\text{l}$ PBS Calcein $^+CD4^+CD25^+$ Tregs werden i.v. in die Mäuse injiziert.

2.2.9 Protokoll zur Depletion $CD4^+CD25^+$ Tregs mittels PC61

Für die Depletion $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurde der anti-CD25 Antikörper PC61 verwendet. Hierzu wurde der Antikörper an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit $75 \mu\text{g}$ pro Maus i.p. injiziert. Kontroll-Tiere erhielten dieselbe Menge an IgG-Antikörper als Kontrolle. Die Depletion und Rückkehr der $CD25^+$ T-Zellen ist transient und wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse kontrolliert.

2.2.10 Protokoll zur Depletion von Foxp3^+ Zellen mittels Diphtherie Toxin in DEREГ-Mäusen

DEREG-Mäuse können durch die Gabe von Diphtherie Toxin (DT) von ihren Foxp3^+ Zellen depletiert werden. Hierzu wurden DEREГ Mäusen mit $1 \mu\text{g}$ DT am Tag 1 und 3, gelöst in $150 \mu\text{l}$ PBS, i.p. injiziert. Kontroll-Tiere erhielt nur PBS. Die Depletion und Rückkehr der $CD4^+CD25^+\text{Foxp3}^+$ Tregs wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert.

2.2.11 Adoptiver Transfer

Aufgereinigte Zellpopulationen wurden intra-venös injiziert. Hierzu wurde die jeweilige Zellpopulation in $100-150 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und in die Schwanzvene oder in die Fußballen injiziert. Durch die Wärme einer Rotlichtlampe wurden die Venen hierbei vergrößert, welches die Injektion erleichtert.

2.2.12 Durchflusszytometrische Untersuchungen: Prinzip

Zur Ermittlung der Expressionsraten verschiedener Moleküle wurde eine fluoreszenzeserologische Untersuchung (Durchflusszytometrie; engl.: Fluoreszenz Activated Cell Sorting = FACS) der jeweiligen Zellen am Durchflusszytometer durchgeführt. Markierte Zellen werden in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Die gestreute und reflektierte Strahlung, sowie emittiertes Licht der fluoreszenzmarkierten Antikörper, wird mit Hilfe von Linsen (Fokussierung des Lasers), Spiegeln und Filtern an Detektoren weitergeleitet und gibt Aufschluss über die Zellgröße, Granularität und Spezifität der gebundenen Antikörper.

Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter; FCS) ist ein Maß für die Beugung des Lichts. Es steht proportional zu der Zellgröße und man kann Aussagen über die Größe der Zelle treffen. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter; SSC) ist ein Maß für die Granularität bzw. die Komplexität der Zelle, da das Auftreffen des Lichts an Grenzflächen innerhalb der Zelle zu einem veränderten Brechungsindex führt. Sind die Zellpopulationen noch mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper spezifisch gefärbt, kann das emittierte Licht ebenfalls detektiert werden. Der Fluorezenzfarbstoff wird durch einen monochromatischen Laserstrahl mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt. Durch diese Lichtabsorption gelangen die Elektronen der Fluorochrome in energetisch höhere Energieniveaus. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen aus einem angeregten, instabilen Energieniveau auf das Ursprungsniveau zurück und geben dabei Energie in Form von Photonen ab. Diese Emissionswellenlänge ist für jedes Fluorochrom spezifisch und kann dann von dem Photomultiplier detektiert werden. In dieser Arbeit wurde als Durchflusszytometer das BD LSR II (BD Bioscience) verwendet und die Daten anschließend mit der DIVA 6.0 Software ausgewertet.

2.2.12.1 Durchführung Standard-Durchflusszytometrische-Messung

Nach dem Zählen der aufgereinigten Zellen (siehe 2.2.4) werden 1×10^6 Zellen für eine Anfärbung von Oberflächenmolekülen verwendet. Die Zellen werden mit 120 μ l FACS-Puffer gewaschen (4°C; 1500 rpm; 4 min) und anschließend für 20 min mit 20 μ l Fc-Block inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Folgend werden die Zellen erneut gewaschen (4°C; 1500 rpm; 4 min) und mit dem jeweiligen direkt Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper in 20 μ l FACS Puffer für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen werden 2 x mit 120 μ l FACS-Puffer gewaschen (4°C; 1500 rpm; 4 min), um überschüssige Antikörper zu entfernen. Die Zellen können nun noch intrazellulär gefärbt werden (siehe 2.2.12.2). Folgend

werden die Zellen in 120 µl FACS Puffer aufgenommen, in FACS-Rundbodenröhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.12.2 Durchführung Intrazelluläre Durchflusszytometrische Messung von Foxp⁺ T-Zellen

Nach der Färbung der Oberflächenmoleküle wurde für die intrazelluläre Anfärbung von Foxp³⁺ T-Zellen das Foxp3 Staining Kit (ebioscience) nach Händlerangaben verwendet. Hierzu werden die Zellen zunächst fixiert (75 µl FixPerm, 30 min bei 4°C), anschließend permeabilisiert (zweimaliges Waschen (4°C; 1500 rpm; 4 min) mit je 150 µl Permwasch) und mit dem Antikörper im Dunkeln für 30 min bei 4°C inkubiert. Folgend werden die Zellen erneut 2 x mit Permwasch gewaschen (4°C; 1500 rpm; 4 min) und anschließend für die durchflusszytometrische Analyse in 120 µl FACS Puffer aufgenommen und in FACS Rundbodenröhrchen überführt.

2.2.13 ELISA: Prinzip

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bietet die Möglichkeit, biologisch aktive Substanzen nachzuweisen. Durch einen Farbumschlag in dem sogenannten „Sandwich-ELISA“ kann die Zytokinausschüttung der Zellkultur bestimmt werden. In dieser Methode wird zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem Capture-Antikörper (CpA) beschichtet. Um unspezifische Verbindungen zu vermeiden, wird ein Blockierungspuffer hinzugefügt. Folgend werden die zu bestimmenden Proben aufgetragen, die mit dem an die Platte gebundenen Antikörper eine Verbindung eingehen. Nach einem Waschschrift, der überschüssiges Probenmaterial entfernt, wird ein zweiter - für auf dem Antigen weiteres Epitop spezifischer - Antikörper (Detektionsantikörper – DA), hinzugefügt. Dieser ist auch an das Reaktionsenzym (ER) Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Überschüssiger DA wird durch einen Waschschrift wieder entfernt und anschließend der Farbumschlag durch Zugabe eines Substrates gemessen. Das Reaktionsenzym produziert hierbei die Farbe, die proportional zu der Menge des Zytokines steht, das eine Verbindung mit dem CpA eingegangen ist. Eine Standardkurve, welche auf bekannten Konzentrationen eines Antigens basiert, wird erstellt. Mithilfe dieser Kurve wird die unbekannte Konzentration der Proben bestimmt. Dies erfolgt photometrisch mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers.

2.2.13.1 ELISA: Durchführung

Vor und nach der Hapten-spezifischen Restimulation (siehe 2.2.4 + 2.2.5) werden $2,4 \times 10^7$ Zellen pro Gruppe auf eine 96-Well-Platte verteilt (1×10^6 Zellen/ Well), auf 200 μ l komplettes RPMI + 2 % NMS aufgefüllt und anschließend im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach 24 h, 48 h und 72 h werden die Überstände in 0,5 ml Gefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

Zur Zytokinbestimmung wurden für den IL-17- und IFN- γ -ELISA (ready-set-go! eBioscience) sowie IL-2 ELISA (OptEIA™ Set, Becton Dickinson) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die ELISA-Sets können in ihrer Vorgehensweise, in den Konzentrationen der verwendeten Substanzen, sowie in den zu verwendenden Volumina Lot-spezifisch abweichen. Daher ist es erforderlich, dass die entsprechende ELISA-Anleitung beachtet und befolgt wird. Die Sensitivität beim IL-2- und IL-17 ELISA liegt bei 10 ng/ml und für den IFN- γ -ELISA bei 50 ng/ml.

Die Vorgehensweise wurde dabei wie folgt durchgeführt: Die ELISA-Platte wird mit dem CpA beschichtet und feucht über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag werden die beschichteten Platten mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend durch Ausklopfen getrocknet. Die Wells werden nun mit Blockierungspuffer (Assay Diluent) versiegelt und 1-2 h feucht bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Folgend werden die Wells mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Anschließend werden jeweils 100 μ l der 1 : 2 verdünnten Proben (mit dem jeweiligen Medium) bzw. die zuvor angesetzten Standard-Verdünnungen (1 : 2 Verdünnungsreihe) als Doppelbestimmung in die Wells pipettiert. Nach der Inkubation bei 4°C über Nacht werden die Platten erneut dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion der Zytokinausschüttung von IFN- γ und IL-17 wird für 1 h DA aufgetragen. Die Platten erneut gewaschen und es wird für 1 h ER aufgetragen. Bei IL-2 werden nun ein DA und ER in einem Arbeitsschritt aufgetragen und für 2 h inkubiert. Alle Platten während der DA und ER Dunkel versiegelt und in feuchter Umgebung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen werden bei IL-2 pro Well 100 μ l der Farbsubstratlösung (Farbreagenzkomponenten A und B/Verhältnis 1:1) pipettiert, bei IL-17 und IFN- γ werden 100 μ l Substrat Solution (TMB) aufgetragen. Anschließend inkubieren die Platten bei RT kurze Zeit, wobei eine direkte Lichtexposition zu vermeiden ist. Wenn sich eine Blaufärbung zeigt, wird die Reaktion mit 2N Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt (50 μ l/Well). Innerhalb von 30 min erfolgt die Absorptions-Messung bei 450 nm und damit die Bestimmung der Zytokinkonzentration am Photometer.

2.2.14 Histologie

Zunächst werden die zuvor in Formalin fixierten Därme (siehe 2.2.3.3) über Nacht entwässert. Hierzu wird zunächst das Fixierungsmittel mit Leitungswasser ausgewaschen. Danach erfolgt die eigentliche Entwässerung mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe mit Isopropanol (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 100 %) für jeweils 3 min. Daraufhin erfolgt eine Inkubation des Darms mit Xylol; der Darm wird anschließend in heißes Paraffin eingebettet. Die Einbetttemperatur des verwendeten Paraffins beträgt 57°C. Aus dem heißen Paraffin werden die Gewebe in Blöcke gegossen und sind nach dem Erkalten fertig zum Schneiden. Zum Anfertigen der Schnitte auf 5 µm wird ein Mikrotom benutzt. Die Schnitte werden anschließend auf einen Objektträger aufgezogen. Im Anschluss werden die Schnitte mittels HE-Färbung (Hematoxylin/Eosin-Färbung) gefärbt. Dazu werden die Schnitte in typischer Weise entparaffiniert und rehydrasiert (absteigende Alkoholreihe für je 3 min pro Konzentration). Die Schnitte werden nun für 3 min mit Hämatoxylin gefärbt und mit Leitungswasser abgespült. Als nächstes werden die Schnitte 3 min mit Eosin gefärbt und wieder mit Leitungswasser abgespült. Anschließend werden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis hin zum Xylol entwässert. Durch einen Tropfen Einschluss-Medium und Bedeckung mit einem Deckglas, werden die Schnitte dauerhaft konserviert. Durch die Färbung erscheinen Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rosa. Fasern erscheinen ebenfalls rosa. Die Auswertung der Schnitte erfolgt durch eine mikroskopische Analyse der Darmschnitte. Zur Bestimmung des Schweregrades der Entzündung wird näher auf die Einwanderung von inflammatorischen Zellen, Beschädigung oder Verdickungen der Darminnenwand, die Gefäßdichte oder der Verlust an Goblet-Zellen eingegangen¹⁰⁸.

Für die Immunfluoreszenzfärbung der poplitealen LK werden die LK mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Zum Schneiden der Organe wurde diese auf Metallprobenplättchen mit Gefriereinbettmedium (Tissue-Tek) aufgebracht und in einem Kryostat bei -20°C geschnitten (5 µm) und mit 4 % Paraformalehyd fixiert. Die immunhistologische Färbung und Analyse fand in Kooperation mit der AG Waisman statt. Hierzu wurden die Schnitte nach dem Herstellerprotokoll TSA Cy3, TSA Cy5, TSA Fluorescein System (Perkin Elmer) behandelt. Die Schnitte wurden hierbei über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag 3 x für 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT mit biotinylierten, sekundären Antikörper inkubiert, erneut 3 x mit PBS gewaschen und als Kernfärbung mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt. Für die Auswertung wurde das Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 (Olympus) verwendet.

2.2.15 **Diabetes-Modell der NOD-Maus**

Die NOD-Maus entwickelt spontan ab einem Alter von 6 Wochen einen Diabetes mellitus Typ I. Das Auftreten der Erkrankung ist stark von dem Geschlecht der Maus abhängig. Ca. 80 % der Weibchen und nur 20 % der Männchen sind nach 30 Wochen diabetisch¹¹⁸. In dieser Arbeit wurden nur weibliche Versuchstiere in die Versuche eingeschlossen.

2.2.15.1 **Blutzuckerbestimmung**

Bei den NOD-Mäusen wird 1 x wöchentlich ab der 4ten Lebenswoche der Glukosewert im Blut bestimmt. Hierzu werden die Mäuse unter eine Rotlichtlampe gesetzt, um die Durchblutung zu erhöhen, und an der Schwanzvene mit einer Kanüle punktiert. Der Blutstropfen wird von dem Teststreifen am Blutzuckermessgerät eingezogen und startet die Messung automatisch, wenn genügend Blut vorhanden ist. Die Werte werden in mg/dl angezeigt. Eine Maus gilt als diabetisch, wenn 2 x eine Messung über 250 mg/dl beträgt.

2.2.15.2 **Behandlung mit Insulin**

Wird eine NOD-Maus als diabetisch eingestuft, wird sie im weiteren Verlauf mit Insulin behandelt, um Begleiterscheinungen der diabetischen Erkrankung (Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyurie) abzuschwächen und ein Absterben zu verhindern. Hierzu wird Langzeitinsulin 1:5 mit NaCl gemischt und 100 µl pro Maus 3 x wöchentlich subkutan injiziert.

2.2.16 **Statistik**

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten Student's t-Test bzw. durch einen Wilcoxon-Test ermittelt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant dargestellt und in den entsprechenden Figuren angegeben: (n.s.= nicht signifikant, *: p=0,05, **: p = < 0,01, ***: p = <0,001).

ERGEBNISSE

3.1 Die Funktion von Tregs und CD11c⁺ DCs in der Induktionsphase der NZT

3.1.1 Einfluss der NZT auf eine Kontakthypersensibilitätsreaktion (CHS)

Durch Studien der Arbeitsgruppe Steinbrink wurde bereits bewiesen, dass die epikutane und orale Applikation subimmunogener Mengen eines Kontaktallergens, wie z.B. TNCB, zu einer NZT-Induktion führt und so die Entwicklung einer CHS verhindert werden kann^{74, 75, 78} (siehe 1.1.2). Zur Verständlichkeit wird hier ein Standardversuch gezeigt, der die Auswirkung einer Induktion der epikutan induzierten NZT auf die CHS veranschaulicht. Hierzu wurde das etablierte Standardprotokoll der NZT herangezogen (Abb. 6). Die Mäuse werden in Gruppen unterteilt und erhalten zehnmal auf wechselnde Hautareale 4,5 µg TNCB, gelöst in 15 µl Aceton Olivenöl (AOO) bzw. 15 µl reines Lösungsmittel (AOO) durch eine epikutane Applikation. Gefolgt von einer epikutanen Sensibilisierung mit 450 µg TNCB und Auslösen der Entzündungsreaktion mit 45 µg TNCB auf das rechte Ohr.

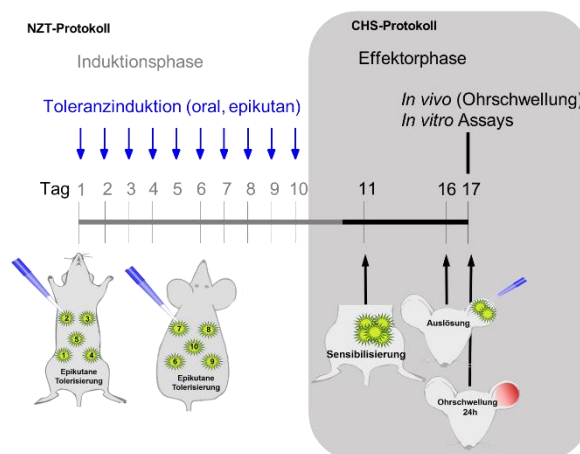


Abbildung 6: Schematisches Protokoll zur Induktion einer NZT und CHS.

Für die Induktion einer NZT werden Mäuse am Abdomen und Rücken rasiert und 8-10 x an jedem zweiten Tag mit 4,5 µg TNCB behandelt. Zur Kontrolle erhält eine Gruppe reines Lösungsmittel (AOO). 24 h nach der letzten Tolerisierung erfolgt die Sensibilisierung mit 450 µg TNCB in AOO auf eine noch unbehandelte Stelle am Abdomen. 5 Tage nach der Sensibilisierung wird die Ohrdicke gemessen sowie 45µg TNCB auf ein Ohr der Maus aufgetragen (Auslösung). 24 h nach der Auslösung wird die Ohrdicke erneut bestimmt und so die Ohrschwellung festgestellt (*In vivo* Parameter). Außerdem werden die Haut-drainierenden Lymphknoten entnommen für weitere *in vitro* Assays.

Wie deutlich in Abb. 7A zu erkennen ist, haben die Mäuse, die in der Induktionsphase nur mit reinen Lösungsmittel behandelt worden sind, eine CHS (starke Ohrschwellung) entwickelt. Im Vergleich dazu bilden Mäuse, die vor der Sensibilisierung mehrmals 4,5 µg TNCB epikutan erhalten haben (NZT), eine Toleranzinduktion aus und weisen nur eine geringe Ohrschwellung auf (Abb. 7A). Als *in-vitro*-Analyse der Entzündungsreaktion wird der T-Zell-Proliferationstest genutzt. Es ist bekannt, dass T-Zellen nach Hapten-spezifischer Restimulation aus tolerisierten Mäusen eine verminderte Proliferation aufweisen im Vergleich zu T-Zellen, die aus Mäusen stammen, bei denen keine Toleranz induziert, sondern eine CHS ausgelöst wurde (Abb. 7B).

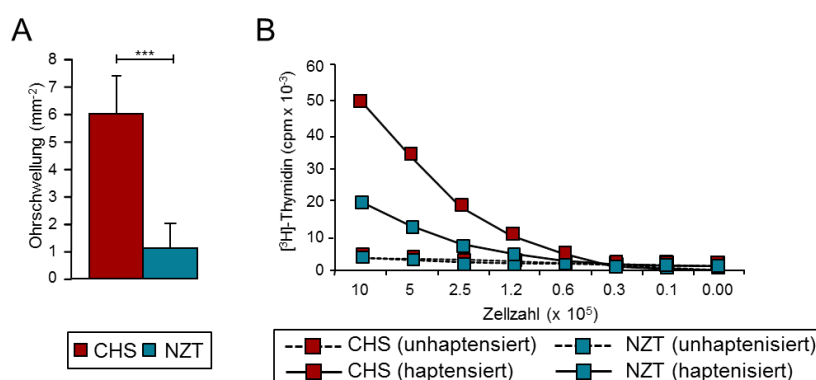


Abbildung 7: Kutane Entzündungsreaktion und T-Zell-Proliferation in der CHS und NZT.

In den Mäusen wird nach dem Protokoll (Abb. 6) entweder durch wiederholte epikutane Applikation von subimmunogenen Dosen TNCB (4,5 µg) eine NZT oder in den Kontroll-Tieren nach Behandlung mit dem Lösungsmittel AOO eine CHS ausgelöst. (A) Mittelwert der Ohrschwellung in mm² (n=5) mit entsprechender Standardabweichung. (B) Messung der T-Zell-Proliferation ohne (- -) und nach Hapten-spezifischer Restimulation (-) nach [³H]-Thymidin-Einbau in die Zellen der axillären, inguinalen und zervikalen LK. (***: p = < 0,001).

3.1.2 Interaktion der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen mit $CD11c^+$ DCs in den Haut-drainierenden Lymphknoten.

Vorherige Arbeiten konnten darlegen, dass $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen als auch tolerogene $CD8^+CD11c^+$ DCs in der Induktionsphase der NZT maßgeblich an der Induktion einer NZT beteiligt sind⁷⁴.

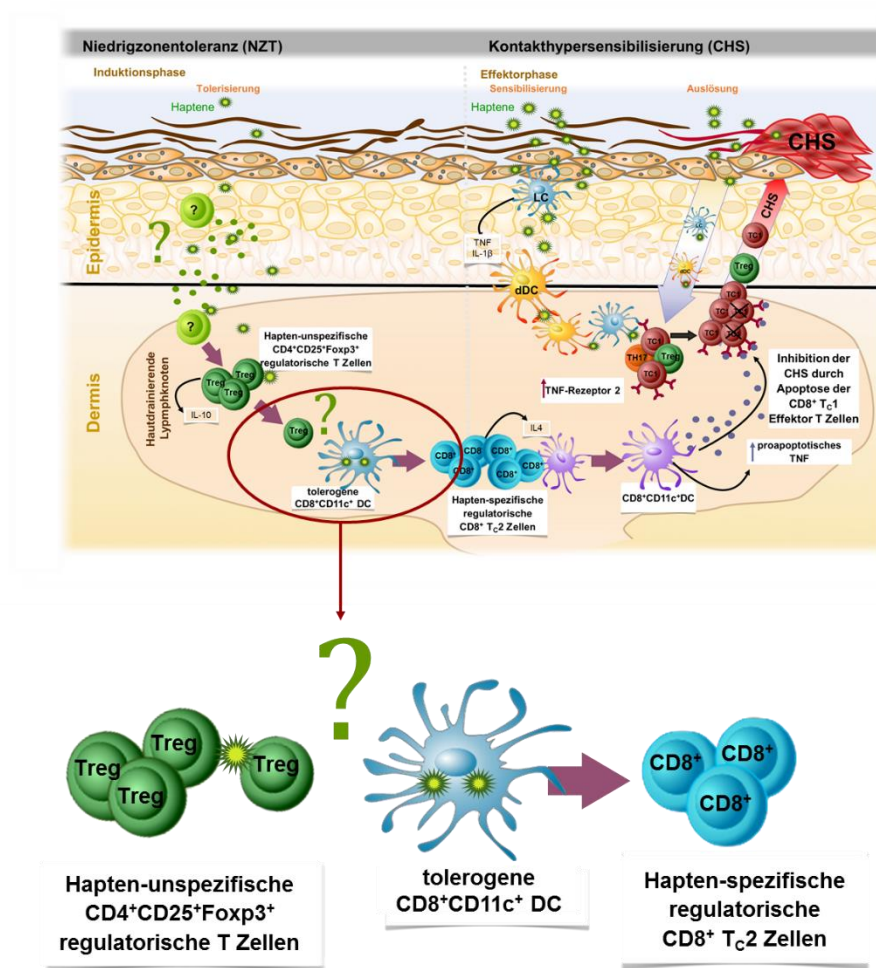


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Fragestellung: Interaktion der Tregs mit $CD8^+CD11c^+$ DCs in der NZT.

Untersucht wird die Interaktion der hapten-unspezifischen Tregs mit den $CD8^+CD11c^+$ DCs in der Induktionsphase der NZT.

Mittels Adoptiver Transfer (AT) Versuche und Immunhistologie in Kooperation mit der AG Jakob (Freiburg) soll eine vermehrte Interaktion der Tregs mit $CD11c^+$ veranschaulicht werden.

Hierzu werden aus zuvor tolerisierten (bzw. lösungsmittelbehandelten als Kontrolle) Ly5.2 Mäusen $CD11c^+$ DCs gewonnen und in naive Ly5.1 WT Mäuse transferiert (Abb. 8). Nach Sensibilisierung werden Immunhistologien der LK angefertigt, um die Interaktion zwischen Ly5.2 DCs und Ly5.1 $Foxp3^+$ T-Zellen zu analysieren (Abb. 9).

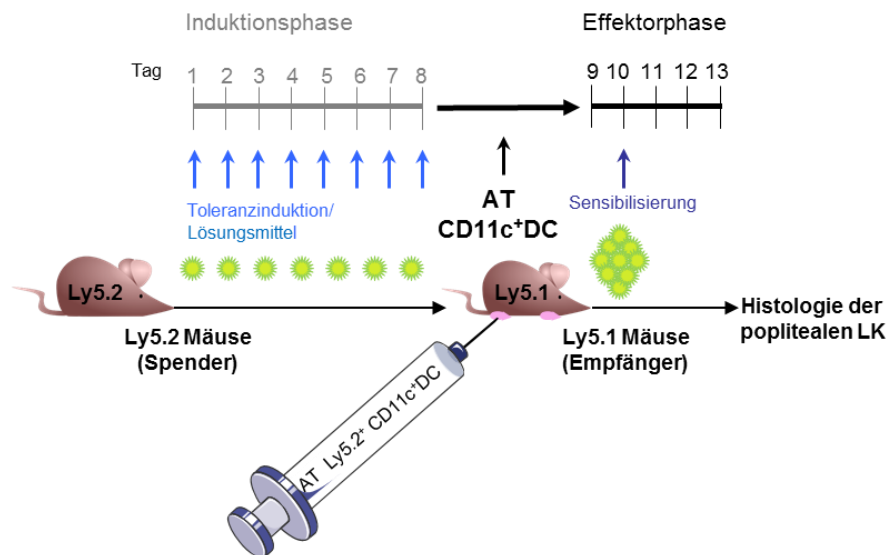


Abbildung 9: Schematisches Protokoll zur Interaktion von Tregs mit CD11c⁺ DCs mittels Immunhistotologie. Ly5.2 Mäuse werden 8 x mit 4,5µg TNCB gelöst in AOO epikutan tolerisiert (NZT) bzw. mit reinem Lösungsmittel (AOO; CHS) behandelt (Tag 1-8)(Spendertiere). An Tag 9 werden Ly5.2⁺CD11c⁺ DCs aus den Spendertieren aufgereinigt und in die Fußsohlen naiver Ly5.1 Mäuse (Empfänger) injiziert (1 x 10⁵ Zellen pro Maus). An Tag 11 erfolgt die Sensibilisierung der Empfängertiere mit 450 µg TNCB. Am Tag 13 werden die poplitealen LK entnommen und immunhistologisch untersucht.

Wie in Abb. 10 zu sehen ist, entsteht eine Clusterbildung der Ly5.2 CD11c⁺DCs (grüne Färbung) und Ly5.1 Foxp3⁺ Tregs (rote Färbung). Außerdem zeigt sich, dass Tregs vermehrt in Kontakt mit DCs aus zuvor tolerisierten Mäusen treten als mit DCs aus lösungsmittelbehandelten Mäusen (Abb. 10A, B). Abb. 10 zeigt hier repräsentativ wie Foxp3⁺ T-Zellen eng mit den injizierten Ly5.2 DCs interagieren. Um sicherzugehen, dass es sich um DCs aus Spendertieren handelt, wurde diese zur Kontrolle außerdem mittels Doppelmarkierung mit einem Ly5.2 Farbstoff bzw. Foxp3⁺ Tregs mit einem Ly5.1 Farbstoff gefärbt, damit die Herkunft sichergestellt werden kann. Die Anzahl der Foxp3⁺ Tregs, die sich in unmittelbarer Nähe der DCs befanden, wurden in 20 repräsentativen histologischen Schnitten ausgezählt (Abb. 10C). Hierbei ist eine signifikant höhere Anzahl der Foxp3⁺ Tregs mit den Ly5.2 DC vorzufinden, die aus tolerisierten Mäusen gewonnen wurden, im Vergleich zu den Zellen aus lösungsmittelbehandelten Tieren (CHS).

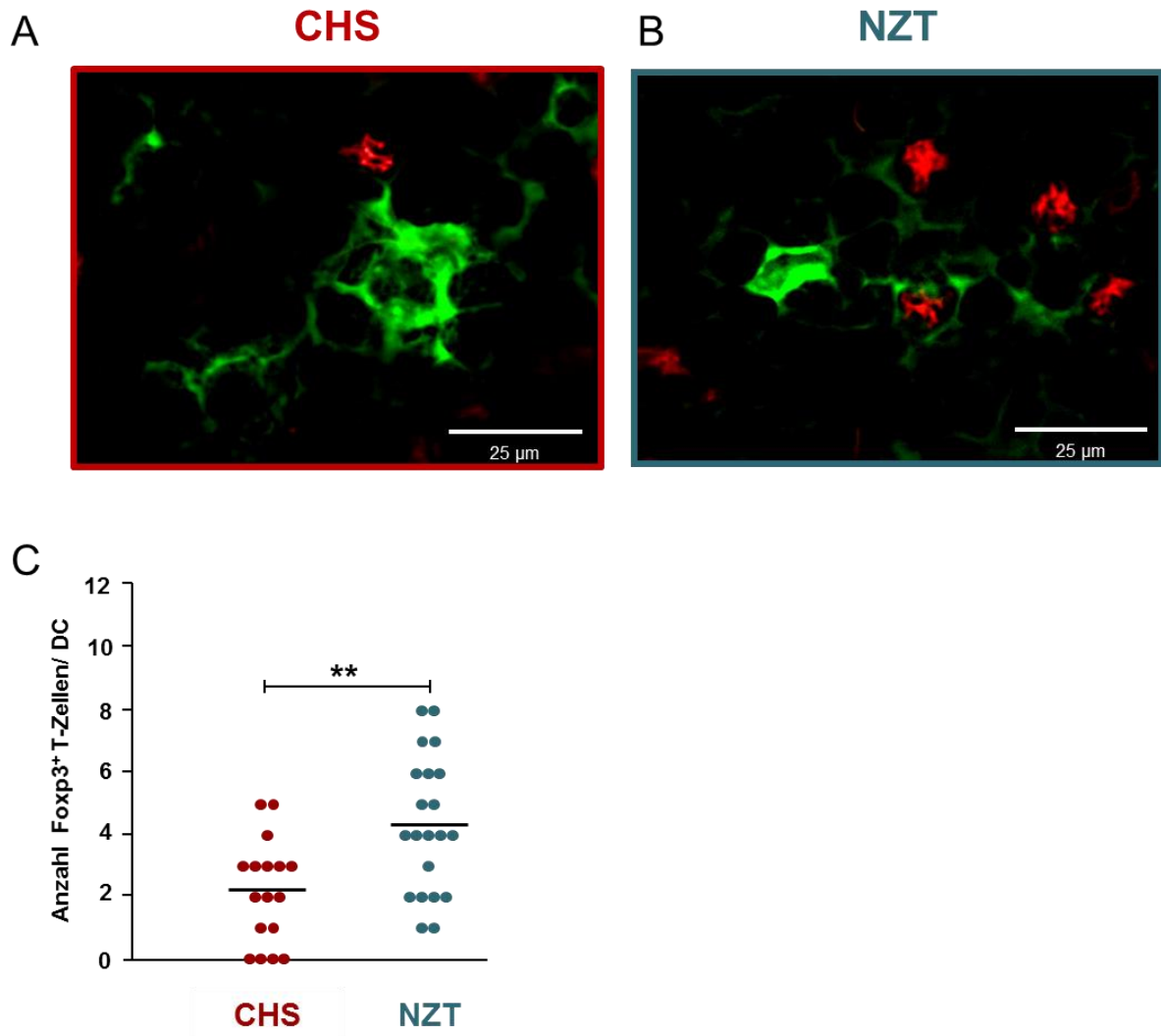


Abbildung 10: Interaktion der Tregs mit CD11c⁺ DCs in den Haut-drainierenden Lymphknoten. Nach dem Transfer der aus tolerisierten oder Kontrolltieren gewonnenen Ly5.2 CD11c⁺ DCs in die Empfängertiere (Ly5.1) wurde 3 Tage nach der Sensibilisierung die poplitealen LK entnommen. Es wurden Schnitte angefertigt und mit Foxp3 intrazellulär die Tregs (rote Färbung) und mit CD11c die DCs (CD11c⁺ DCs (grüne Färbung)) immunhistologisch gefärbt. Dargestellt sind exemplarische Interaktionen von Foxp3⁺ Tregs mit der CD11c⁺ DCs in (A) CHS- und (B) NZT-Mäusen. (C) Durchschnittlichen Anzahl der Interaktionen von Treg mit einzelnen CD11c⁺ DCs in CHS und NZT. Ausgezählt in 20 hochauflösenden Sektionen. (**: $p < 0,01$).

3.1.3 Die Funktion von gap junctions in der Interaktion zwischen Tregs und CD11c⁺ DCs

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Tregs einen direkten Einfluss auf die CD11c⁺ DCs haben und darauffolgend einen tolerogenen Phänotyp ausprägen, der dann auf die Funktion der CD8⁺ T-Zellen der NZT einwirkt. Es ist bekannt, dass Tregs und CD11c⁺ DCs über gap junctions interagieren¹²⁷. Durch eine Färbung mit dem Farbstoff Calcein ist es möglich, Verbindungen die über gap junctions entstehen nachzuverfolgen, da der Farbstoff bei einem Kontakt von einer Zelle auf die nächste übertragen wird^{164, 128}.

Hierzu haben wir CD4⁺CD25⁺Tregs aus tolerisierten (bzw. lösungsmittelbehandelten) Spender Mäusen gewonnen, mit Calcein gefärbt und in naive Mäuse transferiert, die 24 h später sensibilisiert werden (Abb. 11).

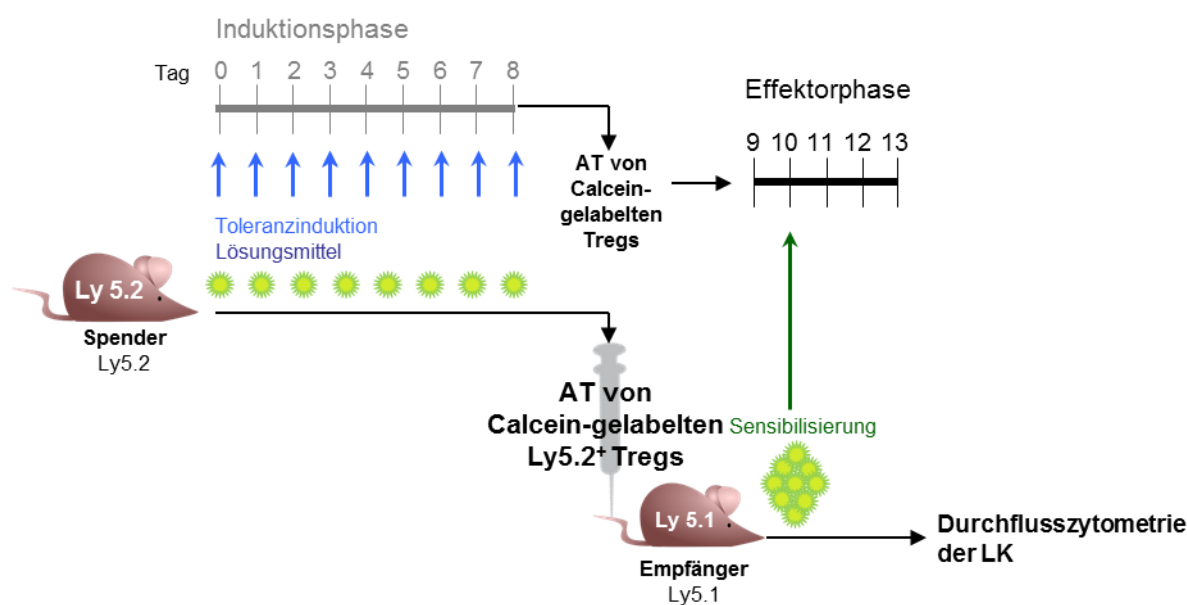


Abbildung 11: Protokoll zur Untersuchung von Calcein-gelabelten Tregs mit Immunzellen.

Ly5.2 Spendertiere werden mit 4,5 µg TNCB 8 x tolerisiert. Am Tag 9 werden die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aufgereinigt und mit Calcein gelabelt. 2-3 x 10⁶ Calcein gelabelte Tregs wurden in Ly5.1 Empfängermäuse i.v. transferiert. Am Tag 10 wurden die Ly5.1 Empfängermäuse mit 450 µg TNCB sensibilisiert. Am Tag 13 wurden die Haut-Drainierenden LK entnommen und mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht.

In der durchflusszytometrischen Analyse erkennt man zum einen die initial gefärbten $CD4^+CD25^+$ Tregs aus den Spendermäusen wieder, die sich als eine deutliche Population abheben (Calcein^{high}; rechtes Gate; Abb. 12).

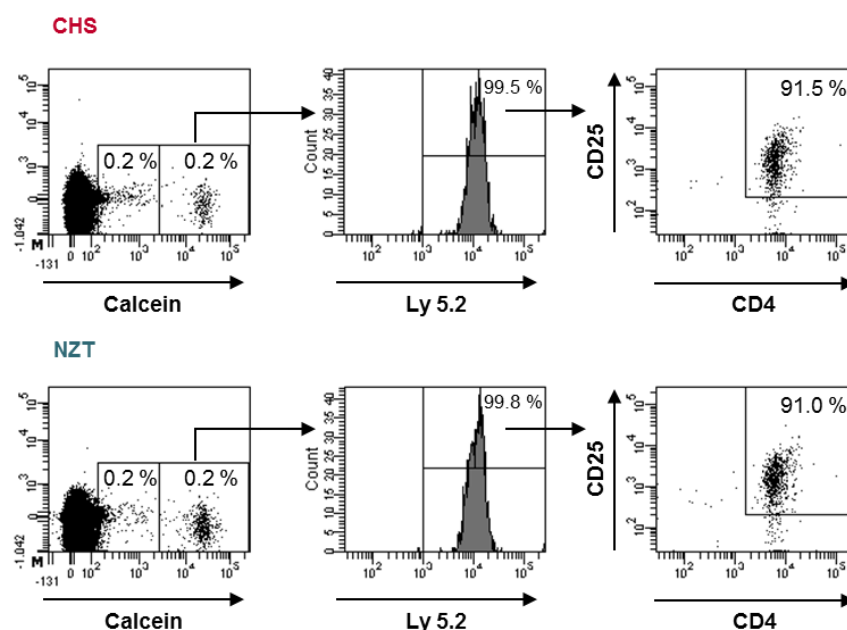


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse Calcein gelabelter Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt LK Zellen aus Ly5.1 Empfängermäusen. In der Abbildung lässt sich erkennen, dass es sich bei den Calcein gelabelten Zellen (Calcein^{high+}, rechtes Gate) durch AT transferierte $Ly5.2^+CD4^+CD25^+$ Tregs handelt. Sie sind zu einem gleichen Prozentsatz in den CHS als auch in NZT-Mäusen vorzufinden.

Zellen, die Calcein über gap junctions in den Empfängermäusen übertragen bekommen haben, zeigen eine erkennbare aber deutlich schwächere Fluoreszenz (linkes Gate; Abb. 13). Bei der Analyse der Immunzellen ist erkennbar, dass $CD11c^+$ DCs zu einem deutlich erhöhten Prozentsatz mit Tregs aus tolerierten Mäusen eine Verbindung über gap junctions eingehen, im Vergleich zu Tregs aus nicht tolerierten CHS-Mäusen (Abb. 13A).

In anderen Immunzellpopulationen wie $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 13B), $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 13C) und B-Zellen (Abb. 13D) ist die Calcein Aufnahme jeweils gleich hoch, unabhängig davon, ob die Tregs aus tolerierten oder nicht tolerierten Mäusen stammen.

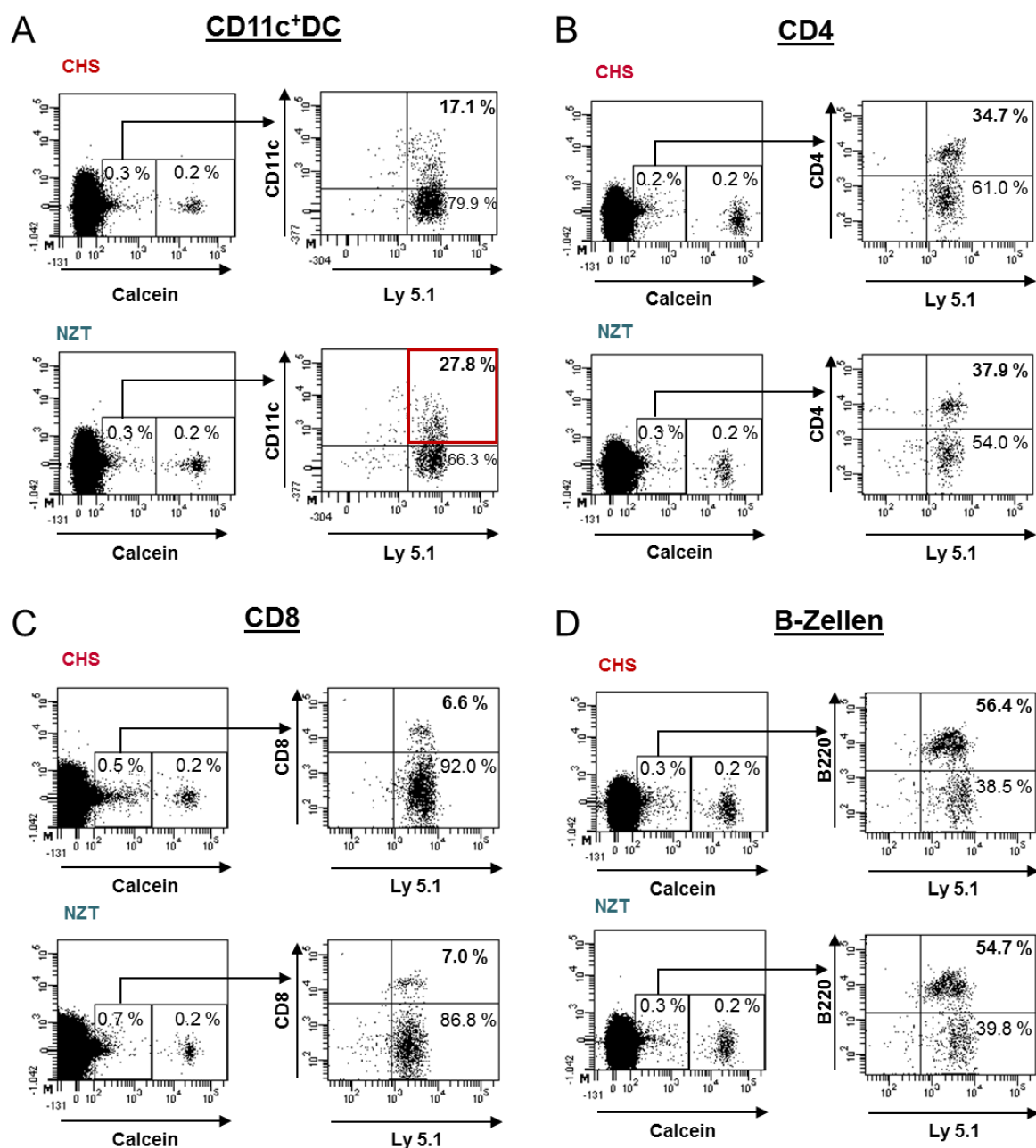


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Calcein-Übertragung auf CD11c⁺ DCs, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und B220 Zellen.

Es wird ermittelt, wieviel Calcein die Calcein gelabelten Ly5.2⁺ Tregs (rechtes Gate, siehe Abb. 12) nach CHS (oberes Panel) bzw NZT-Induktion (unteres Panel) über gap junctions auf andere Zellpopulationen (linkes Gate, schwächere Calcein⁺ Fluoreszenz) übertragen wird. (A) Tregs aus NZT Tieren übertragen vermehrt Calcein über gap junctions an CD11c⁺ DCs im Vergleich zur CHS Gruppe. In anderen Zellpopulationen, wie (B) CD4⁺ T-Zellen, (C) CD8⁺ T-Zellen, (D) B220-Zellen, ist die Calcein-Übertragung zwischen der CHS- und NZT-Gruppe gleich hoch.

Daraus lässt sich schließen, dass Tregs aus tolerierten Mäusen eine vermehrte (siehe. 3.1.2) und zudem eine direkte Verbindung über gap junctions (Abb. 13) mit CD11c⁺ DCs eingehen und so den tolerogenen Phänotyp der CD8⁺CD11c⁺ DCs in der NZT prägen.

3.2 Induktion einer oralen und epikutanen NZT im Colitis Modell

Wie in 3.1.1 zu sehen, ist es möglich, eine Tc1-vermittelte CHS durch eine NZT zu verhindern. Es wird der Frage nachgegangen, ob die NZT auch auf ein anderes Krankheitsmodell übertragen werden kann. Hierzu wird das Modell der TNBS-induzierten Colitis herangezogen. Die beiden Modelle unterscheiden sich auf zellulärer Basis dadurch, dass die CHS eine CD8⁺ Tc1-vermittelte Immunantwort in der Haut darstellt, während die Colitis eine CD4⁺ Th1/Th17-vermittelte Immunantwort im Gastrointestinaltrakt auslöst (M. Crohn).

3.2.1 Protokoll

Durch die Induktion einer NZT (ausgelöst durch die orale oder epikutane Gabe von subimmunogenen Mengen eines Kontaktallergens) wird untersucht, ob eine TNBS-induzierte Colitis beeinflusst bzw. inhibiert werden kann. Hierzu wurde das Protokoll der CHS/NZT zur Auslösung einer TNBS-induzierten Colitis modifiziert (Abb. 14). Der Versuchsaufbau erfolgt entsprechend dem Standardprotokoll der Colitis¹⁰⁸ (Abb. 14). Die Tolerisierungsdosis wird, wie zuvor beschrieben, 10 x durch eine mit oraler Applikation mit 45 µg TNBS bzw. epikutaner Applikation mit 4,5 µg TNCB auf immer wechselnde, rasierte Hautareale ausgeführt. Die Sensibilisierungsdosis erfolgt mit 3000 µg TNBS auf ein unbehandeltes, rasiertes Hautareal am Rücken. Die Dosis zum Auslösen der Entzündungsreaktion betrug 2500 µg TNBS gelöst in 25 % EtOH. Die Aktivität der Entzündung und zugehöriger Mediatoren werden durch die Durchführung einer Mini-Endoskopie und zugehörigem Endoscore (siehe 2.2.2.2, Abb. 5), Histologien, die T-Zell-Proliferation und die Zytokin-Produktion ermittelt.

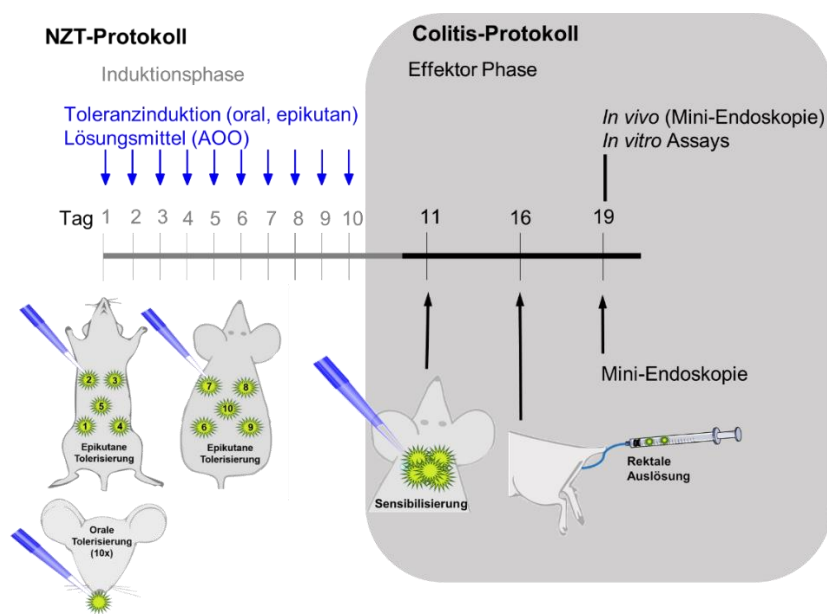


Abbildung 14: Schematischer Versuchsablauf Colitis.

Für die Induktion einer NZT werden Mäuse entweder auf wechselnde rasierte Hautareale 10 x tolerisiert (epikutane NZT-Induktion mit 4,5 µg TNCB in 15 µl AOO) oder erhalten 10 x eine orale Applikation mit 45 µg TNBS in 200 µl PBS an jedem zweiten Tag. Zur Kontrolle dient eine Gruppe, die reines Lösungsmittel (10 x 15 µl AOO) erhält. Am Tag 11 erhalten alle Mäuse eine Sensibilisierung mit 3000 µg TNBS in 100 µl AOO. 5 Tage später erfolgt die rektale Auslösung der Colitis mit 2500 µg TNBS mit 25% EtOH in 100 µl PBS in den Darm. 72h nach der Auslösung wird eine Mini-Endoskopie (*in-vivo* Parameter) durchgeführt sowie die drainierenden LK genommen für weiterführende *in-vitro* Assays.

3.2.2 *In vivo* Entzündungsreaktion

Abb. 15A zeigt den gepoolten Mittelwert des Endoscores von drei unabhängigen Versuchen, 72 h nachdem die Entzündungsreaktion ausgelöst wurde. Wie in Abb. 15A zu sehen ist, gibt es in den verschiedenen Gruppen einen signifikanten Unterschied in der Stärke der Entzündungsreaktion. Die Colitis-Gruppe, die vor Sensibilisierung und rektaler Auslösung mit Lösungsmittel behandelt wurde, weist mit einem Endoscore von 9,2 (\pm 2,9) eine mittelstarke Entzündungsreaktion auf. Die Gruppe, die epikutan tolerisiert wurde, hat mit einem Endoscore von 3,4 (\pm 1,6) eine sehr leichte Entzündungsreaktion entwickelt. Gleiches gilt für die Gruppe, die oral tolerisiert wurde und einen Endoscore von 3,6 (\pm 2,2) aufweist. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant mit einer 64 % - (Epikutan tolerisiert) bzw. 61 % - (Oral tolerisiert) Reduktion in der lokalen Entzündungsreaktion im Vergleich zu der Colitis Gruppe. Abb. 15B listet die einzelnen Parameter (Stuhl, Gefäße, Fibrin, Granularität und Durchsichtigkeit) von einem repräsentativen Versuch auf, aus denen nach Addition der Endoscore für jede Maus entsteht. Auch hier ist zu erkennen, dass jeder einzelne Parameter eine signifikante Reduktion

der Entzündungsparameter nach sich zieht, sofern die Mäuse vor der Colitis-Induktion epikutan oder oral tolerisiert worden sind.

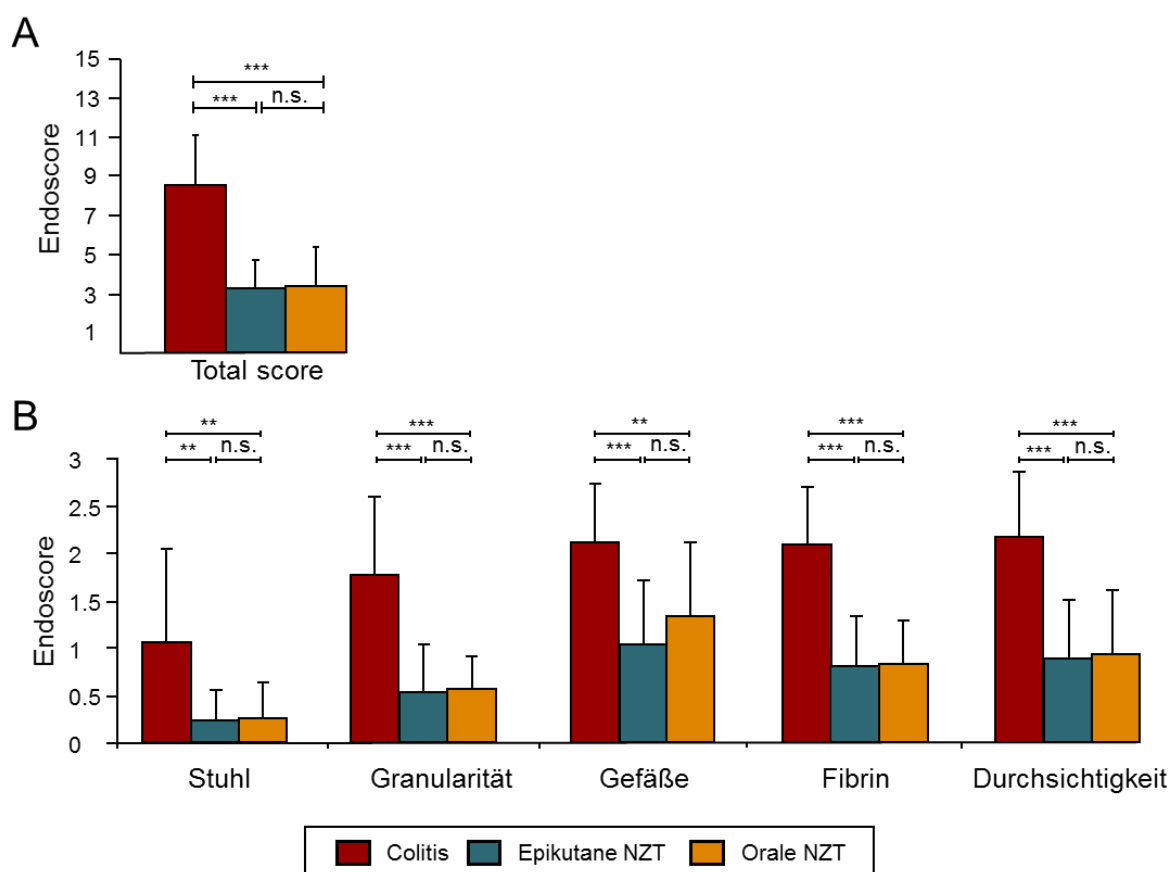


Abbildung 15: *In vivo*-Parameter: Entzündungsreaktion im Darm (Endoscore).

In den Mäusen wird nach dem Standardprotokoll entweder durch epikutane bzw. orale Applikation von subimmunogenen Dosen von TNCB (Epikutane NZT: 4,5 µg) bzw. TNBS (Orale NZT: 45 µg) eine NZT induziert oder sie dienen als Kontrolle durch die wiederholte Gabe des Lösungsmittels AOO (15 µl; Colitis). (A) und (B): Die Auslösung der Entzündungsreaktion erfolgt nach dem Colitis-Standardprotokoll rektal mit 2500 µg TNBS in 25 % EtOH. (A) Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen des Endoscores mit entsprechender Standardabweichung (n=21). (B) Es werden die Wertungen der einzelnen Parameter (Stuhl, Granularität, Gefäße, Fibrin und Durchsichtigkeit) aus einem von drei unabhängigen Versuchen mit entsprechender Standardabweichung aufgelistet, aus denen nach Addition das Ergebnis des Endoscores entsteht (n=7). (n.s.= nicht signifikant, **: p < 0,01, ***: p < 0,001).

3.2.3 Mini-Endoskopie & Histologie

In Abb. 16 werden Bilder, die während der Endoskopie aufgenommen worden sind (72 h nach Auslösung der Entzündungsreaktion) bzw. Abbildungen der Histologie als Beispiel für die Durchschnittswerte der Ausprägung (Endoscore) der Colitis (Abb. 15A) dargestellt. Im Vergleich zu den oral und epikutan tolerisierten Tieren erkennt man in der lösungsmittelbehandelten Colitis-Maus deutliche Entzündungsmerkmale, die mit vermehrten Ablagerungen von Fibrin, verminderte Durchsichtigkeit der Darmwand und Formverlust des

Stuhls einhergehen. Im Vergleich dazu bleibt der Darm der tolerierten Mäuse weitestgehend entzündungsfrei und kann eine relativ normale Darmfunktion aufrechterhalten.

Auch in der Histologie (Abb. 16) kann man Unterschiede in den Entzündungsparametern zwischen den Gruppen erkennen, die sich durch die Einwanderung von inflammatorischen Zellen und Verlust der Histoarchitektur äußern.

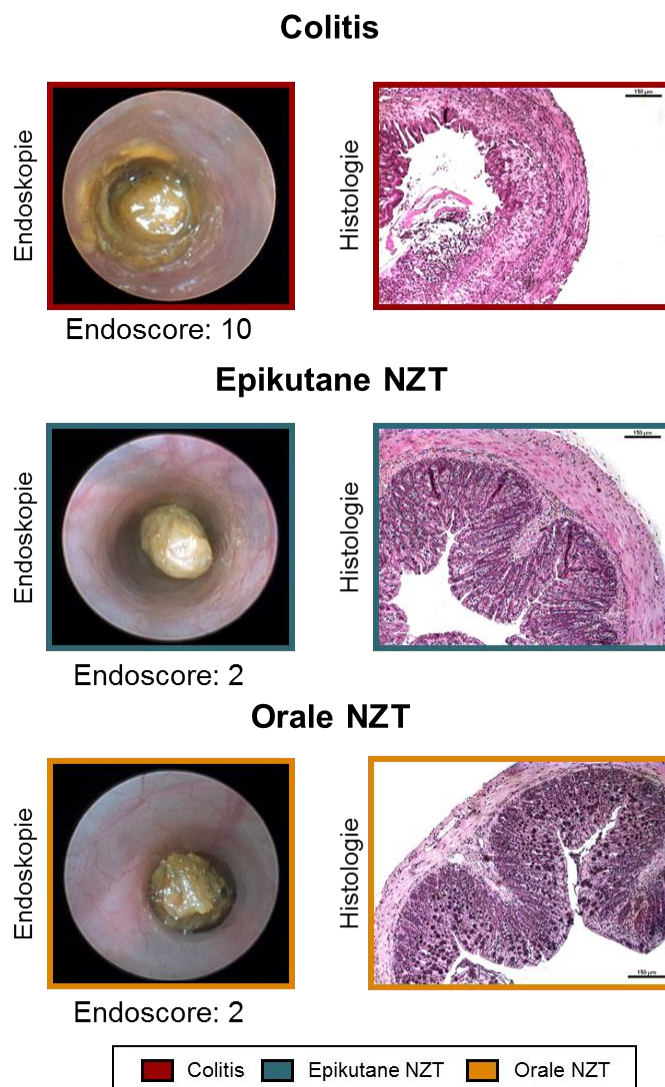


Abbildung 16: Endoskopie- und Histologiebild entsprechend dem Durchschnitts-Endoscore der jeweiligen Gruppe.

In den Mäusen wird entweder durch epikutane bzw. orale Applikation von subimmunogenen Dosen von TNCB (Epikutan: 4,5 µg) bzw. TNBS (Oral: 45 µg) eine NZT induziert oder dienen durch wiederholte Gabe des Lösungsmittels AOO (15 µl, Colitis) als Kontrolle. Die Sensibilisierung wird durch 3000 µg induziert. Die Auslösung der Entzündungsreaktion erfolgt rektal mit 2500 µg TNBS in 25 % EtOH. 72 h nach der Auslösung der Entzündungsreaktion werden die Endoskopiebilder aufgenommen und der zugehörige Endoscore ermittelt (links) sowie der Enddarm entnommen und ein Histologieschnitt mittels H&E Färbung angefertigt (rechts). Der Maßstab entspricht 150 µm. In der Abbildung wird für jede Gruppe (Oral, Epikutan, Colitis) für den Durchschnitts-Endoscore (ermittelt aus drei unabhängigen Versuchen (Abb. 15A) repräsentativ ein Endoskopie- und Histologiebild dargestellt. Endoskopiebild und Histologiebild stammen jeweils (Colitis = Score: 10; epikutane NZT= Score: 2; orale NZT= Score: 2) aus derselben Maus.

3.2.4 T-Zell-Antwort

Nach der Endoskopie werden die axillären, inguinalen und zervikalen LK entnommen, aufgereinigt und nach Hapten-spezifischer Restimulation entsprechend dem Protokoll für die Messung der T-Zell-Proliferation bearbeitet. Ein exemplarisches Beispiel für die Ergebnisse des T-Zell Proliferations-Assays ist in Abb. 17A gezeigt. Hapten-spezifisch restimulierte T-Zellen aus Haut-drainierenden LK haben die höchste Proliferationsrate, wenn die Mäuse nicht toleriert worden sind (Colitis). Die Proliferationsrate ist wesentlich niedriger, wenn die Mäuse toleriert wurden (epikutane und orale NZT), was auf eine Toleranzinduktion hindeutet. Unstimulierte T-Zellen (nicht Hapten-spezifisch restimulierte Zellen) aus allen Gruppen proliferieren unwesentlich und dienen zur Kontrolle (nicht gezeigt).

Ein weiterer *in vitro* Parameter zur Untersuchung der Kontaktallergen-spezifischen Immunreaktionen ist die Zytokin-Produktion der T-Zellen nach Hapten-spezifischer Restimulation aus den gewonnenen Überständen (Abb. 17B). Es ist bekannt, dass der TNBS-induzierten Colitis eine Th1/Th17-Immunantwort zu Grunde liegt, welche durch eine erhöhte IFN- γ , IL-17 und IL-2 Produktion, bedingt durch T-Zellaktivierung, gekennzeichnet ist. Nach Durchführung des Standardprotokolls lässt sich in den Überständen der LK-Zellen der Colitisgruppe eine vermehrte Sezernierung der Zytokine IFN- γ , IL-17 und IL-2 feststellen, während die Sezernierung aus T-Zellen nach Induktion der NZT signifikant herunterreguliert wird.

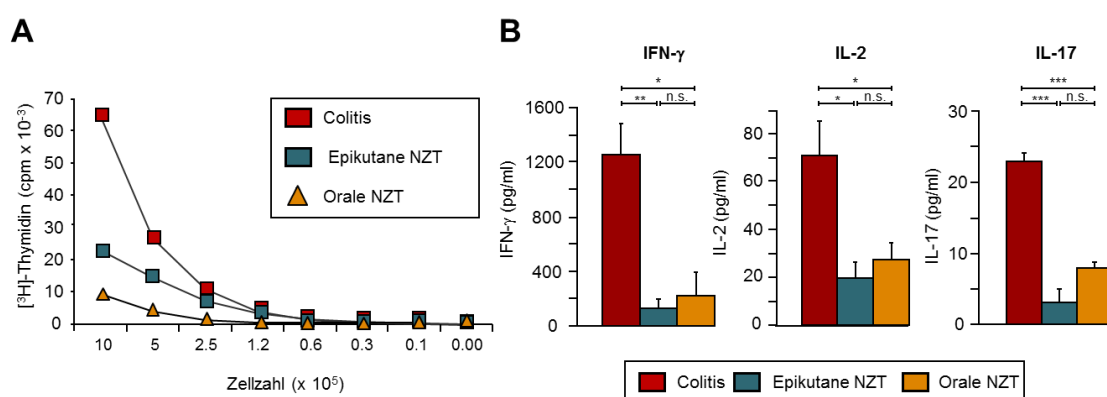


Abbildung 17: *In vitro*-Parameter: T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion nach Colitis-Standardprotokoll. In den Mäusen wird nach dem Standardprotokoll entweder durch wiederholte epikutane bzw. orale Applikation von subimmunogenen Dosen von TNCB (Epikutane NZT: 4,5 μ g) bzw. TNBS (Orale NZT: 45 μ g) eine NZT ausgelöst oder dienen durch Gabe des Lösungsmittels AOO als Kontrolle (Colitis). (A) Die Messung der T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Restimulation nach [3 H]-Thymidin-Einbau in die Zellen der axillären, inguinalen und zervikalen LK. (B). Nach dem Auslösen der Entzündungsreaktion werden die Zellen der axillären, inguinalen und zervikalen LK Hapten-spezifisch restimuliert, kultiviert und die Überstände nach 24, 48 und 72 h entnommen und auf ihre Zytokin-Produktion (INF- γ , IL-2 und IL-17) hin untersucht. (n.s.= nicht signifikant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

3.3 Während der Induktions-Phase der NZT sind regulatorische T-Zellen für die Inhibition der Colitis notwendig

Regulatorische T-Zellen spielen in einer Vielzahl immunologischer Prozesse eine Rolle. Dementsprechend wird die funktionelle Rolle der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen untersucht. Zunächst wird die relative Anzahl der Tregs in den verschiedenen Gruppen von oral, epikutan und nicht tolerierten Tieren nach Colitis-Induktion mittels durchflusszytometrischer Analyse der Haut-drainierenden sowie der mesenterialen LK untersucht.

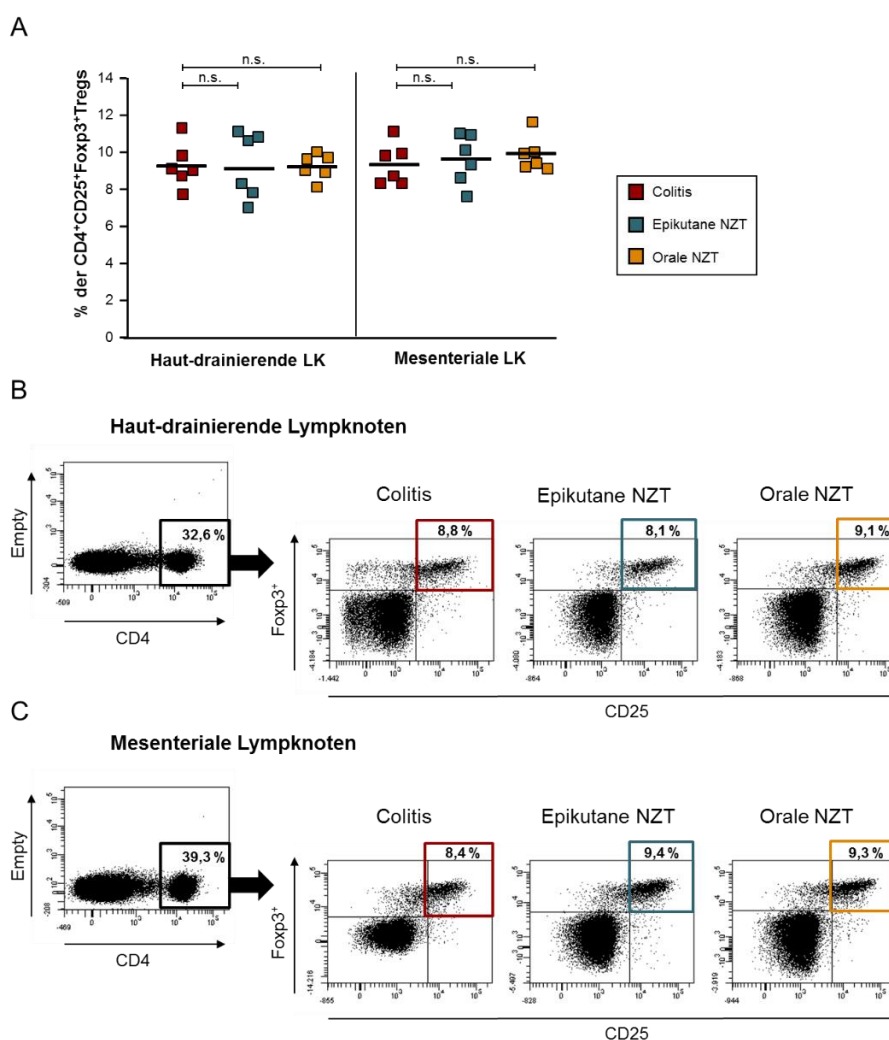


Abbildung 18: Anzahl der Tregs nach oraler und epikutaner NZT-Induktion im Vergleich zur Colitis. In der Induktionsphase werden die Mäuse mit 15 μ l reiner AOO-Lösung (Colitis) oder mit 4,5 μ g TNCB/15 μ l AOO (epikutane NZT) oder 45 μ l TNBS/200 μ l PBS (orale NZT) behandelt. Am 11. Tag wird die Sensibilisierung mit 3000 μ g TNBS in 150 μ l AOO (1:4) durchgeführt. Fünf Tage später erfolgt die Auslösung mit einer Dosis von 2500 μ g TNBS in 25 % EtOH/H₂O-Lösung. Es werden die Haut-drainierenden und mesenterialen LK in einzelnen Mäusen mittels Durchflusszytometrie auf ihre $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Expression untersucht. (A) Zusammenfassung der Einzelwerte der Treg Expression in 6 Mäusen pro Gruppe in Haut-drainierenden und mesenterialen LK. (B, C) Repräsentatives Beispiel der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Färbung in der epikutanen NZT-, oralen NZT- sowie Colitis-Gruppe der (B) Haut-drainierenden und (C) mesenterialen LK. (n.s.= nicht signifikant).

In der durchflusszytometrischen Analyse wurden keine Unterschiede zwischen den lösungsmittelbehandelten und den tolerisierten Mäusen nach einer Colitis-Induktion in den Prozentzahlen der Tregs gefunden (Abb. 18).

Es ist jedoch möglich, dass die Rolle der Tregs nicht von einer steigenden Anzahl sondern vielmehr von ihrer möglicherweise gesteigerten suppressiven Aktivität abhängt. Im Folgenden wird durch Depletion während der Induktionsphase (anti-CD25-Antikörper (PC61), Depletion der Foxp3⁺ T-Zellen in DEREK Mäusen) deren funktionelle Rolle in der NZT bestimmt.

3.3.1 **Depletion CD25⁺ Tregs durch Gabe eines anti-CD25-Antikörpers (PC61)**

Um die Rolle von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der NZT der Colitis zu untersuchen, werden diese Zellen durch Injektion eines anti-CD25-Antikörpers depletiert. Wie in der Literatur beschrieben¹²⁹⁻¹³⁴, wurde zur Depletion von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auch in den hier beschriebenen Experimenten der anti-CD25 monoklonale Antikörper (mAb) Klon PC61 eingesetzt.

3.3.1.1 **Protokoll**

Je 0,75 mg des anti-CD25-Antikörpers oder ein IgG Antikörper als Kontrolle wurden durch zweimalige Gabe vor der ersten epikutanen oder oralen Tolerisierung intraperitoneal appliziert. Erst nach Rückkehr dieser der CD25⁺ T-Zellen wird die Effektorphase durch Sensibilisierung und Auslösung der Entzündungsreaktion ausgeführt (Abb. 19), um einen Effekt der Depletion auf die Sensibilisierungsphase auszuschließen.

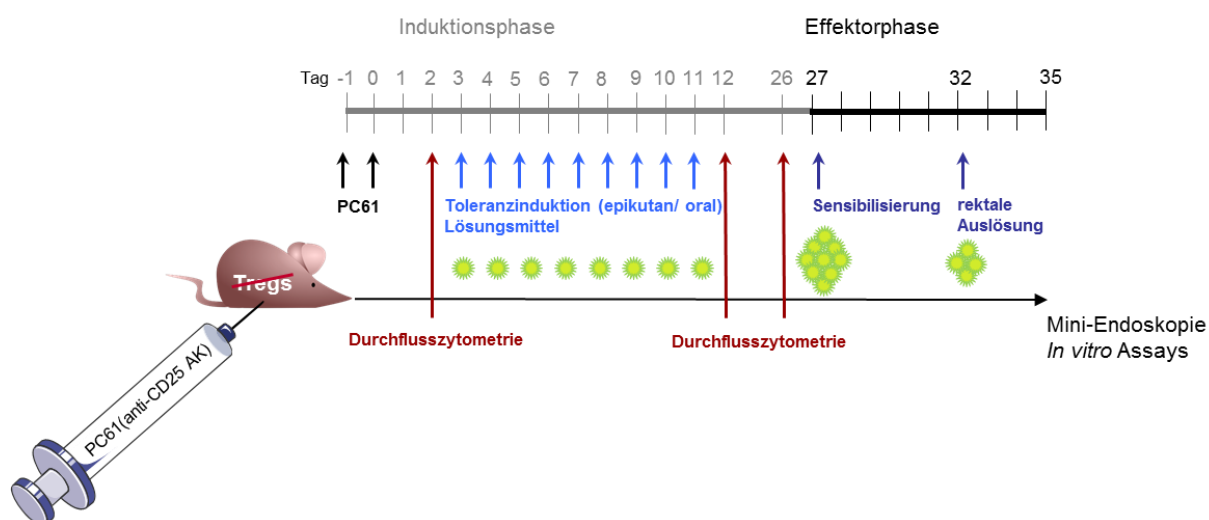


Abbildung 19: Zeittafel des modifizierten Colitisversuch zur Depletion der CD25⁺ T-Zellen.

Die i.p. Injektion von 75 µg des anti-CD25 mAK PC61 zur Depletion der CD25⁺ T-Zellen bzw. eines Kontroll-IgG Antikörper werden jeweils am Tag -1 und Tag 0 durchgeführt. Zwei Tage später wird mit der Tolerisierung durch 4,5 µg TNCB in 15 µl AOO, 45 µg TNBS in 200µl PBS oder mit 15 µl reiner AOO-Applikation begonnen. Mittels Durchflusszytometrie wird am Tag 2 und 12 die Depletion bzw. am Tag 26 die Rückkehr der CD25⁺ T-Zellen überprüft. An 26. Versuchstag alle Mäuse, durch eine 1:4 Verdünnung aus 3000 µg TNBS in 150 µl AOO, sensibilisiert. Nach fünf Tagen wird die Colitis mit 2500 µg TNBS in 25% EtOH/H₂O Lösung rektal ausgelöst. Drei Tage später erfolgen die Endoskopie und Colon-Entnahme für die Histologie sowie die LK-Entnahme für die *in vitro* Tests.

3.3.1.2 Treg-Depletion

Das Ausmaß der Depletion während der Tolerisierungsinduktion (Tag 3 und 12) und die Rückkehr (Tag 26) werden durchflusszytometrisch bestimmt. Diese Messung erfolgte unter Verwendung eines nicht kreuzreaktiven Antikörpers (Klon 7D4) (Abb. 20). Hierbei wurde zunächst auf die CD4⁺ T-Zellen gated (33,7 %, bezogen auf das FSC/SSC Gate) und dann auf die CD25⁺Foxp3⁺ Zellen. Diese wurden vom Tag 0 (Kontrolle) von 10,1 % auf 0,1 % am Tag 3 bzw. 0,2 % am Tag 12 (Phase der Toleranzinduktion) durch die zweimalige Gabe von PC61 reduziert. An Tag 26 sind die CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen mit 8,2 % fast vollständig zurückgekommen und die Mäuse wurden am folgenden Tag sensibilisiert. So kann von einer Depletion ausschließlich während der Tolerisierungsphase ausgegangen werden.

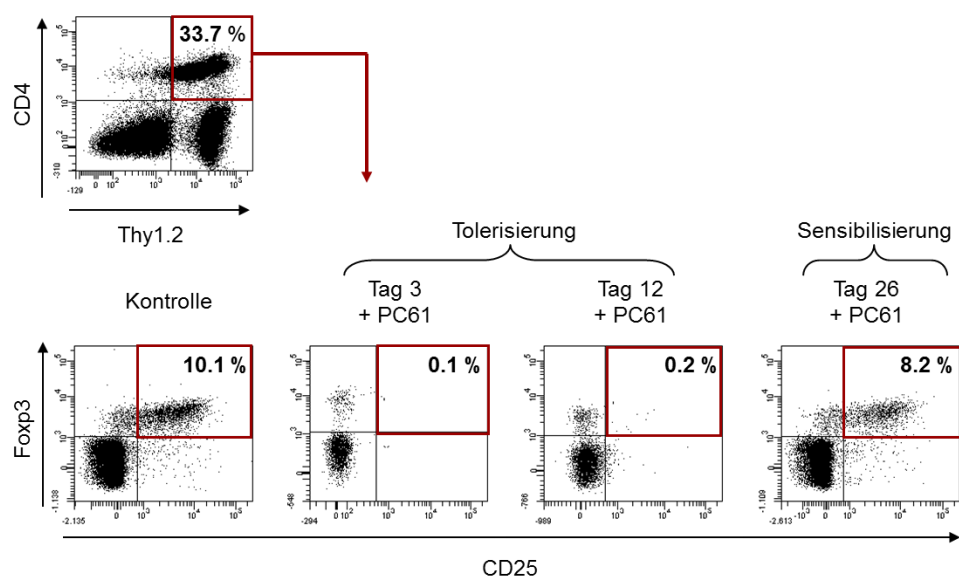


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen nach anti-CD25 mAb Gabe. Wie in Abb. 19 beschrieben, erhalten die Mäuse 75µg des anti-CD25 mAb PC61 am Tag -1 und Tag 0. Die Depletion der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen wird mittels Durchflusszytometrie am Tag 3 und 12 (Zeit der Tolerisierung) und die Rückkehr am Tag 26 (vor der Sensibilisierung) überprüft. Zur Auswertung der CD4⁺ Populationen auf CD25 und Foxp3 Marker werden Plots mit der Diva 6.0 Software erstellt. Die Daten werden exemplarisch für insgesamt 6 einzelne Versuche dargestellt.

3.3.1.3 In vivo Entzündungsreaktion

Die Auswertung der *in vivo* Entzündungsreaktion durch die Endoskopie zeigt nach der Sensibilisierung und dem Auslösen der Entzündungsreaktion in den IgG-behandelten Kontroll-Gruppen, wie zu erwarten, eine NZT nach oraler oder epikutaner Vorbehandlung mit subimmunogenen Dosen von TNBS (oral, Abb. 21A, B) bzw. TNCB (Epikutan, Abb. 21A, C), bzw. eine Colitis in den Lösungsmittel-behandelten Tieren. Auch in den mit PC61-Antikörper-behandelten Tieren, die nur Lösungsmittel erhalten haben, führte die Auslösung einer Colitis zu einer vergleichbar hohen Entzündungsreaktion im Darm wie in den Colitis-Kontroll-Tieren (Abb. 21). Die signifikante Erhöhung der Entzündungsreaktion ist in jedem einzelnen Parameter des Endoscores zu erkennen, mit Ausnahme der oral tolerisierten NZT-Gruppe, bei denen in den Gefäßen keine signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion in Bezug auf die Colitis-Gruppe zu erkennen ist (Abb. 21).

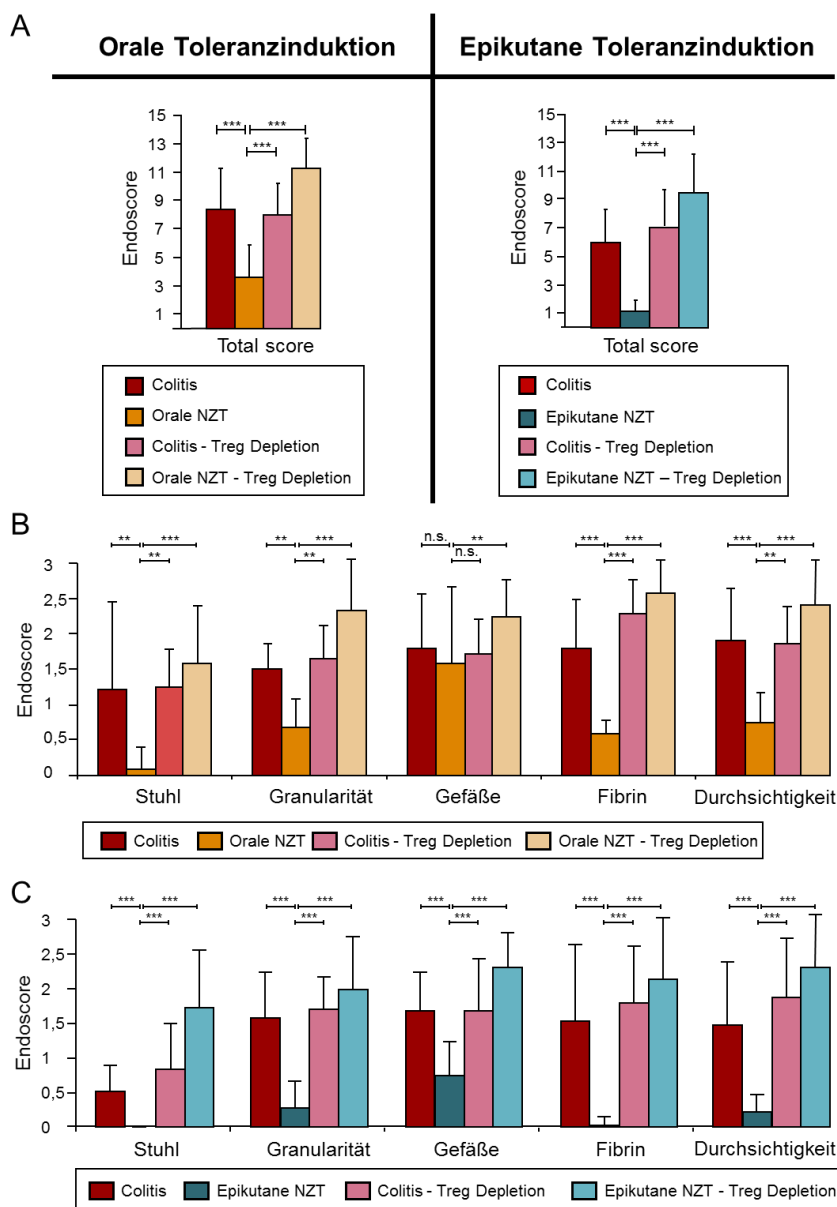


Abbildung 21: Vergleich des Gesamt-Endoscores und den jeweiligen Einzelparametern nach anti-CD25-Depletion in der oralen und epikutanen NZT.

Am Tag 0 und -1 werden die Tregs mit 75 μg anti-PC61-Antikörper (in 100 μl PBS) depletiert oder mit 75 μg (in 100 μl) eines IgG-Antikörper zur Kontrolle behandelt. Danach werden die Mäuse tolerisiert (8 x 45 μg TNBS/200 μl PBS); (orale Toleranzinduktion) 4,5 μg TNCB/15 μl AOO (Epikutane NZT) oder mit reiner AOO-Lösung (Colitis) behandelt und danach mit 3000 μg TNBS in 150 μl AOO sensibilisiert. Das Auslösen der Colitis findet fünf Tage nach der Sensibilisierung, über eine rektale Verabreichung von 2500 μg TNBS mit 25 % EtOH/H₂O Lösung statt. Nach drei Tagen wird die endoskopische Untersuchung durchgeführt. (A) Mittelwerte der gepoolten Gesamt-Endoscoredaten aus zwei (orale Toleranzinduktion) oder drei (epikutane Toleranzinduktion) individuellen Versuchsansätzen. (B) Mittelwerte der Einzelparameter nach (B) oraler Toleranzinduktion und (C) nach epikutaner Toleranzinduktion. (A-C) (n.s.= nicht signifikant, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

3.3.1.4 Mini-Endoskopie & Histologie

In Abb. 22 sind Momentaufnahmen zu sehen, die während der rektoskopischen Untersuchung aufgenommen wurden bzw. Aufnahmen von der Histologie des Enddarms aus den Versuchen dargestellt, die eine orale oder epikutane Toleranzinduktion bzw. nur Lösungsmittel als Colitis-Kontroll-Tiere erhalten haben (Abb. 22A, B). Es werden hierbei exemplarisch Abbildungen dargestellt, die entweder mit dem Kontroll-Antikörper IgG oder dem anti-CD25 Antikörper PC61 behandelt wurden. In den Aufnahmen der Endoskopie erkennt man deutliche Entzündungsmerkmale in den Colitis-Kontroll-Gruppen wie z.B. Ablagerungen von Fibrin sowie einen formbaren (durch die Kamera) leicht eingedrückten Stuhl, außerdem eine verstärkte Verästelung der Gefäße, die sich durch eine deutliche Rötung der Darmwand zeigt. Zudem weisen die Mukosaoberflächen der Colitis-Kontroll-Gruppen eine verstärkte Granularität auf. (siehe Abb. 22A, B; Gruppe: Colitis IgG). Der Endoscore bei NZT-IgG-Induktion wird ebenfalls beispielhaft an jeweils einer Maus gezeigt (Abb. 22A, B). Es ist eine relativ transparente Darmwand zu sehen, die eine durchsichtige, sehr glatte (kaum granuläre) Mukosaoberfläche aufweist. Die Blutgefäße sind in der Mukosa nur leicht angedeutet und es hat sich kein Fibrin auf ihr abgelagert. Auch der Stuhl ist solide (Abb. 22A). Der Endoscore betrug hier 1,5 (Abb. 22A) bzw. 0 (Abb. 22B), und entspricht somit keiner Entzündungsreaktion im Darm nach NZT- Induktion. Die Gruppen, deren Tregs depletiert wurden, jedoch keine Tolerisierung erhalten haben, zeigen ähnliche Symptome wie die Colitis-IgG-behandelten Kontrolltiere. Auch hier erkennt man eine Entzündungsreaktion mit starker Fibrinbildung, außerdem eine Verdickung der Darmwand die keine Durchsicht mehr zulässt. Im Vergleich sind die Tiere, die mit dem anti-CD25-Antikörper behandelt wurden und zeitgleich noch epikutan und oral tolerisiert wurden, stärker erkrankt als die Colitis-Gruppen. Man erkennt auf den Einzelaufnahmen, dass die Darmwand undurchsichtig ist, es zu einer massiven Fibrinablagerung kommt und der Stuhl formlos verteilt im Darmtrakt vorzufinden ist. Auch in den Histologieschnitten sieht man korrelierend zu den Momentaufnahmen der Endoskopie, dass die Histostruktur der Darmschleimhaut der Colitis IgG Gruppe (Abb. 22A) fast vollständig aufgehoben ist. Darmzotten sind nur noch vereinzelt erkennbar und die Mukosa (Laminapropria mucosae) ist stark durch infiltrierende Lymphozyten charakterisiert. Auch der Schnitt der Colitis-IgG Gruppe in Abb. 22B ist durch degenerierte und konfus angeordnete Krypten verändert. Die Krypten selbst sind durch infiltrierende Lymphozyten charakterisiert und die Anzahl an Becherzellen ist stark vermindert.

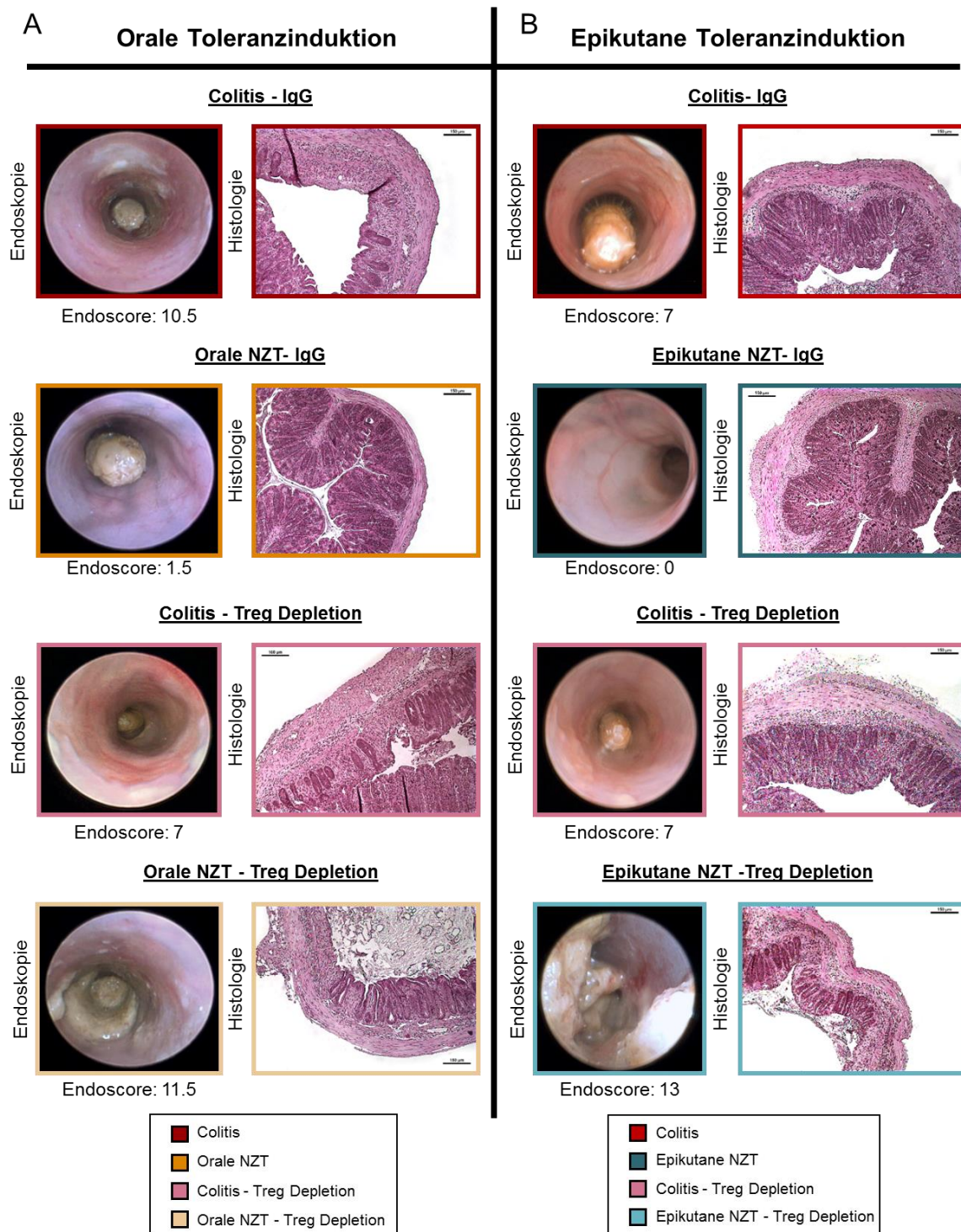


Abbildung 22: Endoskopie und Histologie nach Depletion der Tregs während der Toleranzinduktion. Die Mäuse werden nach dem beschriebenen Protokoll behandelt. 72 h nach dem Auslösen der Entzündungsreaktion wird durch eine Endoskopie der Entzündungsstatus festgestellt (rechts). Es wird nach den Parametern Stuhl, Gefäß, Fibrin, Granularität und Durchsichtigkeit ausgewertet. Jedem Parameter wird ein Wert, je nach Schwere der Entzündung, zwischen 0 (keine Entzündungszeichen) bis 3 (starke Entzündungszeichen) zugeordnet (siehe 2.2.2). Die Werte werden addiert, so dass jede Maus einen Score zwischen 0 und 15 erhält. Auf der linken Seite sind H&E-Färbungen von Darmproben zu sehen, die aus Mäusen stammen, die den jeweiligen Endoscore besitzen: (A) Endoskopie und H&E Färbung der histologischen Schnitte des Enddarms nach Behandlung mit IgG-Kontrollantikörper oder Treg Depletion mittels anti-CD25 Antikörper (PC61) während der (A) oralen oder (B) epikutanen Toleranzinduktion. Der Maßstab der histologischen Schnitte entspricht 150 μ m.

Ein ähnliches Bild ist in den Schnitten der PC61-behandelten Colitis-Kontroll-Gruppe sowie in der tolerisierten und PC61-behandelten Tiere zu erkennen. Die Histostruktur ist in diesen Gruppen stark verändert und degeneriert. Alle weisen eine Lymphozyteninfiltration in der Muskosa und Submukosa auf. Becherzellen sind gar nicht bis kaum vorhanden und im Lumen sind zahlreiche fibröse Strukturen zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigen sich die Histologien der oral- und epikutan tolerisierten Maus pathologisch unauffällig. Die Krypten weisen eine geordnete Struktur mit zahlreichen Becherzellen auf und zeigen dementsprechend wie in der Endoskopie keine sichtbaren Zeichen einer Entzündungsreaktion in der Colitis. Die Auswirkungen einer massiven Entzündungsreaktion sind in den tolerisierten und PC61-behandelten Mäusen auch im histologischen Schnitt auszumachen. Die strukturelle Integrität der Mukosa ist aufgrund degenerierter Krypten und Becherzellen kaum noch vorhanden und in den Lumen sind fibröse Strukturen erkennbar. Somit liegen im Vergleich zu der tolerisierten Kontroll-Maus mit IgG-Injektion verstärkte histopathologische, sowie klinische Anzeichen einer Entzündungsreaktion vor. Nach Depletion der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verlieren die Mäuse die Möglichkeit durch eine Hapten-spezifische Toleranzinduktion vor einer Colitis geschützt zu werden.

3.3.1.5 T-Zell-Antwort

Die Ergebnisse der *in vivo* Analysen und Histologien werden durch die *in vitro* Analysen der T-Zell-Antwort bestätigt. Die Lymphozyten werden *in vitro* mit einer 10mM TNBS Lösung Hapten-spezifisch restimuliert und die Proliferation mit Hilfe des ³H-Thymidin Assays bestimmt und hier exemplarisch aus einem Versuch dargestellt (Abb. 23A, B). Wie schon zuvor gesehen, zeigen die T-Zellen aus oral (Abb. 23A) oder epikutan (Abb. 23B) tolerisierten Tieren nach Hapten-spezifischer Restimulation eine verminderte Proliferation im Vergleich zu T-Zellen, die eine Colitis-Induktion erhalten haben. Die T-Zellen aus den Mäusen, die von den Treg depletierten Colitis-Tieren stammen, weisen eine geringfügig höhere Proliferation auf als die IgG-Kontroll-Tiere (Colitis). Mäuse, die jedoch tolerisiert wurden und während ihrer Tolerisierungsphase von den Tregs depletiert wurden, zeigen eine weitaus höhere Proliferationsrate als die aus IgG-behandelten tolerisierten Kontroll-Tiere stammenden T-Zellen. Auch im Vergleich zu den Mäusen, die eine Colitis-Induktion erhalten haben, proliferieren die T-Zellen stärker. In den epikutan tolerisierten Mäusen sogar doppelt so hoch im Vergleich zu den Colitis-Gruppen. Die Proliferationsrate der unhaptenisierten (nicht-restimulierten) T-Zellen dient zur Kontrolle und weist in allen Versuchen ein sehr niedriges Niveau auf (nicht gezeigt).

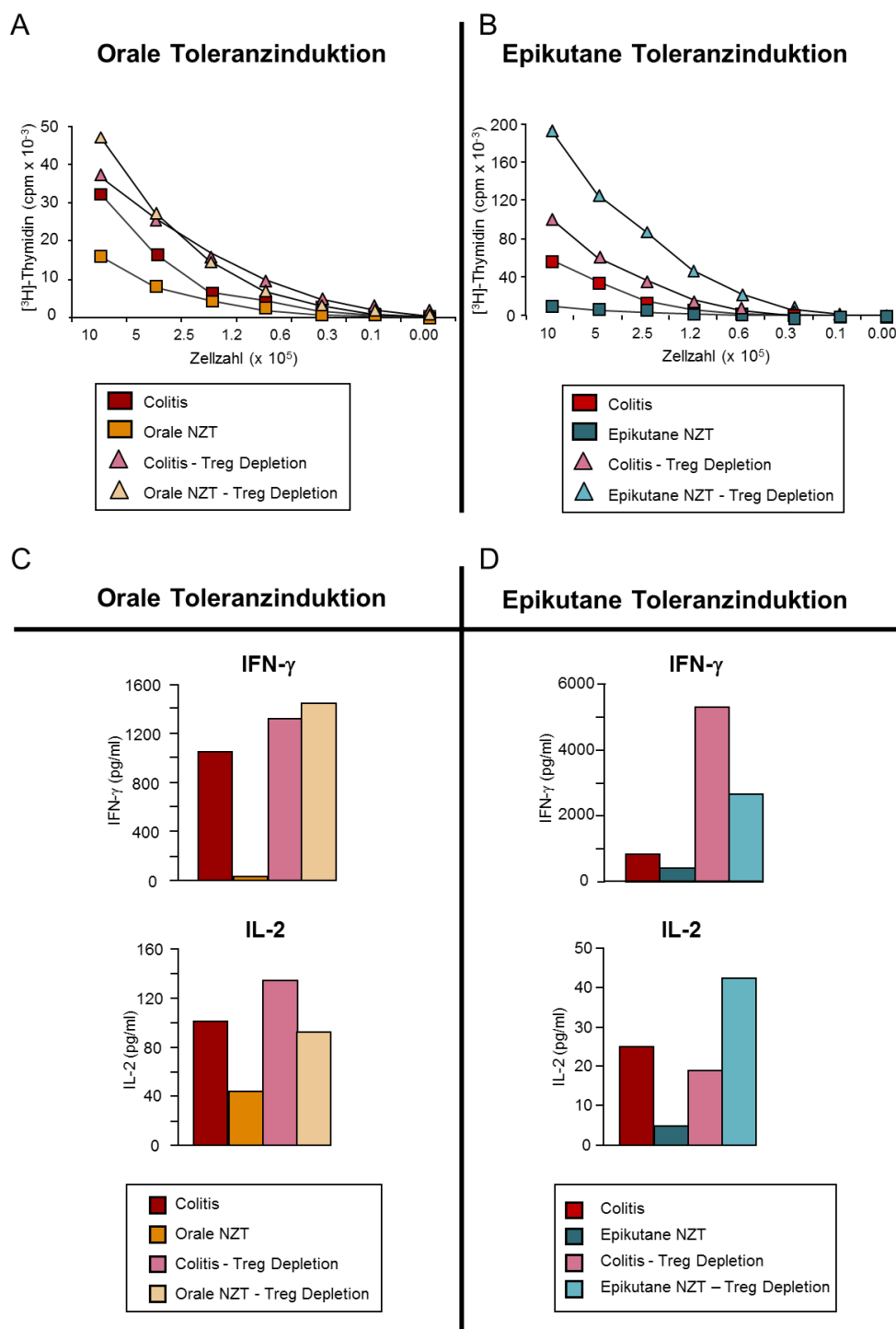


Abbildung 23: T-Zell-Antwort nach Depletion von CD4⁺CD25⁺ Tregs während der Toleranzinduktion. Nachdem die CD4⁺CD25⁺ Tregs an Tag 0 und -1 depletiert werden bzw. mit einem IgG-Kontroll-Antikörper behandelt wurden, beginnt die achtmalige Applikation 45 μ l in 200 μ l PBS (A,C orale Toleranzinduktion) bzw. 4,5 μ g TNBS in 15 μ l AOO (B,D epikutane Toleranzinduktion) oder 15 μ l reiner AOO Lösung (Colitis). Die Mäuse werden am 26. Tag sensibilisiert (3000 μ g TNBS/150 μ l AOO) und am Versuchstag 32 mit der Colitis-auslösenden Dosis (2500 μ g TNBS mit 25% EtOH/H₂O) behandelt. Nach 72 h werden die T-Zellen der Haut-drainierenden LK aufgereinigt, Hapten-spezifisch restimuliert und kultiviert. (A, B) Es wird die Zellzahl in Abhängigkeit der gemessenen ³H- Thymidinsignale (counts per minute) dargestellt. (C, D) Die Überstände der T-Zellen werden nach 48 h entnommen und auf die Zytokin-Produktion von IFN- γ und IL-2 hin untersucht. (A-D) Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von zwei (orale Toleranzinduktion) bzw drei (epikutane Toleranzinduktion) Versuchen.

Als weiterer *in vitro* Parameter wurde auch hier die T-Zell-Zytokin-Produktion aus den Überständen der LK-Zellen nach Restimulation in beiden Versuchsansätzen (orale und epikutane Toleranzinduktion) bestimmt (Abb. 23C, D). In der mit dem IgG-Kontroll-Antikörpern-behandelten Tieren der Colitis-Gruppe erkennt man eine höhere IFN- γ Sezernierung als auch IL-2 Produktion, während nach Toleranzinduktion nur eine geringe Menge dieser Zytokine nachweisbar sind. Dieses Ergebnis wurde auch schon in Abb. 17 gezeigt und demonstriert somit ein typisches Zytokinprofil einer NZT. In den Treg-depletierten Tieren ist die Ausschüttung der Zytokine IFN- γ und IL-2 ähnlich hoch wie in der Colitis-Kontroll-Gruppe. In dem Versuch der epikutanen Toleranzinduktion ist die Ausschüttung von IFN- γ in der Colitis–Treg Depletions Gruppe erhöht. Im Vergleich zur NZT-Gruppe ist die Sezernierung von IFN- γ und IL-2 deutlich erhöht, sobald die Tiere zuvor mit dem PC61-Depletions-Antikörper behandelt wurden. Dies bestätigt die bereits erwähnten Daten und es wird durch die Zytokinbestimmung noch deutlicher, dass sich keine NZT nach Depletion der CD25⁺ T-Zellen während der Induktions-Phase ausbilden kann, da die Produktion der Zytokine nicht vermindert sondern stark erhöht ist.

Die Induktion der Colitis in Tieren, die zuvor subimmunogene Mengen des Kontaktallergens erhalten haben, führte in den CD25-depletierten Tieren zu einem signifikant stärkeren Krankheitsverlauf sowohl in den epikutan als auch in den zuvor oral tolerisierten Tieren. Um zu überprüfen, ob diese aufgehobene NZT-Reaktion tatsächlich auf das Fehlen von CD4⁺CD25⁺ Tregs zurückzuführen ist und nicht auf die Depletion anderer CD25-exprimierender Zellen (z.B. aktivierter CD25⁺ T-Zellen) wurden zur formellen Überprüfung DEREK-Mäuse verwendet und diese mittels Diphtherie Toxin Gabe von ihren CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs depletiert.

3.3.2 Depletion Foxp3⁺ Tregs durch die Gabe von Diphtherie Toxin in DEREK Mäusen

Um formell zu überprüfen, dass es sich bei den CD4⁺CD25⁺ Zellen um Foxp3⁺ Tregs handelt haben wir einem weiteren Versuchsansatz eine Reportermaus (DEREG-Maus (BAC- transgene Maus)) herangezogen. Im ersten Exon des *foxp3*-Lokus enthält sie neben der kodierenden Region des GFP, den kodierenden Bereich des Diphtheria Toxin Rezeptors (DTR)¹³⁵. Der DTR bietet die Möglichkeit, Foxp3-exprimierende Zellen gezielt durch die Gabe von Diphtheria-Toxin (DT) zu depletieren. Daher stammt der Name DEREK-Maus (depletion of regulatory T cells).

3.3.2.1 Protokoll

Der Versuchsansatz wurde ähnlich durchgeführt wie der beschriebene Versuchsansatz in 3.3.1, jedoch mit einigen Änderungen (Abb. 24). Die DT-Gabe erfolgt mit 1 µg pro Maus jeweils am Tag 0 und 3. Die Mäuse wurden zweimal täglich tolerisiert und die Tolerisierungsphase wurde auf 4 Tage gekürzt. Dies ist nötig, da das DT die Foxp3⁺ Zellen zum einen nur kurzzeitig depletiert und von einer längerfristigen DT-Gabe jedoch abzusehen ist, da die Mäuse sehr empfindlich auf das DT reagieren.

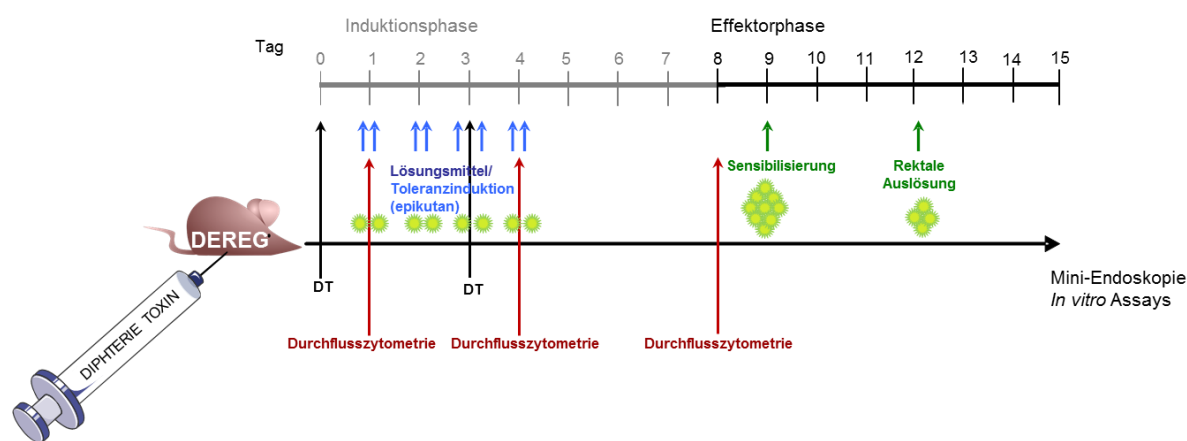


Abbildung 24: Protokoll zur Depletion der Foxp3⁺ Tregs mit DT in DEREK-Mäusen während der Induktionsphase der NZT.

In den Kontroll-Gruppen wird eine epikutane NZT bzw. Colitis ausgelöst, nachdem sie mit PBS i.p. injiziert wurden. Zwei weiteren Gruppen wird vor Induktion und am Tag 3 der epikutanen NZT bzw. Lösungsmittel-Behandlung der Colitis Gruppe, Diphtherie Toxin (DT) (1µg/ Maus) i.p. injiziert. Am nächsten Tag wird die Reduktion der Tregs mittels Durchflusszytometrie (B) bestätigt. Da die Depletion der Tregs kurzzeitig ist, muss die Tolerisierungsphase gekürzt werden und die Mäuse werden achtmal zwischen Tag 1-4 tolerisiert. Am Tag 8 wird durch eine weitere durchflusszytometrische Analyse die Rückkehr der Zellen bestätigt (B), die Mäuse sensibilisiert und fünf Tage später durch das Kontaktallergen eine Entzündung im Darm ausgelöst. Die Mini-Endoskopie wird 72 h nach der Entzündungsreaktion gemessen, anschließend die drainierenden LK entnommen und für weitere *in vitro*-Experimente gepoolt

3.3.2.2 Depletion der Tregs

Wieder wurde die Depletion der Foxp3 Tregs während der Tolerisierungsphase mittels durchflusszytometrischer Analyse überprüft (Abb. 25). Zunächst wurde auf CD4⁺ T-Zellen gated (21,5 %) und dann weiterführend auf die CD25⁺Foxp3⁺ doppelt positiven Zellen. Die DT-Gabe führte zu einem Rückgang von 12,2 % in der Kontroll-Gruppe an Tag 0 auf 0,4 % am Tag 1 bzw. 0,3 % am Tag 4. Am Tag 8 ist bereits die vollständige Rückkehr der Foxp3⁺ T-Zellen zu erkennen mit 14,3 %. Nach der festgestellten Rückkehr der Foxp3 positiven Zellen wurde dann die Sensibilisierung und Auslösung laut Standardprotokoll durchgeführt. Der Versuchsansatz wurde in diesem Fall nur mit der epikutanen Toleranzinduktion durchgeführt.

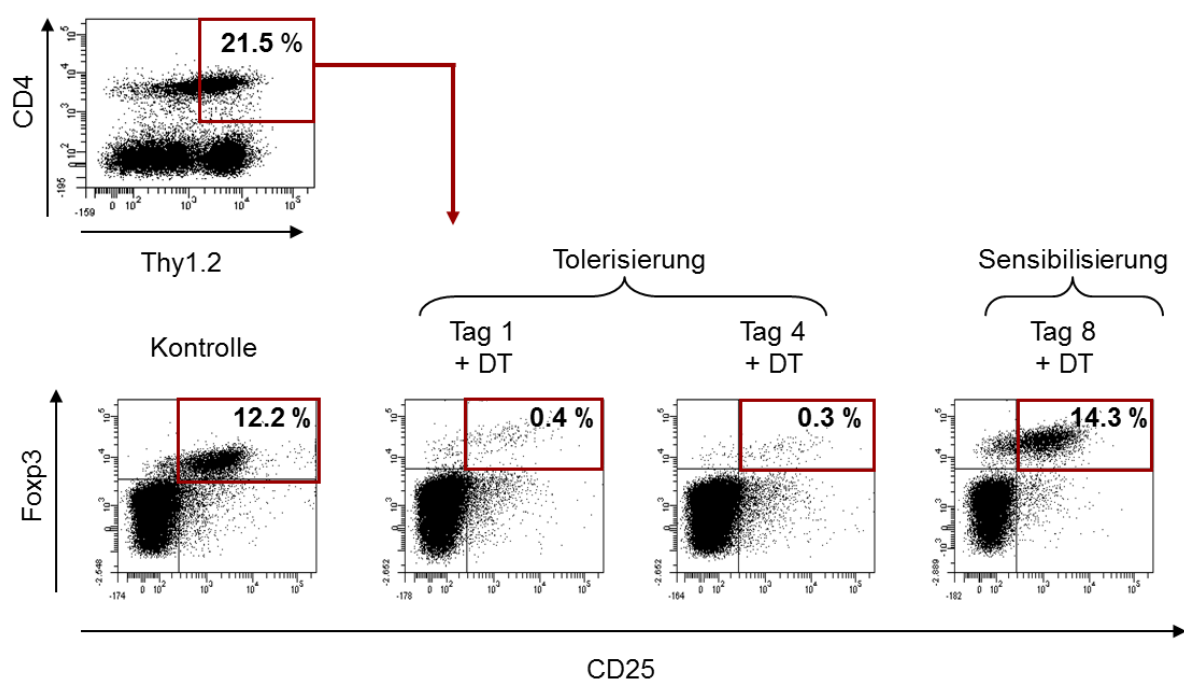


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der Depletion der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen nach DT-Behandlung in DREG-Mäusen.

Die drainierenden LK aus den DT- bzw. PBS-behandelten Tieren werden am Tag 1, 4 und 8 entnommen und mittels einer durchflusszytometrischen Messung auf die Depletion und Rückkehr der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen untersucht. Anzahl aller CD4⁺ T-Zellen bezogen auf alle gemessenen Zellen (oberes Panel). Anzahl der CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen am Tag 1, 4 und 8, gated auf CD4⁺ T-Zellen. Abgebildet ist ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Versuchen.

3.3.2.3 In-vivo Entzündungsreaktion und T-Zell-Proliferation

Auch in diesem Versuch erkennt man, dass in der PBS-Kontroll-Colitis-Gruppe (Endoscore 7) als auch in der DT-behandelten-Colitis-Gruppe (Endoscore 8) eine Entzündung im Darm von etwa derselben Stärke entstanden ist (Abb. 26A). Bei der epikutan tolerisierten Kontroll-Gruppe ist hingegen nur eine leichte Colitisreaktion mit einem durchschnittlichen Endoscore von 4 zu erkennen. Die Tiere, die während der Abwesenheit der Foxp3⁺ Tregs epikutan tolerisiert wurden, zeigen hingegen eine überschießende Entzündungsreaktion im Darm mit einem durchschnittlichen Endoscore von 11. Auch in der T-Zell-Proliferation der epikutan und mit DT-behandelten Gruppe äußert sich mit einer sehr stark überschießenden T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Restimulation im Vergleich zu den Colitis-Kontroll-Gruppen (Colitis-PBS und Colitis-Treg Depletion) als auch der Kontroll –NZT-Gruppe (Abb. 26B). Zwar ist die Verminderung der T-Zell-Proliferation in den NZT-Gruppe in diesem Versuch nicht sehr stark ausgeprägt, spiegelt aber die nicht sehr starke Verminderung in dem Endoscore wider. Generell war in den DREG-Mäusen ein stärkerer Krankheitsverlauf zu erkennen. Eine

direkte Erklärung konnte dafür jedoch nicht gefunden werden. Die verstärkte Entzündungsreaktion in den Treg-depletierten Mäusen, die epikutan tolerisiert worden sind, bestätigt die Daten aus Punkt 3.3.1, dass die $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs einen wichtigen Bestandteil für die Induktion einer NZT zur Verhinderung einer Colitisreaktion darstellen.

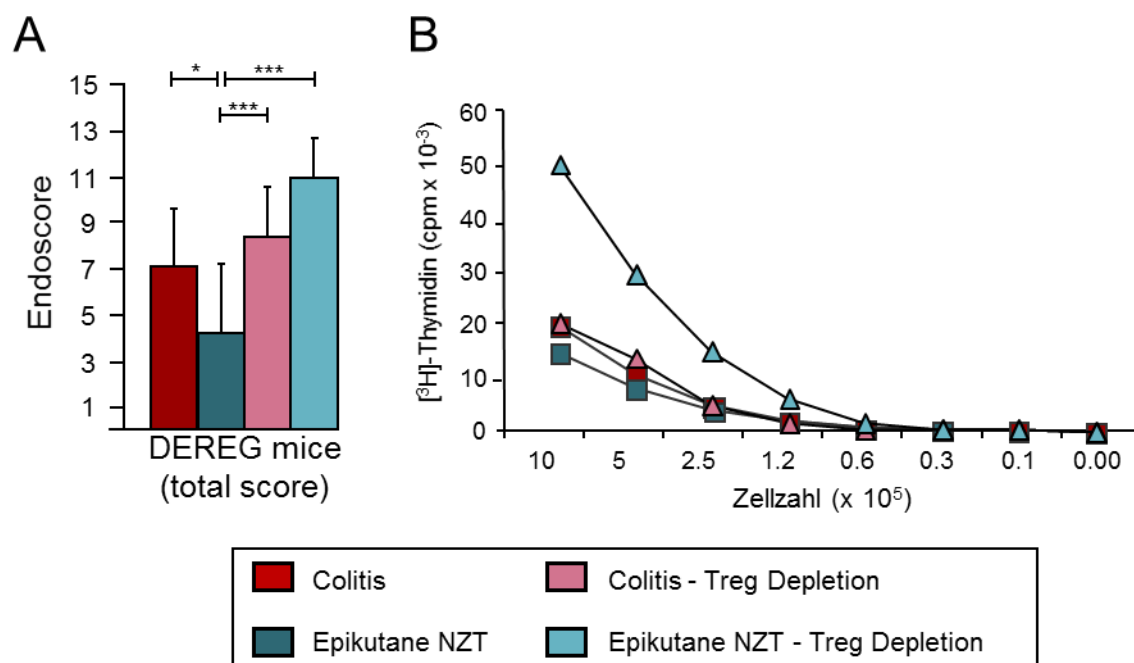


Abbildung 26: Endoskopie und T-Zell-Proliferation nach Depletion der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen mittels DT in DEREK-Mäusen in der Induktionsphase der NZT zur Prävention einer Colitis.

In den Mäusen werden wie in Abb. 24 beschrieben die $Foxp3^+$ Tregs depletiert und die Mäuse wurden anschließend mit $4,5 \mu\text{g}$ TNCB in $15 \mu\text{l}$ AOO an zwischen Tag 1 und zweimal täglich tolerisiert bzw. mit reinem Lösungsmittel behandelt. Folgend werden die Tiere sensibilisiert und die Colitis ausgelöst. 72 h später erfolgt die Mini-Endoskopie (A). Gezeigt werden gepoolte Daten aus zwei unabhängigen Versuchen. Nach der Mini-Endoskopie werden die Haut-drainierenden LK entnommen, aufgereinigt und kultiviert und die T-Zell-Proliferation nach ^3H -Thymidin-Einbau (cpm)(B). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen. (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

3.3.3 IL-10 ist notwendig für die NZT zur Verhinderung der Colitis

Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob das Zytokin IL-10 maßgeblich an der Entstehung einer NZT im Rahmen der Colitis-Prävention beteiligt ist. Hierzu wurden $IL10^{-/-}$ Mäuse auf C57/BL6/J Hintergrund herangezogen und mit ihnen ein Colitisversuch nach dem Standardprotokoll der Colitis/NZT Reaktion im Vergleich zu WT C57/BL6/J Mäusen ausgelöst (Siehe 3.2; Abb. 14). In den WT-Mäusen ist der bereits bekannte Verlauf der NZT zu erkennen. (Verstärkte Entzündungsreaktion in der Colitis-Gruppe und signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion in den oral und epikutan tolerisierten Gruppen). Im Vergleich konnte in den $IL10^{-/-}$ keine orale oder epikutane NZT ausgelöst werden, da die Entzündungsreaktion in der Endoskopie in den $IL10^{-/-}$ Mäusen als vergleichbar in der Colitisgruppe bewertet wurde (Abb. 27A).

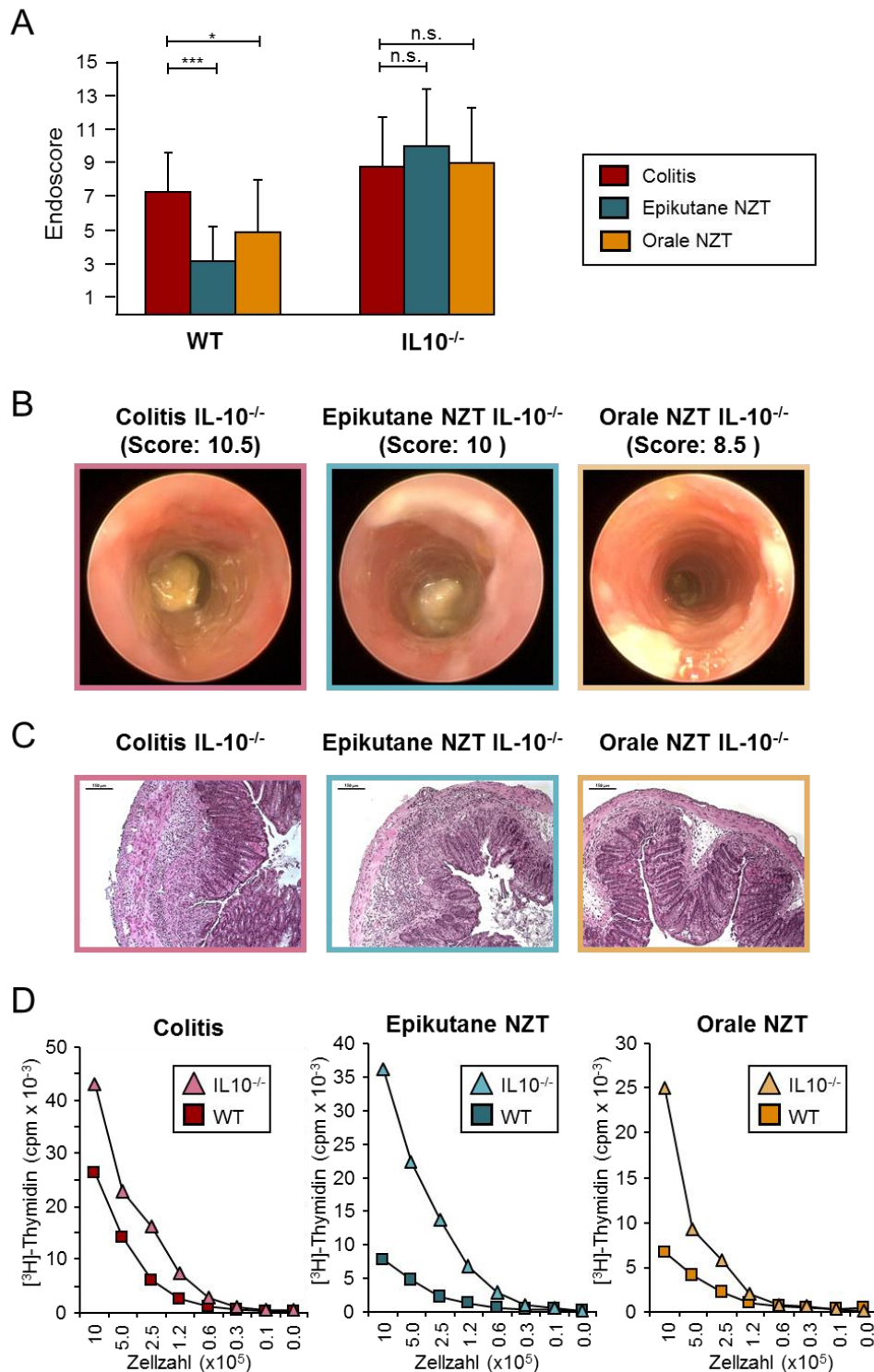


Abbildung 27: IL-10 ist notwendig für die epikutane und orale Toleranz zur Verhinderung einer Colitis. C57/BL6/J IL10^{-/-} Mäuse und WT C57/BL6/J Mäuse wurden für die Versuche verwendet. Der Versuchsaufbau richtet sich nach dem Standardprotokoll zur Induktion einer epikutanen (10 x 4,5 µg TNCB in 15 µl AOO) und oralen (10 x 45 TNBS in 200 µl PBS) NZT-Induktion zur Verhinderung einer Colitis (siehe: Abb.14) bzw. einer Colitis-Kontroll-Gruppe (10 x reines Lösungsmittel AOO; Colitis). Nach der Sensibilisierung mit 3000 µg TNBS in AOO (4:1) wurde die rektale Auslösung durchgeführt (2500 µg TNBS in 25% EtOH/H₂O). (A) Gepoolte Daten der Mini-Endoskopie aus drei individuellen Versuchen werden gezeigt. Repräsentative Aufnahmen des Endoskopie-Scores der (B) Mini-Endoskopie und der (C) Histologie des Enddarms werden dargestellt. Der Maßstab der histologischen Schnitte entspricht 150 µm. (D) Ein repräsentatives Beispiel der *in vitro* T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Restimulation aus drei individuellen Versuchen wird gezeigt. (n.s.= nicht signifikant, *: p = < 0,05, ***: p = < 0,001).

Die Bilder aus der Endoskopie geben beispielhaft wieder, dass es auch nach einer Toleranzinduktion zu einer Entzündungsreaktion mit einer verstärkten Granularität, herabgesetzten Durchsichtigkeit der Darmwand, starken Fibrinbildung und verformbaren Stuhl kommt (Abb. 27B). In der histologischen Untersuchung sind erhöhte Einwanderungen von Lymphozyten erkennbar und auch die Struktur der Zotten ist stark verformt, was auf einen erkrankten Darm in allen drei Gruppen (Colitis, orale und epikutane NZT) hinweist (Abb. 27C). Auch in der Hapten-spezifischen Restimulation zeigt sich eine die T-Zell-Proliferation der IL10^{-/-} Gruppen in Höhe der WT-Colitis-Gruppe, während die der oralen und epikutanen WT-NZT-Gruppen, wie zuvor beschrieben, vermindert ist, so dass man davon ausgehen kann, dass eine NZT nicht ausgelöst werden kann, sobald IL-10 nicht vorhanden ist (Abb. 27D).

3.3.4 Die Hapten-spezifische Wirkung der NZT in der TNBS-induzierten Colitis

Es sollte überprüft werden, ob sich der Toleranzeffekt der NZT in der TNBS-induzierten Colitis Antigen-spezifisch oder Antigen-unspezifisch verhält. Hierzu wurden die Mäuse nach dem Standardprotokoll als Kontrolle wie bekannt mit TNBS bzw. TNCB (oral bzw. epikutan) tolerisiert, anschließend sensibilisiert und die Colitis ausgelöst. Um nun zu überprüfen, ob der NZT-Effekt Antigen-spezifisch ist, wurden die Mäuse mit einem zweiten Hapten DNFB (oral) oder DNCB (epikutan) tolerisiert, die Sensibilisierung und Auslösung wurde jedoch mit dem bekannten Kontaktallergen TNBS durchgeführt (Abb. 28).

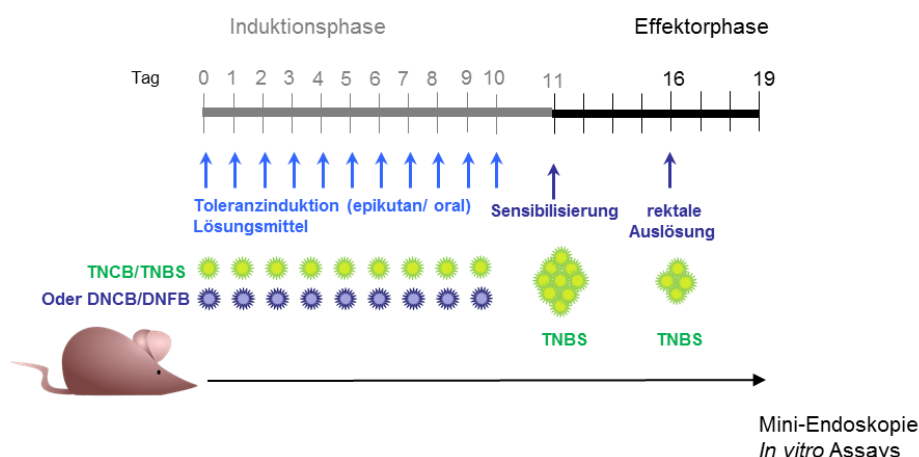


Abbildung 28: Protokoll zur Prüfung der Antigen-Spezifität in einer NZT zur Inhibition einer Colitis durch das Hapten DNCB/DNFB.

Zusätzlich zu dem Standardprotokoll der epikutanen und oralen NZT zur Verhinderung einer Colitis mit TNCB und TNBS werden außerdem zwei weitere Gruppen hinzugezogen: die 10 x oral mit 0,01% DNFB in 200 µl PBS, bzw. epikutan mit 10 x 0,01 % DNCB in 15 µl AOO behandelt werden. Zur Kontrolle dient eine Gruppe die reines Lösungsmittel (15 µl AOO) erhält. Alle Mäuse werden folgend mit 3000 µg TNBS in 150 µl AOO (4:1) sensibilisiert. 5 Tage später erfolgt die rektale Auslösung mit 2500 µl TNBS in 100 µl 25 % EtOH/H₂O. 72 h nach der Auslösung wird eine Mini-Endoskopie durchgeführt und anschließend die Haut-drainierenden LK für weitere *in vitro* Assays entnommen.

Nach der oralen und epikutanen Tolerisierung mit TNBS bzw. TNCB lässt sich wie bekannt der Toleranzeffekt erkennen (Abb. 29). Werden die Mäuse jedoch mit einem anderen Hapten tolerisiert (DNFB (Abb. 29A, B) bzw. DNCB (Abb. 29C, D) tolerisiert, ist der Toleranzeffekt aufgehoben und die Mäuse bilden eine Colitis aus, die der Stärke der untolerisierten Colitis-Gruppen entspricht (Abb. 29). Auch in der T-Zellproliferation zeigt sich eindeutig, dass die T-Zellen ähnlich stark proliferieren wie in der Colitis-Kontroll-Gruppe, während die mit TNBS bzw. TNCB-tolerisierten Mäuse den bekannten T-Zell-Aktivierungsgrad zeigen (Abb. 29B,C).

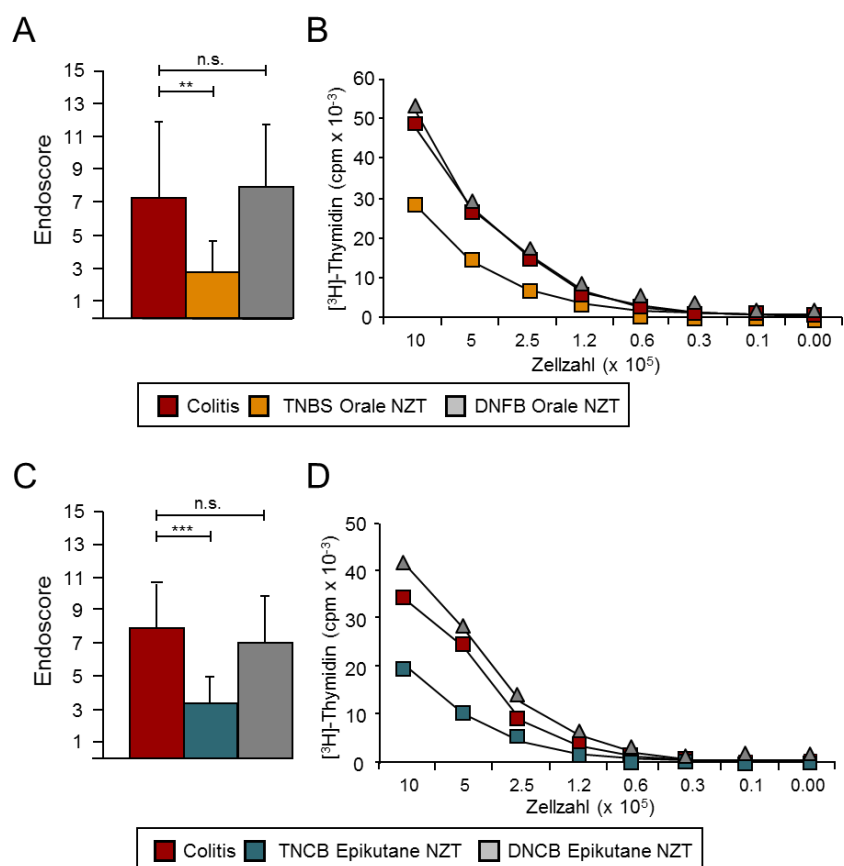


Abbildung 29: Antigen-Spezifität in der epikutanen und oralen NZT zur Verhinderung einer Colitis.

Der Versuch wurde nach dem Standardprotokoll der NZT/Colitis durchgeführt. Zusätzlich der oralen TNBS und epikutanen TNCB Toleranzinduktion wurde eine Gruppe von Mäusen 10 x mit 0,01 % DNFB in 200 μl PBS oral und eine weitere Gruppe epikutan mit 10 x mit 0,01 % DNCB epikutan tolerisiert. Im Folgenden wurden alle Gruppen mit 3000 μg TNBS in 150 μl AOO (4:1) sensibilisiert und 5 Tage später die Darmentzündung mit 2500 μg TNBS in 25 % EtOH/ H₂O rektal ausgelöst. (A, C) Gepoolte Daten der Mini-Endoskopie aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen der (A) oralen und (B) epikutanen Toleranzinduktion. (B, D) Die Messung der T-Zell-Proliferation nach Hapten-spezifischer Restimulation nach [^3H]-Thymidin-Einbau in die Zellen der axillären, inguinalen und zervikalen LK. (n.s.= nicht signifikant, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$).

Gemessen anhand der *in vivo* und *in vitro* Immunantworten kann der Toleranzeffekt dementsprechend mit einem zweiten, unabhängigen Hapten nicht ausgelöst werden. Die regulatorische Funktion der NZT zur Inhibierung einer Colitis ist somit Antigen-unspezifisch.

Dieser Versuch zeigt, dass die NZT-Induktion in einer TNBS-induzierten Colitis Hapten-spezifisch ist. In dem NZT-Modell zur Verhinderung der CHS konnte jedoch bereits festgestellt werden, dass die NZT zwar in einer Hapten-spezifischen Toleranz mündet, jedoch die Aktivierung der CD4⁺CD25⁺ Tregs während der Induktionsphase der NZT Hapten-unspezifisch erfolgt. In einem Versuchsansatz soll nun überprüft werden, ob diese Hapten-unspezifität auch Einfluss auf den Krankheitsverlauf in spontan auftretenden Autoimmunerkrankungen haben kann

3.4 Einfluss der NZT auf Autoimmunerkrankungen am Beispiel des Diabetes Typ I

Vorherige Arbeiten im NZT/ CHS Modell konnten zeigen, dass während der Induktionsphase eine Hapten-unspezifische Aktivierung der Tregs bewirkt wird. Anhand eines Mausmodells in dem eine spontane Autoimmunerkrankung auftritt, sollte überprüft werden, ob eine NZT-Induktion Einfluss auf den Beginn einer Autoimmunerkrankung nehmen kann. Hierzu wurde das Modell des Diabetes mellitus Typ I gewählt. Die NOD-Maus stellt das murine Modell zum humanen Typ I Diabetes dar¹¹⁸. Bis zu 80% der weiblichen NOD-Mäuse (20% der Männchen) erkranken ab dem Alter von 10-12 Wochen an einem spontanen Typ I Diabetes¹¹⁸.

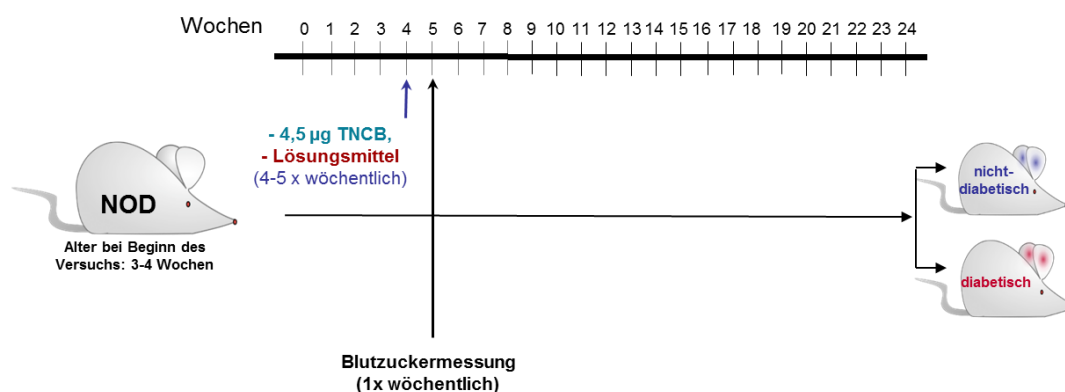


Abbildung 30: Protokoll der NZT-Induktion in NOD-Mäusen.

Junge, weibliche NOD-Mäuse werden, sobald sie von ihren Muttertieren getrennt werden (3-4 Wochen), 4-5 x wöchentlich auf rasierte, immer wechselnde Areale auf der Haut mit 4,5µg TNCB in 15 µl AOO toleriert. Die Kontroll-Gruppe erhält 15 µl reines Lösungsmittel (AOO). 24 Wochen lang wird 1 x wöchentlich eine Blutzuckermessung in mg/dl aus einem Blutstropfen der Schwanzvene durchgeführt um zu überprüfen, ob eine Maus diabetisch geworden ist. Mäuse gelten als diabetisch sobald der Blutzuckerwert 2 x 250 mg/dl übersteigt.

Weibchen aus größeren Würfen werden nach dem Absetzen von den Muttertieren (3-4 Wochen) in zwei Gruppen unterteilt. Einer Gruppe wird 6 Monate lang (24 Wochen) 4-5 x pro Woche 4,5 µg TNCB auf die Haut appliziert, während die andere Gruppe reines Lösungsmittel erhält (15 µl AOO; Abb. 30). Wöchentlich wird überprüft, ob die Mäuse diabetisch geworden sind, indem ihr Blutzuckerspiegel aus einem Blutstropfen aus der Schwanzvene mit einem Blutzuckermessgerät überprüft wird. Eine Maus wird als diabetisch eingestuft, sobald der Blutzuckerspiegel 2 x 250 mg/dl beträgt. Die Versuchsdauer beträgt 6 Monate (24 Wochen).

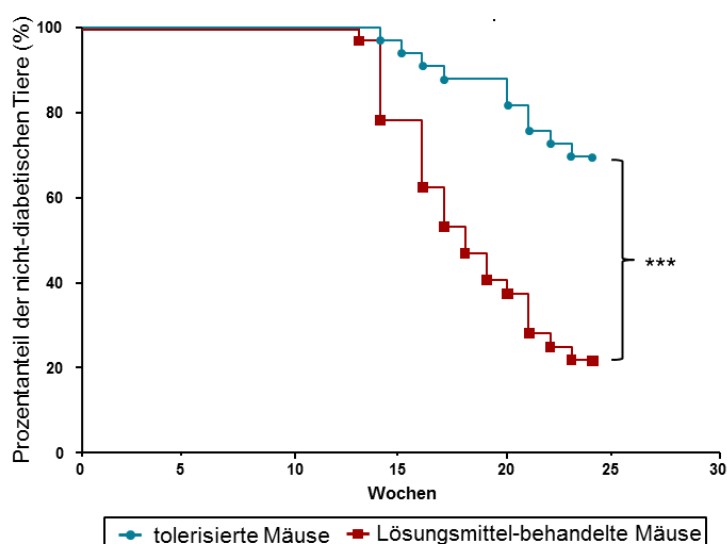


Abbildung 31: Einfluss der NZT auf den Erkrankungsstatus in NOD-Mäusen.

Mäuse wurden über 24 Wochen 4 – 5 x wöchentlich mit 4,5 µg TNCB toleriert bzw. mit Lösungsmittel behandelt. Wöchentlich wurde der Blutzuckerwert der Mäuse erhoben und die Tiere als nicht-diabetisch / diabetisch eingestuft. Der Ausbruch eines Diabetes lag vor, sobald die Mäuse 2 x einen Wert über 250 mg/dl zeigten. Die Abbildung zeigt den Anteil der Mäuse, die keinen Diabetes ausgebildet haben nach Tolerisierung bzw. Lösungsmittel-Behandlung über den Verlauf der 24 Wochen. Zu Beginn sind alle Mäuse Diabetes-frei. Es werden die gepoolten Daten aus 4 unabhängigen Versuchen (tolerisierte Tiere n=33; Lösungsmittelbehandelte Tiere n=32 Tiere) Für die Berechnung der statistischen Signifikanz verwendet wurde der Wilcoxon-Test verwendet: ***: p = <0,001).

Die Induktion einer NZT hat einen protektiven Einfluss auf den Ausbruch eines spontanen Diabetes mellitus Typ I in jungen NOD-Mäusen (Abb. 31). Bei beiden Gruppen traten nach ca. 13 Wochen die ersten Tiere mit einem abnormalen Blutzuckerspiegel auf. Nach 24 Wochen sind 78,2 % der Lösungsmittelbehandelten Tiere diabetisch, während in der NZT-Gruppe nur in 30,3 % der Tiere eine spontane Diabeteserkrankung auftrat. Daraus lässt sich schließen, dass eine NZT-Induktion einen positiven Einfluss auf die Entstehung einer spontan auftretenden Autoimmunerkrankung hat.

DISKUSSION

4.1 **Interaktion der Tregs mit CD11c⁺ DCs über gap junctions in der NZT im Modell der CHS**

Das Modell der NZT und die zugrundeliegenden Immunmechanismen wie eine NZT eine CHS verhindern kann, wurde in den vergangenen Jahren von der AG Steinbrink erforscht^{74, 75, 77, 78}. Es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs als auch CD11c⁺ DCs und CD8⁺ Tc2 Zellen maßgeblich an der Induktion einer NZT beteiligt sind. Mit jeder dieser Zellpopulationen (CD8⁺CD11c⁺ DCs, CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁺Tregs) war es möglich, den Toleranzeffekt der NZT auf naive Mäuse zu übertragen^{74, 75, 77}. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Zellpopulationen hintereinander geschaltet sind. So war es zum Beispiel nicht möglich, eine NZT durch einen AT von CD11c⁺ DCs in einer Maus zu generieren, wenn die Tregs mittels PC61 Antikörper zuvor aus der Maus depletiert worden waren⁷⁴. Weiterhin war es auch nicht möglich, die NZT auf eine naive Maus zu übertragen, wenn CD8⁺ T-Zellen (die Effektorzellen der NZT) aus Mäusen aufgereinigt wurden, die zuvor von den CD11c⁺ DCs depletiert wurden. Hieraus wurde die Annahme aufgestellt, dass es sich um eine Hintereinanderschaltung der Zellpopulationen handelt. Angenommen wurde, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs und deren sezerniertes IL-10 direkt auf CD11c⁺ DCs wirken und einen tolerogenen Phänotyp prägen, welche dann in dem Prozess der Differenzierung der regulatorischen CD8⁺ T-Zellen der NZT involviert sind⁷⁴. Ein Experiment in dieser Arbeit sollte nun offenlegen, ob die Tregs und CD11c⁺ DCs direkt miteinander interagieren. Dass eine Interaktion von DCs zusammen mit Tregs wichtig für die Initiation einer Toleranz sein kann, ist bereits bekannt¹³⁶⁻¹³⁹. Es gibt mehrere Möglichkeiten wie Tregs auf die Differentiation von

DCs einwirken können, z.B. dass Tregs die Reifung der DCs durch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 verhindern können, indem sie die Expression der kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 vermindern und dies zu einer verminderten Antigenpräsentation führt, was wiederum die Proliferation von T-Effektorzellen reduziert ^{74, 140-144}. Onishi et al. zeigte 2008 *in vitro*, dass diese Effekte scheinbar abhängig von der Formation einer Anhäufung/ Aggregatbildung zwischen DCs und Tregs sei und die Tregs die DCs so vor konventionellen T-Zellen abschirmen¹⁴⁵. Diese Beobachtung passt auch in unseren Versuchsansatz, in dem wir mittels AT-Versuch zeigen konnten, dass es zu einer vermehrten Clusterbildung von CD11c⁺DCs aus tolerierten Mäusen mit Tregs in sensibilisierten Mäusen kommt im Vergleich zu nicht tolerierten CD11c⁺DCs aus Kontroll-Tieren (siehe 3.1.2). Um einen direkten Zell-Zell Kontakt der Tregs mit den DCs zu belegen, zogen wir den Farbstoff Calcein heran, der über gap junctions auf andere Zellen übertragen werden kann, sobald sie eine Verbindung eingehen⁶⁴.

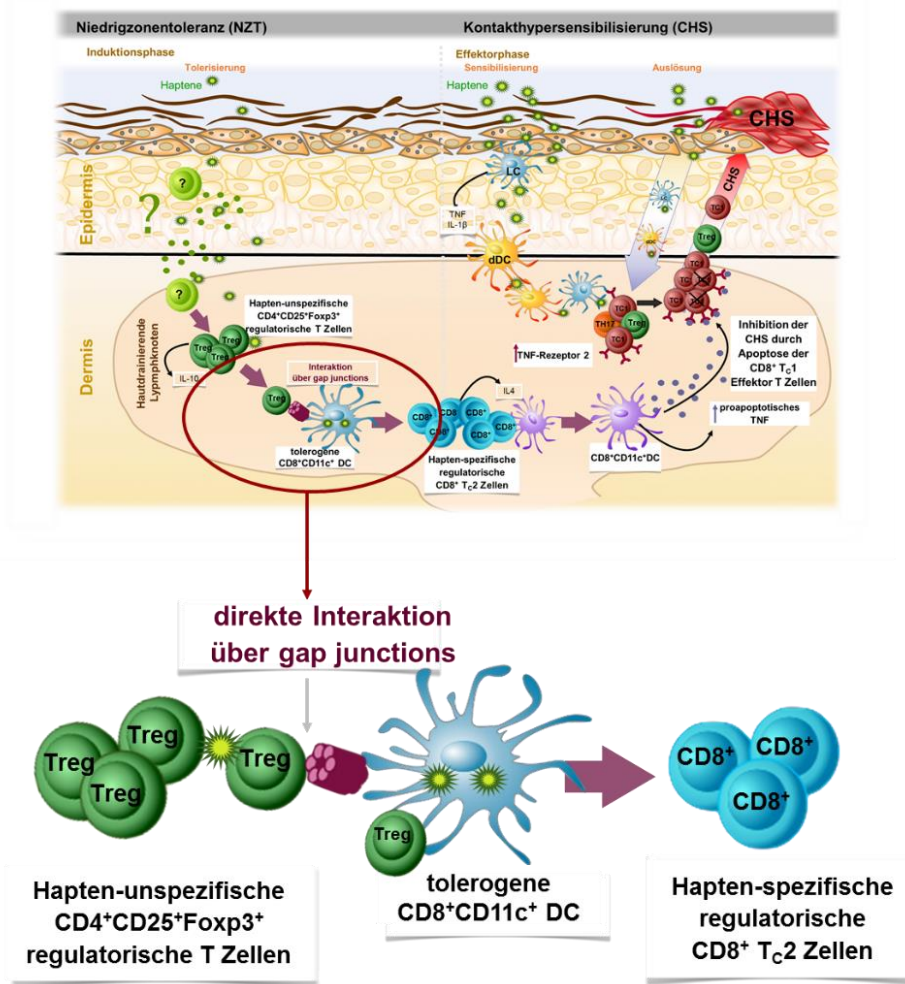


Abbildung 32: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs interagieren über gap junctions mit tolerogenen CD8⁺CD11c⁺ DCs in der NZT. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs prägen den tolerogenen Phänotyp der CD8⁺CD11c⁺ DCs über die direkte Interaktion über gap junctions.

Gap junctions sind Kanäle, die durch Proteinfamilie der Connexine gebildet werden^{146, 147}. Sie dienen zum Austausch von Signalen (Kommunikation) zweier Zellen und übertragen Ionen oder kleine Moleküle durch Diffusion, wie z.B. Kalium-oder Calcium-Ionen, aber auch sekundäre Botenstoffe, wie cAMP, cGMP oder IP3¹⁴⁷. Gap junctions wurden zuvor als unselektive Poren bezeichnet (für kleine Moleküle unter 1 kDa). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene Connexine zum Teil eine unterschiedliche Spezifität der gap junctions prägen^{147, 148}. Verschiedene Kombinationen der Connexine führen entweder zu einer Bevorzugung von Kationen bzw. Anionen, noch dazu ist das Öffnen der Kanäle ein durch Spannungsunterschiede regulierter Prozess¹⁴⁶. Bopp et al. konnten zeigen, dass die direkte Übertragung des sekundären Botenstoff cAMP aus Tregs durch Ausbildung von gap junctions zu einer Suppression von T-Zellen führt^{61, 64}. Bei DC-DC Zellkontakt wurden gap junctions zunächst nur eine proinflammatorische Rolle zugesprochen, indem über sie ein Antigentransfer ermöglicht wurde und es so zu einer Aktivierung von DCs gekommen ist¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Dass auch eine Kommunikation zwischen Tregs und DCs, die Bildung von Effektor-CD8⁺ T-Zellen der CHS verhindert, konnte 2010 von Ring et al. gezeigt werden¹²⁷. Hier wurden naive Calcein-gefärbte Tregs in Mäuse injiziert und im Folgenden sensibilisiert. Es zeigte sich werden, dass Tregs und DCs miteinander über gap junctions kommunizieren und so die T-Zell-aktivierende Kapazität der DCs verringern¹²⁷. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Calcein-gefärbte Tregs aus tolerierten Mäusen vermehrt eine direkte Verbindung über gap junctions mit DCs in den LK eingehen und vermutlich so ihren tolerogenen Phänotyp prägen⁷⁴ (siehe 3.1.3). Hingegen konnte in anderen Immunzellen (B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) keine vermehrte Interaktion der Tregs über gap junctions nachgewiesen werden (siehe 3.1.3).

4.2 Orale und epikutane Toleranzinduktion in der TNBS-induzierten Colitis

In den vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine epikutane als auch eine orale NZT eine Tc1 medierte CHS verhindern kann⁷⁸. In der vorliegenden Arbeit sollte nun gezeigt werden, ob das orale und epikutane NZT-Modell auch auf ein weiteres, jedoch Th1/Th17-vermitteltes Krankheitsmodell übertragen werden kann.

Der Darm stellt das größte immunologische Gewebe im Körper dar und kommt mit einer Vielzahl von Antigenen in Kontakt. Die Toleranzmechanismen, die der Körper ausbildet, müssen somit sehr effektiv und spezifisch sein. Die TNBS-induzierte Colitis ist das murine Modell zu der Morbus Crohn-Erkrankung. Es ist eine CD4⁺ Th1/Th17-vermittelte Entzündungserkrankung des Darmes. Zwar gelten BL6/J Mäuse für eine Colitis weniger empfänglich als SJL/J oder Balb/c Mäuse, da diese aufgrund ihres genetischen Hintergrundes eher zu einer Colitis neigen^{108, 152}. Die Wahl in diesem Versuchsansatz fiel jedoch auf BL6/J Mäuse, da diese Mäuse ein intaktes Immunsystem aufweisen und eine Vielzahl transgener oder Knock-out Mäuse auf diesem Hintergrund zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine TNBS-induzierte Colitis in BL6/J Mäusen induziert werden (siehe 3.2.1). Ziel der Arbeit ist es, das etablierte Modell der epikutanen und oralen NZT in der CHS, ein Tc1-vermitteltes Krankheitsmodell der Haut, auf ein Th1/Th17-vermitteltes Krankheitsmodell des Darmes zu übertragen. Wie in Kapitel 3.3.1 bewiesen, ist es möglich, durch die mehrfache Gabe eines Kontaktallergens auf die Haut oder durch orale Verabreichung die Entzündungsreaktion im Darm zu unterdrücken und eine Toleranz gegenüber dem Kontaktallergen auszubilden.

Das Phänomen der oralen Toleranzinduktion und die einhergehende Unempfindlichkeit der T-Zellen auf ein Antigen mit einer Entzündung zu reagieren, ist seit langer Zeit bekannt. Es gibt dabei zwei verschiedene Mechanismen der oralen Toleranz, die mit der Art wie die T-Zelle auf ein Antigen trifft, zusammenhängen. Zum einen die funktionelle Inaktivierung (Anergie) oder tatsächliche Elimination der Zelle (Deletion), die nach einer oralen Gabe hoher Mengen eines Antigens zur Toleranz führt (Hochdosis) und zum anderen die aktive Immunsuppression durch die Induktion von iTregs und Th3, die durch die Gabe niedriger Dosen des Antigens induziert wird (Niedrigdosis)⁶⁸. Vielfach wird in Veröffentlichungen, in denen die orale Toleranz beschrieben wird, Proteine verwendet, um die Toleranzinduktion herbeizuführen. In unserem Modell wird die Toleranz induziert, indem Haptene (z.B. TNCB/TNBS) verwendet werden. Diese haben eine molekulare Masse unter <500 und müssen zunächst an ein (körpereigenes)

Protein binden, um von dem Immunsystem erkannt zu werden^{16, 17}. Bereits durchgeführte Studien zur Toleranzinduktion mit Haptenen nutzen im Gegensatz zu unserer Untersuchung weitestgehend hohe Dosen des Haptens, während in der vorliegenden Arbeit niedrige Dosen des Haptens verwendet wurden¹⁵³⁻¹⁵⁸. Eine abgeschwächte Entzündung im Darm nach oraler Gabe von TNBS wurde bereits 1996 von Elson et al. beobachtet¹⁵³. Obwohl Elson et al. diskutieren, dass es sich bei dem Ausbleiben der Entzündungssymptomen um eine Suppression durch eine Th2-vermittelte Zellreaktion handelt, wird hierfür kein direkter Beweis geliefert. Die verwendete Menge des oral verabreichten TNBS ist im Verhältnis zu unserem Protokoll hoch. Es wurde nur zweimal eine Gabe von 10 mg TNBS (insgesamt 20 mg) verabreicht, während in der vorliegenden Arbeit zur Toleranzinduktion (verteilt auf 10 Tage) insgesamt weniger als 1 mg TNBS zur Toleranzinduktion verabreicht wurde. Da kein direkter Beweis für eine Th2-vermittelte Suppression vorliegt, sprechen die Ergebnisse eher für eine Toleranz durch Anergie oder Deletion, die nach Gabe einer Substanz in hoher Konzentration ausgelöst wird^{68, 80, 82}.

Eine Th2-vermittelte Suppression konnte von Neurath et al. gezeigt werden¹⁵⁴. Hier wurden niedrige Dosen von TNP-haptensierten Darmproteinen für eine Toleranzinduktion genutzt. Zur Generierung werden Därme unbehandelter Mäuse homogenisiert und in einer TNBS-Lösung inkubiert und nachfolgend Mäusen oral verabreicht. Hierdurch sollte eine Entzündungsreaktion im oberen Gastrointestinaltrakt verhindert werden. Die orale Toleranz äußerte sich *in vivo* durch eine verminderte Entzündungsreaktion im Darm, was mit den Beobachtungen in dieser Arbeit einhergeht (siehe 3.2.2) und *in vitro* durch eine reduzierte Proliferation der Lamina Propria CD4⁺ T-Zellen und der T-Zellen aus Peyerschen Plaques. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit CD4⁺ T-Zellen nicht spezifisch gefärbt, jedoch sah man in den histologischen Untersuchungen eine Infiltration von Lymphozyten in die Darmwand nach Colitis-Induktion, die hingegen in tolerisierten Mäusen reduziert ausfiel. Zusätzlich bildeten die oben beschriebenen, von Neurath et al., mit TNP-haptensierten Darmproteinen behandelten Mäuse ein antiinflammatorisches Th2 vermitteltes Zytokinprofil aus, welches durch eine erhöhte Sekretion von TGF- β , IL-4 und IL-10 aus T-Zellen sowie einer verminderten Produktion von INF- γ gekennzeichnet ist¹⁵⁴. Der Ansatz von Neurath *et al.* und der in dieser Arbeit verwendete Versuchsansatz unterscheiden sich zwar dadurch, dass Neurath *et al.* TNP-haptensiertes Protein verwendet hat, während in dieser Arbeit das Hapten TNBS benutzt wurde, jedoch ist es so bekannt, dass in einer Th2-Reaktion proinflammatorische Zytokine aktiv herunterreguliert werden. In diesem Kontext konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Inhibierung proinflammatorischer Zytokine wie INF- γ , IL-2 und IL-17, die sonst bei einer Th1 vermittelten

Immunantwort produziert werden, nachgewiesen werden (siehe 3.2.4). Bei der TNBS induzierten Colitis handelt es sich nicht ausschließlich um eine CD4⁺ Th1 Zell-vermittelte Immunantwort, obwohl sie im Jahr 1995 zunächst als eine solche charakterisiert wurde¹⁰⁷. Neurath et al. beschrieben, durch die Verwendung eines anti-IL-12 Antikörpers sowie eines anti-p-40 Antikörper, dass die Entzündung IL-12 abhängig ist^{107, 159}. IL-12 ist ein Heterodimer und besteht aus zwei Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40 und wird von APCs ausgeschüttet und stimuliert naive CD4⁺ T-Zellen¹⁶⁰. Jedoch muss beachtet werden, dass die Untereinheit p40 auch mit dem Zytokin IL-23 geteilt wird¹⁶⁰. IL-23 besitzt ebenfalls die Untereinheit p-40 und wurde dementsprechend in der oben genannten Veröffentlichung¹⁰⁷ mit depletiert. Es wird ebenfalls von APCs ausgeschüttet und die Wirkung wird bei der Verwendung von anti-p40 Antikörper ebenfalls neutralisiert. IL-23 reguliert die Produktion von IL-17 durch eine Subpopulation der Gedächtnis T-Zellen (Th17-Zellen). IL-17 hat vielfältige Eigenschaften. Es regt Fibroblasten und Makrophagen an, verschiedene proinflammatorische Zytokine (IL-1b, IL-6, TNF) und Chemokine auszuschütten, die Neutrophile anlocken, aber stimuliert auch die Produktion von antimikrobieller Substanzen^{111, 160-162}. Weitere Studien bestätigten eine Rolle von IL-17 in der TNBS induzierten Colitis^{111, 163}. Die TNBS-induzierte Colitis wird nun als eine CD4⁺ Th1/Th17-vermittelte Immunantwort angesehen^{112, 164}. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass das proinflammatorische Zytokin IL-17 nach einer Colitis-Induktion hochreguliert wird. Wurde jedoch eine NZT vor der Colitis-Induktion durchgeführt, wurde das Zytokin inhibiert.

Durch einen AT-Versuch von *in vivo* geprimten CD4⁺ T-Zellen aus Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis, die zuvor mit TNP-haptenisierten Darmproteinen oral tolerisiert wurden, konnte deutlich gemacht werden, dass eine Colitis unterdrückt werden kann¹⁵⁴. Da der Toleranzeffekt mittels AT übertragen werden konnte und es zu einer Hochregulation der Zytokine TGF- β , IL-4 und IL-10 sowie Inhibierung von IFN- γ kam, spricht das Ergebnis für eine aktive Suppression der Th1 Zellen. Neurath et al. wiesen durch die Verwendung eines Anti-TGF- β -Antikörpers außerdem nach, dass eine Suppression der Colitis von TGF- β abhängig ist¹⁵⁴. Übereinstimmend zu den Versuchen von Neurath et al. und unseren Versuchen konnte eine orale Toleranz durch die Fütterung niedrigen Konzentrationen von Haptenen gegenüber der Colitis auch in Ratten nachgewiesen werden¹⁶⁵. Die aktive Suppression der Th1 Reaktion und die vermehrte Ausschüttung von IL-10 deuten auf eine Beteiligung von Tregs hin, was in dieser Arbeit ebenfalls durch Depletions-Versuche gezeigt wird (siehe 3.3.1 + 3.3.2).

4.2.1 **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sind essentiell für die orale und epikutane NZT-Induktion**

Mittels Depletionsversuchen kann den CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs eine entscheidene Rolle in der Induktion einer NZT in der Colitis zugesprochen werden (siehe 3.3.1 + 3.3.2). Dies konnte einmal über den Ansatz durch die transiente Depletion der CD25⁺ T-Zellen mit dem anti-CD25 Antikörper PC61 während der Toleranzinduktion (siehe 3.3.1), aber auch durch die Depletion von Foxp3⁺ Tregs in DEREK-Mäusen durch DT-Injektion nachgewiesen werden (siehe 3.3.2). Die temporäre Depletion der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen wurde während der Versuche mittels durchflusszytometrischer Analyse überprüft, so dass deren Präsenz während der Tolerisierungsphase ausgeschlossen werden konnte. Dies spricht für eine aktive Induktion der Immunsuppression durch Tregs in der NZT^{66, 68, 166}.

In den jeweiligen Versuchsansätzen (PC61 und DEREK-Mäusen) konnte nach der Depletion der Tregs eine deutlich ausgeprägte Colitis-Reaktion und daher keine Induktion der NZT gemessen werden. Die Immunantworten (*in vivo* Endoskopie, *in vitro* T-Zell-Proliferation) ist in den jeweiligen Versuchsansätzen (siehe: 3.3.1.3 + 3.3.1.5 + 3.3.2) nahezu identisch. Durch intensive Nachforschungen konnte bereits in dem CHS Modell nachgewiesen werden, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen für die Induktion einer NZT zur Verhinderung einer CHS nötig sind⁷⁴.

In dem vorliegenden Modell ist im Vergleich zu den nicht tolerierten Mäusen, die nur eine Sensibilisierung erhalten haben, sogar eine erhöhte Immunreaktion zu erkennen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in dem NZT Modell gegenüber Kontaktallergenen zur Inhibierung einer Colitis durch die Depletion der Tregs der Schwellenwert für die Dosis einer Sensibilisierung herabgesetzt wird und die Mäuse während der eigentlichen Tolerisierung mehrmals sensibilisiert worden sind. Dies konnte durch verstärkte Reaktion in beiden Treg-depletierten Gruppen beobachtet werden. In den Colitis-Kontroll-Gruppen konnte nach Treg-Depletion keine Erhöhung festgestellt werden im Vergleich zu den IgG-behandelten Kontroll-Tieren. Daraus kann gefolgert werden, dass die Tregs vor der Sensibilisierung vollständig zurückgekehrt sind (auch bestätigt durch die durchflusszytometrische Analyse). In einem Versuch (PC61- depletierte Colitis-Gruppe in dem epikutanen Toleranzversuch; siehe 3.3.1.5) wurde eine erhöhte IFN- γ Zytokin-Produktion in den CD25-depletierten Colitis-Gruppe beobachtet (siehe Abb. 23D) Möglicherweise waren hier die Tregs noch nicht vollständig zurückgekehrt und sind in der Limitierung einer TNBS-induzierte Colitis involviert.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in dem NZT Modell gegenüber der CHS gemacht werden⁷⁴. In diesem Modell kam es ebenfalls zu einer überschießenden CHS Reaktion (stark

erhöhte Ohrschwellung und T-Zell-Proliferation) im Vergleich zur Kontroll-CHS Gruppe nach einer Depletion der Tregs während der Tolerisierungsphase durch den PC61-Antikörper, aber auch nach einer Reduktion der Tregs durch Cyclophosphamid, und somit zu einer Verhinderung der Entwicklung einer NZT^{74, 75}. Im Gegensatz dazu wurde jedoch in einem Allergietyp I Modell gezeigt, dass eine Tolerisierung nach Depletion der Tregs nicht ausreicht, um eine Sensibilisierung zu induzieren (gemessen durch Analysen der Mastzelldegranulation)¹⁶⁷.

Durch die Induktion von Tregs durch eine orale, nasale oder rektale Toleranz konnte bereits in anderen Tiermodellen Entzündungsreaktionen verhindert werden^{68, 168, 169}. In einem T-Zell-Transfer Modell der Colitis konnte außerdem gezeigt werden, dass der Transfer von naiven CD4⁺CD45RB^{high} T-Zellen in immundefizienten Mäusen zu einer Th1-vermittelten Colitis führt, gleichzeitiger Transfer von CD4⁺CD25⁺ Tregs, die Colitis jedoch verhindern kann¹⁷⁰⁻¹⁷². Zwar konnte in den LK keine erhöhte Anzahl der Tregs in den Haut-Drainierenden und mesenterialen LK nach NZT-Induktion festgestellt werden (siehe 3.3), es wurde aber eine funktionelle Differenzierung innerhalb der Treg-Population vermutet. Uhlig et al. untersuchten die relative Distribution von Tregs während der Ausheilung einer Colitis¹⁷³. Auch sie stellten fest, dass Foxp3⁺ Zellen in ähnlicher hoher Frequenz in den LK und in der Lamina Propria vorhanden sind.

4.2.2 Die Induktion der NZT ist IL-10 abhängig

Hinzufügend konnten Uhlig et al. feststellen, dass die Ausheilung IL-10 abhängig ist und dass IL-10 produzierende CD4⁺CD25⁺ T-Zellen vermehrt in der Lamina propria des Colons vorzufinden sind¹⁷³. Wir konnten feststellen, dass IL-10 notwendig ist für die orale und epikutane NZT, um eine Colitis zu verhindern, da in IL-10^{-/-} Mäusen keine Toleranzinduktion festgestellt werden konnte (siehe 3.3.3). IL-10 ist ein Zytokin mit hauptsächlich suppressiven Eigenschaften und es werden dem Zytokin in peripheren Toleranzmechanismen und in der Suppression von darmentzündlichen Erkrankungen (im Zusammenhang mit einer Interaktion von Tregs) diverse Funktionen zugesprochen. Während Neurath et al. zunächst eine Hochregulierung des Zytokins nach der Fütterung von haptenisierten Darmproteinen feststellen konnte, beobachtete Fuss et al., dass Tregs (die vor einer Colitis schützen können) zunächst TGF- β produzieren müssen^{88, 154}. Jedoch ist diese Ausschüttung IL-10-abhängig, damit proinflammatorische Th1 Zytokine herunterreguliert werden, die dann das immunregulierende TGF- β inhibieren⁸⁸. Es wurde außerdem beschrieben, dass IL-10 für die Aufrechterhaltung der

Foxp3 Expression und die suppressive Funktion der Tregs nötig ist, um vor einer Colitis zu schützen und eine Th17-mediierte Entzündung des Darmes zu verhindern^{171, 172, 174, 175}.

In anderen Autoimmunerkrankungen werden IL-10 produzierende Tregs ebenfalls beschrieben^{176, 177}. In der rheumatischen Arthritis zeigen IL10^{-/-} Mäuse eine erhöhte Immunreaktion¹⁷⁸. Patienten mit einer atopischen Dermatitis haben eine verringerte Anzahl an Tregs und IL-10 in den betroffenen Hautstellen¹⁷⁹.

In Studien zur oralen Toleranz gegenüber hoher Dosen von Kontaktallergen in einer CHS wurde eine funktionelle Rolle des IL-10 ausgeschlossen. Hingegen wurde hier aktivierten plasmazytoiden DCs eine zentrale Rolle zugeschrieben, indem sie zunächst CD8⁺ T-Zellen in der Leber und mesenterialen LK depletieren und im Folgenden eine suppressive Funktion der Tregs induzieren^{156, 180}.

In dem NZT/CHS Modell konnte hingegen gezeigt werden, dass IL-10 für die tolerogene Funktion von CD4⁺CD25⁺ Tregs nötig ist, um eine CHS zu verhindern⁷⁶. Wie in unserem NZT/Colitis Modell konnte zunächst in IL-10 defizienten Mäusen keine NZT induziert werden. Durch eine Rekonsitution von IL10^{-/-} CD4⁺ T-Zellen während der Induktionsphase der NZT konnte die Toleranz wieder hergestellt werden⁷⁶. In weiteren Studien wurden dann Vert-X Mäuse herangezogen, in denen man IL-10 produzierende Zellen durch eine GFP Expression identifizieren kann. Hier wurde ersichtlich, dass in tolerisierten Mäusen IL-10 vermehrt von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen produziert wurde. In weiteren AT-Versuchen wurden T-Zell-defiziente Rag1^{-/-}-Mäuse mit verschiedenen IL-10 sezernierenden Zellpopulationen rekonstituiert und es konnte so eine funktionelle Relevanz von IL-10 produzierenden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen deutlich gemacht werden⁷⁴.

4.2.3 Die epikutane NZT-Induktion in der TNBS-induzierten Colitis

Eine der interessantesten Beobachtungen in dieser Arbeit ist, dass nicht nur eine orale, sondern auch eine epikutane induzierte NZT eine Th1/Th17 CD4⁺ mediierte TNBS-induzierte Colitis verhindern kann. Bereits zuvor konnte in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine epikutane aber auch eine orale NZT-Induktion eine Tc1-vermittelte-kutane CHS verhindern kann und es wurde eine systemische Toleranzinduktion postuliert. Fügt man diese zwei Ergebnisse zusammen, scheint es irrelevant zu sein, über welche Route die NZT induziert wird. Die Toleranzinduktion durch eine NZT kann demnach unterschiedliche T-Zell-Antworten (CD8⁺Tc1 und CD4⁺Th1/Th17) in unterschiedlichen Organen, wie Haut und Darm inhibieren.

Naive T-Zellen rezirkulieren ständig durch LK, Milz und Peyers Patches. Sie sind aber im nichtlymphoiden Gewebe nicht vorzufinden. Wird eine T-Zelle durch ein Antigen aktiviert und folglich zu einer Effektor- oder Gedächtnis-T-Zelle, ändert sich ihre Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren (sogenannte Homingrezeptoren) und sie können in nichtlymphoide Gewebe einwandern¹⁸¹. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, der komplexe Interaktionen zwischen den Lymphozyten und Endothelzellen des jeweiligen Gewebes beinhaltet. Die Induktion der gewebespezifischen Homingrezeptoren erfolgt organabhängig in den drainieren LK für das jeweilige Gewebe. Das Integrin $\alpha 4\beta 7$ sowie der Chemokinrezeptor CCR9 vermittelt die Einwanderung von Lymphozyten und proinflammatorischen als auch von suppressiven T-Zellen in das nichtlymphoide Darmgewebe. Im Gegensatz dazu können E- und P-Selektin Liganden sowie der Chemokinrezeptor CCR4 und CCR10 für die Einwanderung von T-Zellen in die Haut genannt werden¹⁸²⁻¹⁸⁴. Studien machten deutlich, dass die Gewebeumgebung, im Besonderen lokale DCs wichtig sind für T-Zellen und einer gewebsspezifischen Migration¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Bei der Induktion einer oralen Toleranz zur Verhinderung einer Hautentzündung konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Prävention aufgehoben wird, sobald CCR9 oder $\alpha 4\beta 7$ nicht vorhanden sind¹⁸⁸. Anhand dieses Phänomen lässt sich schließen, dass sie an dem Priming der T-Zellen beteiligt sind. In einer weiteren Studie von Oyoshi et al. konnte gezeigt werden, dass obwohl in Abwesenheit von hautspezifischen CCR4 Homing-Rezeptoren eine Maus vor einer Entzündung der Haut verschont blieb, wenn oral sensibilisiert, aber im Folgenden epikutan die Auslösung stattfand¹⁸¹. Daraus kann gefolgert werden, dass die Darm-spezifischen Effektor T-Zellen und Tregs, abhängig von „neuen“ organspezifischen Mikromilieus des lymphoiden Gewebes reprogrammiert werden. Die Darm-spezifischen T-Zellen patrouillieren durch die lymphoiden Gewebe, wie z.B. Haut-Drainierende LK und bilden, wenn ihnen dasselbe Antigen über DCs präsentiert wird, zusätzliche Haut-spezifische Homing-Rezeptoren aus¹⁸¹. Dies veranlasst dann die Zellen, z.B. Tregs, chemotaktisch in die Haut einzuwandern, welche dann eine kutane Entzündung verhindern¹⁸¹. Anhand anderer Studien in einem viralen Immunisierungsprotokoll konnte ebenfalls eine zentrale Rolle in der Reprogrammierung von T-Zellen in den LK deutlich gemacht werden. Es wurde hierbei gezeigt, dass Antigen spezifische T-Zellen durch lymphoide Gewebe wandern und zusätzliche gewebespezifische Homingrezeptoren entwickeln, je nachdem in welchem LK-Gewebe sie aktiviert werden^{189, 190}. Diese Studien bestätigen die Beobachtungen in dieser Arbeit, dass es unabhängig von dem Ort der Tolerisierungsinduktion, der Ort der Auslösung der Entzündungsreaktion die organspezifische Reaktion kontrolliert.

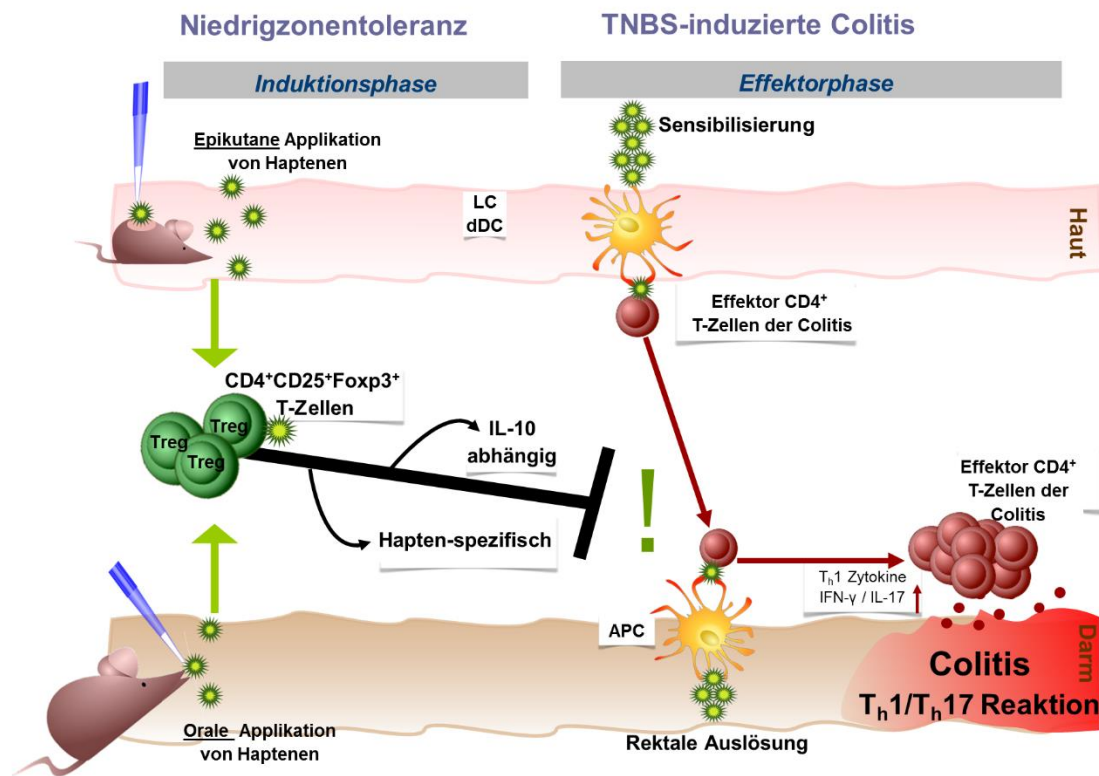


Abbildung 33: Übersicht der Mechanismen über die orale und epikutane NZT zur Verhinderung einer TNBS-induzierten Colitis.

Eine mehrmalige orale oder epikutane Applikation von subimmunogenen Mengen eines Kontaktallergens (TNBS/TNCB) verhindert eine Th1/Th17 vermittelte TNBS-induzierte Colitis. Für die Induktion der NZT sind CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs sowie IL-10 beteiligt. Der NZT zur Verhinderung der TNBS-induzierten Colitis ist Hapten-spezifisch.

4.2.4 Die Induktion der NZT zur Verhinderung einer TNBS-induzierten Colitis ist Hapten-spezifisch

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem weiteren Versuch gezeigt werden, dass die NZT, um eine TNBS-induzierte Colitis zu verhindern, spezifisch für das Hapten TNCB/TNBS ist (siehe 3.3.4). Dies konnte gezeigt werden, indem die Toleranzinduktion mit einem anderen Hapten DNFB/DNCB zu keiner Inhibierung der Colitis führte. In dem Modell der NZT zur Inhibierung einer CHS wurde durch AT-Versuche deutlich gemacht, dass die CD8⁺ Tc2 Effektorzellen der NZT den Toleranzeffekt Hapten-spezifisch auf naive Mäuse übertragen. Jedoch wurde bei einem anderen AT-Versuch, in dem CD4⁺CD25⁺ T-Zellen übertragen wurden festgestellt, dass hier noch keine Antigen-spezifität ausgebildet wurde⁷⁴. Es existieren hierzu verschiedene Publikationen, die zum einen Antigen-spezifische- bzw. Nicht-spezifische-Reaktionen verdeutlichen. Dubois et al. beschrieben z.B. eine Haptenspezifität von Tregs in einem oralen Toleranzmodell¹⁵⁵. Hingegen wurde in anderen Studien gezeigt, dass die Injektion

von naiven Tregs vor dem Auslösen einer Entzündungsreaktion eine folgende CHS verhindern kann^{62, 191, 192}.

Die unspezifische Wirkung der Tregs in dem Modell der NZT könnte dadurch erklärt werden, dass die Tregs auch IL-10 produzieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt, müssen diese Zellen zunächst mit APC (CD8⁺CD11c⁺DCs; siehe 3.1.2 + 3.1.3) in Kontakt treten, die an der Differenzierung und Aktivierung der Hapten-spezifischen CD8⁺ Tc2 Effektor Zellen der NZT beteiligt sind.

In einem weiteren Versuch dieser Arbeit sollte aufgrund dieser Beobachtungen in der CHS untersucht werden, ob die NZT auf andere Autoimmunerkrankungen Einfluss nehmen kann bevor sie entstehen. Hierzu wurde die NOD-Maus herangezogen, die die Autoimmunerkrankung des Diabetes mellitus Typ I widerspiegelt.

4.3 Die präventive Rolle der NZT in einem spontan auftretenden Autoimmunkrankheitsmodell

Durch eine frühzeitige und kontinuierliche epikutane Applikation von 4,5 µg TNCB konnte die Manifestation eines Diabetes mellitus Typ I in weiblichen NOD-Mäuse in einem Zeitraum von 26 Wochen signifikant reduziert werden (siehe 3.4). Die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen für dieses Phänomen wurden jedoch noch nicht weiter untersucht. Ein möglicher Ansatz zur Erklärung von diesem positiven Effekt der Toleranzinduktion könnte die bereits untersuchte Antigen-unspezifische Induktion der der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in der NZT gegenüber der CHS sein⁷⁴. Es besteht die Möglichkeit, dass durch die NZT-Induktion Tregs aktiviert werden und möglicherweise suppressiv auf die Entstehung des Diabetes mellitus Typ I in den NOD-Mäusen einwirkt. Dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs Einfluss an der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ I haben, konnte bereits daran gezeigt werden, dass die Depletion von Tregs in NOD-Mäusen zu einer raschen Entstehung eines Diabetes mellitus Typ I führt^{123, 125, 193-197}. Wurden Tregs hingegen transferiert, hatte dies einen positiven Einfluss auf die Entstehung bzw. den Krankheitsverlauf¹⁹³⁻¹⁹⁵. In den meisten Veröffentlichungen wurde dabei nicht darauf eingegangen, ob die Tregs dazu spezifisch auf das Inselzell-Antigen sein müssen und es wurden keine Inselantigen-spezifische Tregs verwendet, trotzdem wurde eine suppressive Funktion aufgezeigt^{125, 194}. In wenigen Studien wurde deutlich gemacht, dass Antigen-spezifische Tregs auf β-Zell Peptide wirksamer in der Verhinderung der

Autoimmunerkrankung sind als polyklonal aktivierte Tregs¹⁹³. Es ist somit möglich, dass eine Antigen-unspezifische Aktivierung der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs während der NZT-Induktion Tregs positiv auf die Suppression gegen andere Krankheitsbilder wie z.B. der Autoimmunerkrankung Diabetes mellitus Typ I auswirkt.

Dass eine orale Toleranzinduktion therapeutisch nutzbar ist, wurde bereits zuvor in Modellen gegenüber Autoimmunerkrankungen als auch gegenüber Nahrungsmittelallergien beschrieben^{81, 198-201}. Interessanterweise konnte zusätzlich in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine epikutane Toleranzinduktion effektiv vor einer entzündlichen Darmerkrankung sowie dem Diabetes mellitus Typ I schützen kann. Dementsprechend zeigt diese Arbeit Hinweise darauf, dass eine Toleranzinduktion durch eine epikutane Immuntherapie in Frage kommt. Einen ähnlichen Ansatz verfolgen bereits existierende Studien, die sich in der Phase I/IIb gegenüber IgE-medierte Typ I Allergien befinden^{202, 203}. Hierbei wird eine epikutane Immuntherapie (EPIT) durchgeführt, indem hohe Mengen eines Allergens auf die Haut aufgetragen werden und so eine IgE-vermittelte Allergie des Typ I verhindert werden kann^{202, 203}. Jedoch wurden Ansätze, wie in dieser Arbeit beschrieben, in denen die Verhinderung T-Zell-vermittelter Krankheiten sowie Autoimmunerkrankungen durch eine epikutane Toleranzinduktion im Fokus stehen, noch nicht verfolgt, jedoch bieten sie Potential für neue Therapiestrategien.

4.4 Zusammenfassende Übersicht

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Mechanismen der epikutan-induzierten NZT gegenüber der CD8⁺Tc1 meditierten CHS weiter aufgeschlüsselt werden konnten (direkte Interaktion der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen mit CD11c⁺ DCs über gap junctions).

Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass eine orale als auch eine epikutane NZT-Induktion nicht nur eine CD8⁺Tc1 vermittelte CHS, sondern auch eine CD4⁺ Th1/Th17 vermittelte TNBS-induzierte Colitits verhindern kann. Es wurde hierbei gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs maßgeblich an der Entstehung der NZT zur Inhibition der TNBS-induzierten Colitis beteiligt sind. Es wurde außerdem herausgefunden, dass die NZT gegenüber der Colitis von IL-10 abhängig ist und Antigen-spezifisch agiert.

Des Weiteren konnte eine frühzeitige, über Wochen-andauernde epikutane NZT- Induktion die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ I in der NOD-Maus signifikant reduzieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Niedrigzonentoleranz (NZT) wird durch die mehrfache orale oder epikutane Applikation von subimmunogenen Mengen eines Kontaktallergens (z. B. TNCB/TNBS) ausgelöst. Sie führt zu einer Toleranzentwicklung gegenüber Kontaktallergenen, wenn sie vor Sensibilisierung und folgender Auslösung in der Tc1-vermittelten Kontakthyper sensibilisierung (CHS; das murine Modell zur allergischen Kontaktdermatitis) induziert wird. In vorherigen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass IL-10 sezernierende CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Tregs) als auch CD11c⁺ DCs sowie CD8⁺ Suppressor Tc2-Zellen an der Induktion einer epikutan-induzierten NZT und damit der Verhinderung einer CHS beteiligt sind. Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchung konnte im CHS/NZT Modell gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion von Tregs mit CD11c⁺ DCs in den Haut-drainierenden Lymphknoten über gap junctions während der Induktionsphase der NZT erfolgt.

Als weiterer Ansatz wurde untersucht, inwieweit neben der Tc1 CD8⁺ T-Zell-vermittelten CHS auch eine Th1/Th17 CD4⁺ T-Zell-vermittelte Colitis durch eine epikutane oder orale NZT Induktion unterdrückt werden kann. Hierzu wurde das murine Modell der TNBS-induzierten Colitis verwendet, das den menschlichen Morbus Crohn widerspiegelt und ebenfalls durch eine CD4⁺ Th1/Th17-vermittelte Immunantwort gekennzeichnet ist. Die Induktion einer epikutanen und oralen NZT äußert sich in einer signifikant reduzierten Entzündungsreaktion der Colitis, die durch eine Mini-Endoskopie und Histologie bewertet wurden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte eine verminderte Th1/Th17-vermittelte T-Zell-Antwort nach Hapten-spezifischer Restimulation beobachtet werden. Zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen wurden Tregs vor NZT Induktion (entweder durch einen anti-CD25 Antikörper oder durch Verwendung von DEREK-Mäusen mittels Diphtherie-Toxin) *in vivo* depletiert. In Abwesenheit der Tregs entwickelt sich keine NZT, sondern eine verstärkte Entzündungsreaktion. Dementsprechend können Tregs in der Induktionsphase der NZT eine funktionelle Rolle zur Verhinderung einer Colitis zugesprochen werden. Darüber hinaus hat IL-10 eine präventive Rolle in der Induktion einer NZT, da in IL-10^{-/-} Mäusen keine NZT induziert werden konnte. Durch die Verwendung eines zweiten, nicht verwandten Haptens (DNFB/DNFB) bei der NZT-Induktion wurde ein Antigen-spezifischer Toleranzmechanismus festgestellt.

In einem dritten Modell wurde geprüft, ob durch die Induktion einer NZT, die Entstehung einer spontanen auftretenden Autoimmunerkrankung, wie dem Diabetes mellitus Typ I im NOD-Mausmodell, verhindert werden kann. Auch in diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das häufige und regelmäßige epikutane Auftragen von 4,5µg TNCB bei jungen NOD-Mäusen (3-4 Wochen), zu einer signifikanten Reduktion im Auftreten des Diabetes mellitus Typ I führte.

SUMMARY

Low zone tolerance (LZT) is induced by multiple oral or epicutaneous applications of subimmunogenic amounts of a contact allergen (e.g. TNCB/TNBS) and leads to tolerance development when applied before sensitization and subsequent challenge of a Tc1 mediated contact hypersensitivity (CHS; the murine model of human allergic contact dermatitis). In previous work it has been shown that IL-10 secreting CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) as well as CD11c⁺ DCs and also CD8⁺ suppressor Tc2 cells are involved in epicutaneous LZT induction resulting in CHS prevention.

In the present study we found that in the CHS/NZT model Tregs directly interacted with the CD11c⁺ DCs via gap junctions in the skin-draining lymph nodes during the induction phase of LZT.

In another approach it was investigated whether in addition to prevention of a Tc1 CD8⁺ T cell-mediated CHS also a Th1/Th17 CD4⁺ T-cell mediated TNBS-induced colitis (which mimics the Crohn's disease in man) could be affected by epicutaneous and oral LZT. Induction of epicutaneous and oral LZT resulted in a significant reduction in the clinical manifestation of the inflammatory colitis, which was evaluated by using a mini-endoscopy and histology. Consistent with these results, a decreased Th1/Th17-mediated T cell response after hapten-specific restimulation was observed. To investigate the underlying immunological mechanisms, mice were depleted of Tregs before LZT induction (by either using an anti-CD25 antibody or by using DERE mice with diphtheria toxin). In the absence of Tregs, LZT failed to develop, but a pronounced colitis response was observed. Accordingly, Tregs do have a functional role in the prevention of colitis during the induction phase of LZT. In addition, IL-10 has a functional role in the induction of LZT as tolerance induction was completely inhibited in IL-10^{-/-} mice. Use of a second, unrelated hapten (DNFB/ DNFB) for LZT induction revealed an antigen-specific tolerance mechanism.

In the third approach, it was investigated whether LZT to haptens is capable to inhibit the onset of a spontaneous autoimmune-disease, like Diabetes mellitus type I. Using young NOD-mice (3-4 weeks), as a murine model of spontaneous diabetes we found that repeated and continuous application of 4.5 µg TNBS onto the skin resulted in a significant reduction of the incidence of diabetes mellitus type I.

DANKSAGUNG

LITERATURVERZEICHNIS

1. Gell PGH, Coombs RRA. The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical aspects of Immunology: Oxford, Blackwell; 1963. 317-37 p.
2. Huber B. 100 Jahre Allergie: Clemens von Pirquet–sein Allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende Krankheitsverständnis. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118(19-20):573-9.
3. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454(7203):445-54.
4. Kay A. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(2):30-7.
5. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008;8(3):205-17.
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Health Sciences 2014. 400-5 p.
7. Becker D. Allergic contact dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013;11(7):607-21.
8. Mahler V, Geier J, Schnuch A. Current trends in patch testing–new data from the German Contact Dermatitis Research Group (DKG) and the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK). *J Dtsch Dermatol Ges* 2014;12(7):583-92.
9. Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api A, Arts J, Basketter D, English J, Diepgen T, Fuhlbrigge R, Gaspari A. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(5):763-81.
10. Schnuch A, Uter W, Geier J, Gefeller O. Epidemiology of contact allergy: an estimation of morbidity employing the clinical epidemiology and drug-utilization research (CE-DUR) approach. *Contact Dermatitis* 2002;47(1):32-9.
11. Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler W, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002;57(1):45-51.
12. Christensen AD, Haase C. Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS* 2012;120(1):1-27.

13. Honda T, Egawa G, Grabbe S, Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2013;133(2):303-15.
14. Roberts DW, Lepoittevin J-P. Hapten-protein interactions. The molecular basis. Heidelberg: Springer; 1998. 82-109 p.
15. De Groot AC. Patch testing: test concentrations and vehicles for 4350 chemicals. 3rd ed. Wapserveen: Acdegroot Publishing; 2008. 19-399 p.
16. Lepoittevin JP. Metabolism versus chemical transformation or pro-versus prehapten? *Contact Dermatitis* 2006;54(2):73-4.
17. Lepoittevin J-P, Karlberg A-T. Interactions of allergenic hydroperoxides with proteins: a radical mechanism? *Chem Res Toxicol* 1994;7(2):130-3.
18. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
19. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone A, Fathman CG, Inaba K, Steinman R. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989;169(3):1169-78.
20. Martin S, Esser P, Weber F, Jakob T, Freudenberg M, Schmidt M, Goebeler M. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2011;66(9):1152-63.
21. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D. Dynamics and function of langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating langerhans cells. *Immunity* 2005;22(5):643-54.
22. Weltzien HU, Moulon C, Martin S, Padovan E, Hartmann U, Kohler J. T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology* 1996;107(2):141-51.
23. Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang J, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 1990;145(9):2833-8.
24. Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012;12(2):114-24.
25. Xu H, DiIulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183(3):1001-12.

26. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN- γ and TNF- α . *J Immunol* 1999;162(1):494-502.
27. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002;17(3):375-87.
28. He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2006;177(10):6852-8.
29. Martin S, Lappin MB, Kohler J, Delattre V, Leicht C, Preckel T, Simon JC, Weltzien HU. Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2000;115(2):260-6.
30. Gaspari AA, Katz SI. Contact hypersensitivity. *Curr Protoc Immunol* 2001;4.2.1-4.2. 5.
31. Martin SF. Immunological mechanisms in allergic contact dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015;15(2):124-30.
32. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol* 2014;15(11):1064-9.
33. Mueller SN. Skin DCs cluster for efficient T cell activation. *Nat Immunol* 2014;15(11):1004-5.
34. Eyerich S, Zielinski CE. Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *Eur J Immunol* 2014;44(12):3475-83.
35. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003;3(11):867-78.
36. Liu J, Harberts E, Tammaro A, Girardi N, Filler RB, Fischelevich R, Temann A, Licona-Limón P, Girardi M, Flavell RA. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2014;134(7):1903-11.
37. Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Dürr C, Heimesaat MM, Bereswill S, Fejer G, Vassileva R. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J Exp Med* 2008;205(9):2151-62.
38. Weber FC, Esser PR, Müller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, Zeiser R, Idzko M, Jakob T, Martin SF. Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med* 2010;207(12):2609-19.
39. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol* 2010;11(1):14-20.

40. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2005;5(10):772-82.
41. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21(1):139-76.
42. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010;11(1):21-7.
43. Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74(2):179-85.
44. Schwartz RH. T Cell Anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21(1):305-34.
45. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, Appleby M, Der SD, Kang J, Chambers CA. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med* 2009;206(2):421-34.
46. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 2011;11(12):852-63.
47. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 2006;24:65-97.
48. Ju S-T, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, Ei-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373(6513):444-8.
49. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267(5203):1449-56.
50. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF- β -induced Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008;29(9):429-35.
51. de Lafaille MAC, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30(5):626-35.
52. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2(4):301-6.
53. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005;22(3):329-41.
54. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-j, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁻ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198(12):1875-86.

55. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005;6(12):1219-27.
56. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-6.
57. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007;19(4):345-54.
58. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 2011;186(7):3808-21.
59. Godfrey V, Wilkinson J, Russell L. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol* 1991;138(6):1379-87.
60. Becker C, Kubach J, Wijdenes J, Knop J, Jonuleit H. CD4-mediated functional activation of human CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2007;37(5):1217-23.
61. Bopp T, Dehzad N, Reuter S, Klein M, Ullrich N, Stassen M, Schild H, Buhl R, Schmitt E, Taube C. Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol* 2009;182(7):4017-24.
62. Ring S, Oliver SJ, Cronstein BN, Enk AH, Mahnke K. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(6):1287-96. e2.
63. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30(5):636-45.
64. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Heßling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007;204(6):1303-10.
65. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009;21(10):1105-11.
66. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389(6652):737-42.
67. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182(1):207-14.
68. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011;241(1):241-59.

69. Pletinckx K, Döhler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immunol* 2011;2(39):1-16.
70. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;3(11):947-54.
71. Grazia Roncarolo M, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212(1):28-50.
72. Steinbrink K, Kolde G, Sorg C, Macher E. Induction of low zone tolerance to contact allergens in mice does not require functional Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1996;107(2):243-7.
73. Seidel-Guyenot W, Alt R, Perschon S, Knop J, Steinbrink K. B cells are not required for T cell priming in low zone tolerance to contact allergens and contact hypersensitivity. *Eur J Immunol* 2004;34(11):3082-90.
74. Luckey U, Schmidt T, Pfender N, Romer M, Lorenz N, Martin SF, Bopp T, Schmitt E, Nikolaev A, Yogev N. Crosstalk of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells prevents contact allergy in subjects with low zone tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130(3):781-97. e11.
75. Steinbrink K, Sorg C, Macher E. Low zone tolerance to contact allergens in mice: a functional role for CD8+ T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1996;183(3):759-68.
76. Maurer M, Seidel-Guyenot W, Metz M, Knop J, Steinbrink K. Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *J Clin Invest* 2003;112(3):432-9.
77. Luckey U, Maurer M, Schmidt T, Lorenz N, Seebach B, Metz M, Steinbrink K. T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice from allergy. *J Clin Invest* 2011;121(10):3860-71.
78. Seidel-Guyenot W, Perschon S, Dechant N, Alt R, Knop J, Steinbrink K. Low zone tolerance induced by systemic application of allergens inhibits TC 1-mediated skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(5):1170-7.
79. Fukaya T, Takagi H, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Taya H, Shin T, Chen L, Dong C, Azuma M. Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood* 2010;116(13):2266-76.
80. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *PNAS* 1994;91(14):6688-92.
81. Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 2004;4(6):407-19.
82. Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA. Oral tolerance: immunologic mechanisms and

- treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994;12(1):809-37.
83. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005;307(5717):1920-5.
 84. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011;32(6):256-64.
 85. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *PNAS* 1992;89(1):421-5.
 86. Faria A, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005;206(1):232-59.
 87. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009;31(3):401-11.
 88. Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, Strober W. The interrelated roles of TGF- β and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol* 2002;168(2):900-8.
 89. Fujihashi K, Dohi T, Rennert PD, Yamamoto M, Koga T, Kiyono H, McGhee JR. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *PNAS* 2001;98(6):3310-5.
 90. Faria C, Ana M, Weiner HL. Oral tolerance and TGF- β -producing cells. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2006;5(3):179-90.
 91. Tsuji NM, Mizumachi K, Kurisaki Ji. Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 2001;103(4):458-64.
 92. Fairchild RL, Moorhead JW. Soluble factors in tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice: X. IL-2 is the activation signal mediating release of synthesized suppressor factor. *Cell Immunol* 1991;133(1):147-60.
 93. Claman HN. Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice V. Induction of tolerance with DNP compounds and with free and membrane-associated DNFB. *J Immunol* 1976;116(3):704-9.
 94. Gautam S, Battisto J. Feeding trinitrochlorobenzene inhibits development of hapten-specific cytotoxic T lymphocytes by interfering with helper T-cell function. *Reg Immunol* 1988;2(1):33-41.
 95. Desvignes C, Etchart N, Kehren J, Akiba I, Nicolas J-F, Kaiserlian D. Oral administration of hapten inhibits in vivo induction of specific cytotoxic CD8+ T cells mediating tissue inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 2000;164(5):2515-22.
 96. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16(6):933-43.

97. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12(30):4807-12.
98. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126(6):1504-17.
99. Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010;45(6):571-83.
100. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81(11):1462-71.
101. Halfvarson J, Jess T, Magnuson A, Montgomery SM, Orholm M, Tysk C, Binder V, Järnerot G. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a co-twin control study of a Swedish-Danish twin population. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(10):925-33.
102. Tsuji NM, Kosaka A. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol* 2008;29(11):532-40.
103. Herold G. Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung Gerd Herold; 2007. 430-7 p.
104. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3(7):521-33.
105. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(1):79-94.
106. Bamias G, Nyce MR, Sarah A, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005;143(12):895-904.
107. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182(5):1281-90.
108. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007;2(3):541-6.
109. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Delivery Rev* 2007;59(11):1073-83.
110. Torres M, Garcia-Martin M, Fernandez M, Nieto N, Gil A, Rios A. Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study. *Dig Dis Sci* 1999;44(12):2523-9.
111. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116(5):1310-6.
112. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009;58(8):1152-67.

113. Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2000;15(3):144-60.
114. MacDonald TT, Monteleone G. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 2001;22(5):244-7.
115. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2(1):56-64.
116. Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011;91(1):79-118.
117. Lieberman LS. Dietary, evolutionary, and modernizing influences on the prevalence of type 2 diabetes. *Annu Rev Nutr* 2003;23(1):345-77.
118. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005;23:447-85.
119. Makino Sa, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu Experimental animals* 1980;29(1):1-13.
120. Leiter EH. The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. *ILAR J* 1993;35(1):4-14.
121. Gagnerault M-C, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of β cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med* 2002;196(3):369-77.
122. Chen W, Xie A, Chan L. Mechanistic basis of immunotherapies for type 1 diabetes mellitus. *Transl Res* 2013;161(4):217-29.
123. Cabrera SM, Rigby MR, Mirmira RG. Targeting regulatory T cells in the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Curr Mol Med* 2012;12(10):1261-72.
124. Xiao J, Liu C, Li G, Peng S, Hu J, Qu L, Lv P, Zhang Y, Ma D, Chen Y. PDCD5 negatively regulates autoimmunity by upregulating FOXP3⁺ regulatory T cells and suppressing Th17 and Th1 responses. *J Autoimmun* 2013;47:34-44.
125. Tan T, Xiang Y, Chang C, Zhou Z. Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014;47(2):234-43.
126. Becker C, Fantini M, Wirtz S, Nikolaev A, Kiesslich R, Lehr H, Galle P, Neurath M. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* 2005;54(7):950-4.
127. Ring S, Karakhanova S, Johnson T, Enk AH, Mahnke K. Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(1):237-46.

128. Fonseca PC, Nihei OK, Savino W, Spray DC, Alves LA. Flow cytometry analysis of gap junction-mediated cell–cell communication: Advantages and pitfalls. *Cytometry Part A* 2006;69(6):487-93.
129. McHugh RS, Shevach EM. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(5):693-702.
130. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Sniijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1452-60.
131. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999;59(13):3128-33.
132. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182(1):58-67.
133. Suttmuller RP, Van Duivenvoorde LM, Van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. Synergism of cytotoxic T lymphocyte–associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001;194(6):823-32.
134. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+ CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 2003;198(6):889-901.
135. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, Hamann A, Wagner H, Huehn J, Sparwasser T. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 2007;204(1):57-63.
136. Thomson AW, Turnquist HR, Zahorchak AF, Raimondi G. Tolerogenic dendritic cell–regulatory T cell interaction and the promotion of transplant tolerance. *Transplantation* 2009;87(9):86-90.
137. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007;7(8):610-21.
138. Ezzelarab M, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin Immunol* 2011;23(4):252-63.
139. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 2010;108:111-65.
140. Veldhoen M, Moncrieffe H, Hocking RJ, Atkins CJ, Stockinger B. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 2006;176(10):6202-10.
141. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 2006;177(1):40-4.

142. Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, Radsak MP, Schmitt E, Bopp T, Schild H. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol* 2010;265(2):91-6.
143. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4⁺ CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172(8):4676-80.
144. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005;6(4):338-44.
145. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *PNAS* 2008;105(29):10113-8.
146. Scemes E, Suadiciani SO, Dahl G, Spray DC. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* 2007;3(03):199-208.
147. Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 2002;19(2):121-36.
148. Niessen H, Harz H, Bedner P, Kramer K, Willecke K. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *J Cell Sci* 2000;113(8):1365-72.
149. Matsue H, Yao J, Matsue K, Nagasaka A, Sugiyama H, Aoki R, Kitamura M, Shimada S. Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs. *J Immunol* 2006;176(1):181-90.
150. Mendoza-Naranjo A, Saéz PJ, Johansson CC, Ramírez M, Mandaković D, Pereda C, López MN, Kiessling R, Sáez JC, Salazar-Onfray F. Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *J Immunol* 2007;178(11):6949-57.
151. Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 2005;434(7029):83-8.
152. te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(10):995-9.
153. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: Mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 1996;157(5):2174-85.
154. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996;183(6):2605-16.

155. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas J-F, Kaiserlian D. Innate CD4+ CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 2003;102(9):3295-301.
156. Dubois B, Joubert G, de Agüero MG, Gouanvic M, Goubier A, Kaiserlian D. Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* 2009;137(3):1019-28.
157. Gautam SC, Battisto JR. Orally induced tolerance generates an efferently acting suppressor T cell and an acceptor T cell that together down-regulate contact sensitivity. *J Immunol* 1985;135(5):2975-83.
158. Gautam SC, Chikkala NF, Battisto JR. Oral administration of the contact sensitizer trinitrochlorobenzene: initial sensitization and subsequent appearance of a suppressor population. *Cell Immunol* 1990;125(2):437-48.
159. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26(4):934-8.
160. Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol* 1998;16(3-4):365-96.
161. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421(6924):744-8.
162. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198(12):1951-7.
163. Becker C, Dornhoff H, Neufert C, Fantini MC, Wirtz S, Huebner S, Nikolaev A, Lehr H-A, Murphy AJ, Valenzuela DM. Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 2006;177(5):2760-4.
164. Shale M, Ghosh S. Beyond TNF, Th1 and Th2 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2008;57(10):1349-51.
165. Ilan Y, Weksler-Zangen S, Ben-Horin S, Diment J, Sauter B, Rabbani E, Engelhardt D, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Goldin E. Treatment of experimental colitis by oral tolerance induction: a central role for suppressor lymphocytes. *Am J Gastroenterol* 2000;95(4):966-73.
166. Haribhai D, Lin W, Edwards B, Ziegelbauer J, Salzman NH, Carlson MR, Li S-H, Simpson PM, Chatila TA, Williams CB. A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J Immunol* 2009;182(6):3461-8.
167. van Wijk F, Knippels L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed Pharmacother* 2007;61(1):8-20.

168. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3(7):390-407.
169. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000;19(1):51-62.
170. Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005;204(1):184-94.
171. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190(7):995-1004.
172. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170(8):3939-43.
173. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ and IL-10-secreting CD4⁺ CD25⁺ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177(9):5852-60.
174. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009;10(11):1178-84.
175. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich J-M, Jack RS, Wunderlich FT, Brünig JC, Müller W. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 2011;34(4):566-78.
176. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19(1):683-765.
177. Nandakumar S, Miller CW, Kumaraguru U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clin Mol Allergy* 2009;7(5):1-8.
178. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(3):617-27.
179. Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(1):176-83.
180. Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, Trinchieri G, Kaiserlian D. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 2008;29(3):464-75.
181. Oyoshi MK, Elkhail A, Scott JE, Wurbel M-A, Hornick JL, Campbell JJ, Geha RS. Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. *J Clin Invest* 2011;121(6):2210-20.

182. Campbell J, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew D, Warnke R, Ruffing N, Kassam N. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999;400(6746):776-80.
183. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR) 4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 2001;194(10):1541-7.
184. Syrbe U, Hamann A. T-Zell-Retention im Gewebe. *Z Rheumatol* 2009;68(8):678-82.
185. Dudda JC, Simon JC, Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: Role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol* 2004;172(2):857-63.
186. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, Campbell DJ. Altering the distribution of Foxp3+ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med* 2007;204(6):1335-47.
187. Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: New concepts and future challenges. *Trends Immunol* 2006;27(5):235-43.
188. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, Sparwasser T, Snapper SB, Weiner HL, Mora JR. Gut-tropic T cells that express integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology* 2011;141(6):2109-18.
189. Liu L, Fuhlbrigge RC, Karibian K, Tian T, Kupper TS. Dynamic programming of CD8+ T cell trafficking after live viral immunization. *Immunity* 2006;25(3):511-20.
190. Liu L, Zhong Q, Tian T, Dubin K, Athale SK, Kupper TS. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med* 2010;16(2):224-7.
191. Gorbachev AV, Fairchild RL. Regulatory role of CD4+ T cells during the development of contact hypersensitivity responses. *Immunol Res* 2001;24(1):69-77.
192. Atarashi K, Mori T, Yoshiki R, Kabashima K, Kuma H, Tokura Y. Skin application of ketoprofen systemically suppresses contact hypersensitivity by inducing CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Dermatol Sci* 2009;53(3):216-21.
193. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199(11):1455-65.
194. Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, Khan M, Abbas AK, Walker LS. CD4+ CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol* 2004;173(5):2942-51.
195. Jaeckel E, von Boehmer H, Manns MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(2):306-10.

196. Weber SE, Harbertson J, Godebu E, Mros GA, Padrick RC, Carson BD, Ziegler SF, Bradley LM. Adaptive islet-specific regulatory CD4 T cells control autoimmune diabetes and mediate the disappearance of pathogenic Th1 cells in vivo. *J Immunol* 2006;176(8):4730-9.
197. Li CR, Baaten BJ, Bradley LM. Harnessing memory adaptive regulatory T cells to control autoimmunity in type 1 diabetes. *J Mol Cell Biol* 2012;4(1):38-47.
198. Kulis M, Burks AW. Oral immunotherapy for food allergy: Clinical and preclinical studies. *Adv Drug Delivery Rev* 2013;65(6):774-81.
199. O'Shea JJ, Laurence A, McInnes IB. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9(3):173-82.
200. Nadeau KC, Kohli A, Iyengar S, DeKruyff RH, Umetsu DT. Oral immunotherapy and anti-IgE antibody-adjunctive treatment for food allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2012;32(1):111-33.
201. Schiavi E, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, Boirivant M, Di Felice G. Oral therapeutic administration of a probiotic mixture suppresses established Th2 responses and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy. *Allergy* 2011;66(4):499-508.
202. Senti G, von Moos S, Kündig TM. Epicutaneous immunotherapy for aeroallergen and food allergy. *Curr Treat Options Allergy* 2013;17(1):68-78.
203. Senti G, Moos S, Tay F, Graf N, Johansen P, Kündig T. Determinants of efficacy and safety in epicutaneous allergen immunotherapy: summary of three clinical trials. *Allergy* 2015;70(6):707-10.

LEBENS LAUF