

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROFESSOR DR. HANS J. SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Depletion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen verändert
die intestinale Homöostase**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Böhm

2013

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROFESSOR DR. HANS J. SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Depletion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen verändert
die intestinale Homöostase**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Böhm

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Florian Obermeier
Tag der mündlichen Prüfung:	07.08.2013

Deletion of Foxp3⁺ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation

F. Böhm, M. Martin, R. Kesselring, G. Schiechl, E.K. Geissler, H.J. Schlitt, S. Fichtner-Feigl

Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universität Regensburg

Background:

Mice lacking Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells develop severe tissue inflammation in lung, skin, and liver with premature death, whereas the intestine remains uninfamed. This study aims to demonstrate the importance of Foxp3⁺ Treg for the activation of intestinal T cells and the development of intestinal inflammation.

Methods:

Foxp3-GFP-DTR (human diphtheria toxin receptor) C57BL/6 mice allow elimination of Foxp3⁺ Treg by treatment with DTx (diphtheria toxin). The influence of Foxp3⁺ Treg on intestinal inflammation was tested using the CD4⁺ T-cell transfer colitis model in Rag^{-/-}C57BL/6 mice and the acute DSS-colitis model.

Results:

Continuous depletion of Foxp3⁺ Treg in Foxp3-GFP-DTR mice led to dramatic weight loss and death of mice by day 28. After 10 days of depletion of Foxp3⁺ Treg, isolated CD4⁺ T-cells were activated and produced extensive amounts of IFN- γ , IL-13, and IL-17A. Transfer

of total CD4⁺ T-cells isolated from Foxp3-GFP-DTR mice did not result in any changes of intestinal homeostasis in Rag^{-/-}C57BL/6 mice.

However, administration of DTx, between days 14 and 18 after T-cell reconstitution, lead to elimination of Foxp3⁺ Treg and to immediate weight loss due to intestinal inflammation. This pro-inflammatory effect of Foxp3⁺ Treg depletion consecutively increased inflammatory cytokine production. Further, the depletion of Foxp3⁺ Treg from Foxp3-GFP-DTR mice increased the severity of acute DSS-colitis accompanied by 80% lethality of Treg-depleted mice. CD4⁺ effector T-cells from Foxp3⁺ Treg-depleted mice produced significantly more pro-inflammatory cytokines.

Conclusion:

Intermittent depletion of Foxp3⁺ Treg aggravates intestinal inflammatory responses demonstrating the importance of Foxp3⁺ Treg for the balance at the mucosal surface of the intestine.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Geschichte der Immunologie	1
1.2 Grundlagen der Immunologie	1
1.3 Rezessive und dominante immunologische Toleranz	2
1.4 Einteilung und Funktion CD4 ⁺ T-Lymphozyten	3
1.5 Foxp3-Mangel als Ursache für aggressive Autoimmunität	4
1.6 Mausmodelle als geeignete Untersuchungsmethode	7
1.7 Wirkmechanismus regulatorischer T-Zellen	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Mäuse	9
2.2 Induktion der Kolitis und Verlust von Foxp3 ⁺ Treg	9
2.3 Zellisolierung und Zytokinmessung	11
2.4 Immunhistochemie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung	15
2.5 Durchflusszytometrie/ Fluorescence-activated cell sorter	17
2.6 Statistische Analysen	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Gewichtskurve und Überleben unter Foxp3 ⁺ Treg Depletion in Foxp3-GFP-DTR Mäusen	21
3.2 Entzündungsaktivität in Lunge und Leber nach Foxp3 ⁺ Treg Depletion	23

3.3 Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen und deren Zytokinproduktion nach Foxp3 ⁺ Treg Depletion.....	25
3.4 Chronische T-Zell-vermittelte Darmentzündung nach Foxp3 ⁺ Treg Depletion	27
3.5 Verschlechterung der akuten Darmentzündung nach Foxp3 ⁺ Treg Depletion	31
4. Diskussion.....	36
4.1 Molekulare Manipulation im Foxp3-Gen	36
4.2 Persistierende Inflammation trotz erhöhter Anzahl Foxp3 ⁺ Treg.....	38
4.3 Regulation der intestinalen Homöostase.....	39
4.4 Medikamentöser Einfluss auf Foxp3 ⁺ Treg	41
4.5 Ausblick	42
5. Zusammenfassung	44
6. Literaturverzeichnis	45
7. Sonstiges.....	58
7.1 Danksagung	58
7.2 Lebenslauf.....	59
7.3 Eidesstattliche Erklärung	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation	11
Abbildung 2: Sandwich ELISA	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Fluorescence-activated cell sorters	18
Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Foxp3 ⁺ Treg nach 0, 24 und 72 Stunden nach Foxp3 ⁺ Treg Depletion	20
Abbildung 5: Gewichtskurve von Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung..	22
Abbildung 6: Kaplan Meier Überlebenskurve von Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-/ PBS- Behandlung	22
Abbildung 7: H&E-Färbung repräsentativer Lungen-, Leber- und Kolonabschnitte nach zehntägiger Foxp3 ⁺ Treg Depletion	24
Abbildung 8: Ki-67-Färbung repräsentativer Lungen-, Leber- und Kolonabschnitte nach zehntägiger Foxp3 ⁺ Treg Depletion	25
Abbildung 9: IFN- γ , IL-13 und IL-17A Produktion nach zehntägiger Foxp3 ⁺ Treg Depletion	26
Abbildung 10: IFN- γ , IL-13 und IL-17A Produktion nach zehntägiger Foxp3 ⁺ Treg Depletion	27
Abbildung 11: Gewichtskurve von Rag1 ^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung	28
Abbildung 12: Überlebenskurve von Rag1 ^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung	29
Abbildung 13: H&E-Färbung und Histologie Score repräsentativer Kolonquerschnitte an Tag 49 nach Transfer des CD4 ⁺ Zellpools	30
Abbildung 14: IFN- γ und IL-17A Produktion von Rag1 ^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung	31
Abbildung 15: Gewichtskurve von Rag1 ^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung	32
Abbildung 16: Überlebenskurve von Rag1 ^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung	33
Abbildung 17: H&E-Färbung und Histologie Score repräsentativer Kolonquerschnitte von DTx- und PBS-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen	34
Abbildung 18: IFN- γ und IL-17A Produktion von DTx- und PBS-behandelten Foxp3-GFP- DTR Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen	35

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zellen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DSS	Dextransulfat
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
DTx	Diphtherietoxin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
Foxp3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Forward Scatter = Vorwärtsstreulicht
GALT	gut-associated lymphoid tissue = darmassoziierte lymphatische Gewebe
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
H&E	Hämatoxylin und Eosin
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IPEX	Immunodysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, x-gekoppeltes Syndrom
MACS	magnetic activated cell sorting = magnetische Zellsortierung
n.d.	not determined = nicht nachweisbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate-Buffered Saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RAG	Recombination activating gene
SSC	Sideward Scatter = Seitwärtsstreulicht
TCR	T cell receptor = T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor = Transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	regulatorische T-Lymphozyten
nTreg	natürliche regulatorische T-Lymphozyten
iTreg	induzierbare regulatorische T-Lymphozyten

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Immunologie

Der britische Landarzt Edward Jenner (1749-1823) gilt als Begründer der Immunologie von heute. Im späten 18. Jahrhundert machte er die Entdeckung, dass eine Infektion mit der eher harmlos verlaufenden Krankheit Kuhpocken einen guten Schutz vor der gefährlichen Krankheit Pocken darstellte. 1796 konnte Edward Jenner den Schutz vor Pocken durch eine Impfung mit Kuhpocken beweisen. Obwohl er damit die Grundlagen für die Bekämpfung der Pocken schaffte, vergingen noch etwa 200 Jahre bis die Schutzimpfung gegen Pocken allen Menschen zugänglich war und die Ausrottung der Pocken 1979 durch die Weltgesundheitsorganisation ausgerufen werden konnte. Bis ins späte 19. Jahrhundert waren Erreger als Ursache von Krankheiten noch unbekannt. Erst durch die Untersuchungen Robert Kochs lernte man, dass Infektionskrankheiten durch Pathogene ausgelöst und weitergegeben werden. Durch ihn und andere Mikrobiologen seiner Zeit konnten Jenners Ansätze auf weitere Krankheiten übertragen werden. Seitdem ist unser Wissen über immunologische Vorgänge stark gewachsen, was sich auch in den zahlreichen Medizin-Nobelpreisen für immunologische Forschung widerspiegelt.¹

1.2 Grundlagen der Immunologie

Die physiologische Funktion des Immunsystems besteht im Schutz des Körpers vor Infektionen. Es kann einerseits zwischen ‚Selbst‘ und ‚Fremd‘ unterscheiden und andererseits Pathogene erfolgreich bekämpfen. Man unterscheidet grundsätzlich ein angeborenes,

natürliches von einem spezifischen, adaptiven Immunsystem. Die angeborene Immunantwort sorgt für die erste, schnelle Erregerabwehr. Sie ist unspezifisch und bietet keinen sicheren Schutz vor erneuter Infektion, da sich hier kein immunologisches Gedächtnis entwickelt. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und das Komplementsystem sind wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Das aktivierte adaptive Immunsystem sorgt dann für eine pathogen-spezifische Immunantwort. Essentiell sind hierbei B- und T-Lymphozyten. Nach Kontakt mit Antigenen durch APC proliferieren die einzelnen Lymphozyten und entsprechende Effektorsysteme werden aktiviert. Ebenso kommt es zur Differenzierung zu Gedächtniszellen.^{2,3}

1.3 Rezessive und dominante immunologische Toleranz

Die immunologische Toleranz beschreibt die Fähigkeit des Immunsystems, körpereigene Strukturen zu erkennen und eine Immunreaktion zu unterdrücken. Dies ist essentiell für die Verhinderung von Autoimmunerkrankungen. Sie wird durch zwei unterschiedlich organisierte immunologische Effektorsysteme vermittelt – rezessiv und dominant.⁴

Die rezessive Toleranz basiert auf intrinsischen Mechanismen, welche die Elimination von autoreaktiven Thymozyten oder chronisch stimulierten peripheren T-Zell-Klonen umfasst. Wichtige Effektoren sind hierbei die Apoptose und die Inaktivierung. Diese entsteht durch induzierten Aktivitätsmangel. Die dominante Toleranz, die auch zur Verhinderung von Autoimmunreaktionen führt, wird durch eine spezialisierte Teilmenge von Immunzellen vermittelt. Makrophagen, dendritische Zellen und B- und T-Lymphozyten spielen hierbei eine zentrale Rolle. Ein Teil davon differenziert zu Gedächtniszellen, wodurch bei erneuter Pathogen-Exposition eine effektivere Reaktion möglich ist. T-Lymphozyten kann man in

CD8⁺ zytotoxische Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen unterteilen. Bei der Immunreaktion gegen einige Pilze, Protozoen, Bakterien und Viren sowie Tumorzellen sind CD8⁺ Zellen entscheidend. Sie sind jedoch auch an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen beteiligt. Ob es zu einem Angriff einer körpereigenen oder körperfremden Zelle durch zytotoxische Zellen kommt, wird durch ein komplexes Kontrollsystem bestimmt. In diesem sind regulatorische T-Lymphozyten essentiell.⁵

1.4 Einteilung und Funktion CD4⁺ T-Lymphozyten

CD4⁺ T-Helferzellen können sich zu den Subpopulationen Th1, Th2, Th17 und Treg differenzieren. Th1-Zellen sezernieren Zytokine wie IL-2, IFN- γ und TNF α , β und leiten dadurch die spezifische Immunantwort ein. Die vor allem durch IFN- γ aktivierten Makrophagen eliminieren dann infizierte Zellen. Die zweite Aufgabe der CD4⁺ T-Zellen ist die Stimulation der Antikörperproduktion. Die zu Th2-Zellen differenzierten CD4⁺ T-Zellen geben durch Zytokinsekretion das Kosignal für die Differenzierung zur sezernierenden Plasmazelle. Th17-Zellen werden bei der Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien früh aktiviert und lösen wahrscheinlich durch Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine akute Entzündungsreaktion aus. Daneben scheinen sie eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen zu spielen.⁵

Regulatorische T-Lymphozyten stellen eine Untergruppe der CD4⁺ T-Lymphozyten dar, deren Aufgabe es ist, eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken. Sie begrenzen das Ausmaß einer immunologischen Reaktion und üben somit eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der dominanten immunologischen Toleranz gegen Selbst-Antigene aus. In einem gesunden Organismus wird dadurch die Entstehung von

Autoimmunerkrankungen verhindert. Eine Einteilung regulatorischer T-Lymphozyten in unterschiedliche Subpopulationen ist anhand unterschiedlicher Herkunft und Funktion möglich.

Die nTreg entstehen im Thymus aus $CD4^+$ T-Zellen, die große Mengen an CD25 und Foxp3 exprimieren. Hauptsächlich erkennen sie im Thymus exprimierte Autoantigene. Aufgrund ihrer starken suppressiven Wirkung gegenüber autoreaktiven T-Lymphozyten spielen sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Daneben werden iTreg aus $CD4^+$ T-Zellen in der Peripherie gebildet. Sie können durch alle Fremdanigene aktiviert werden und ermöglichen eine Überwachung allgemeiner Immunreaktionen, vor allem auch pathologischer Immunreaktionen. Diese inhomogene Gruppe kann aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften weiter in Untergruppen gegliedert werden. Die Th3-Zellen kommen im mukosalen Immunsystem vor und werden durch Antigenpräsentation in der Schleimhaut aktiviert. Ihre Aufgabe besteht in der Kontrolle von Immunantworten in der Darmmukosa. Wird diese natürliche Barriere gestört, kommt es zu Autoimmunerkrankungen. Daneben gibt es IL-10 produzierende Tr1-Zellen und TGF- β produzierende Th3-Zellen.⁶⁻¹³

1.5 Foxp3-Mangel als Ursache für aggressive Autoimmunität

Autoimmunerkrankungen entstehen durch einen Zusammenbruch der Mechanismen, die eine Selbsttoleranz aufrechterhalten. Sie betreffen einen erheblichen Anteil der Bevölkerung. Die Ätiologie der meisten Autoimmunerkrankungen ist weitgehend unklar. Es wird ein multifaktorielles Geschehen vermutet mit genetischen und umweltbedingten Einflüssen, was die Aufdeckung der zugrundeliegenden Pathogenese schwierig macht. Seltene monogenetische Autoimmunerkrankungen bieten jedoch eine große Chance, die

Mechanismen auch häufigerer Erkrankungen zu verstehen und neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten zu entwickeln. Studien haben eine Korrelation zwischen vielen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und Autoimmunerkrankungen gezeigt. Ein spezifisches Gen konnte noch nicht bestimmt werden. Potenzielle Loci betreffen Gene, die viele Aspekte des Immunsystems regulieren, wie Lymphozytenaktivierung, mikrobiologische Erkennung, Zytokine und Zytokinrezeptoren.

Das Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome (IPEX) ist ein seltenes x-chromosomales Syndrom, das zu einer schweren, systemischen autoimmunen Dysregulation führt. Die meisten Patienten mit IPEX leiden an Enteritis, Endokrinopathie und Dermatitis. Das Hauptsymptom ist oft eine schwere Diarrhoe mit Wachstumsretardierung, die einer parenteralen Ernährung bedarf. Histologisch zeigt der Darm eine Zottenatrophie und eine starke lymphatische Infiltration in der Schleimhaut. Häufige Endokrinopathien beim IPEX Syndrom sind die Hypothyreose und ein insulinpflichtiger Typ I Diabetes mellitus. Ähnlich zu den gastrointestinalen Erkrankungen haben Patienten mit Endokrinopathien inflammatorische Infiltrate in der Schilddrüse und im Pankreas mit Autoantikörpern gegen pankreatische Inselzellen. Zusätzlich zur diagnostischen Trias Enteritis, Endokrinopathie und Dermatitis können diese Patienten viele weitere Manifestationen haben, wie Zytopenie, Nierenerkrankungen und Hepatitis. Die Symptome des IPEX Syndroms können schubweise auftreten mit Exazerbationen beispielsweise bei Infektionen, Nahrungsmittelallergenen oder Impfungen. IPEX Patienten zeigen eine erhöhte Infektanfälligkeit auf Bakterien, Viren oder Pilze. Dieses Phänomen wird der verminderten Barriere an Schleimhäuten zugeschrieben. Die Entdeckung der genetischen Mutation des IPEX Syndroms wurde dank der Beobachtungen am Scurfy Mausmodell ermöglicht. Diese Scurfy-Mäuse zeigen eine schwere Autoimmunreaktion und Lymphozytenproliferation ähnlich zu den IPEX Patienten.

Foxp3 konnte als das mutierte Gen in Scurfy-Mäusen nachgewiesen werden.¹⁴⁻¹⁹

Obwohl mehrere lymphatische Subpopulationen suppressive oder immunmodulierende Eigenschaften besitzen, stellen Foxp3⁺ Treg die zur Zeit einzig bekannte Population von Lymphozyten dar, die sich als Mediatoren der dominanten Toleranz eignen. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Lymphozyten (Treg) essentiell ist.²⁰⁻²⁴

Regulatorische T-Lymphozyten sind CD4⁺, CD25⁺ und Foxp3⁺ Zellen, die funktionell anerg sind und nach Aktivierung Zytokine und Oberflächenmoleküle produzieren. Sie sind wichtig für die Unterdrückung der Immunantwort. Foxp3⁺ Zellen machen 10-15% der CD4⁺ Zellen aus und werden als entscheidende Mediatoren zur Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase gesehen.^{25,26}

Treg unterdrücken die Immunantwort mit Hilfe einer Vielzahl von Mechanismen, wie die Produktion antiinflammatorischer Zytokine, direkter Zell-Zell-Kontakt und die Modulation des Aktivitätsstatus und der Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen.²⁷

Loss-of-function-Mutationen in dem Gen, welches Foxp3 in Mäusen und Menschen kodiert, führen zu einem Verlust an Treg und zu fatalen Autoimmunreaktionen. Dies beginnt in sehr jungen Jahren und betrifft multiple Organe.²⁸ Die Identifizierung von Mutationen in dem für Foxp3-kodierenden Gen als Ursache für aggressive Autoimmunität bei humanen Patienten mit IPEX-Syndrom und in mutierten Scurfy-Mäusen hat eine genetische Grundlage für das Phänomen der Treg-vermittelten dominanten Toleranz geschaffen, ebenso wie die daraus folgende Entdeckung der essentiellen Funktion von Foxp3 in der Entwicklung der Treg.^{29,30}

1.6 Mausmodelle als geeignete Untersuchungsmethode

Beim Zusammenspiel von angeborenen und erworbenen Wirkmechanismen, sowie von regulierenden negativen Rückkopplungswegen bei der Immunantwort im Darm herrscht ein streng kontrolliertes Gleichgewicht.³¹⁻³⁴ Eine Zerstörung dieser Balance durch genetische Faktoren oder Umweltfaktoren kann zu chronischen Entzündungsreaktionen führen. Foxp3⁺ Treg spielen eine wichtige Rolle in der immunologischen Homöostase, da sie pathologische Immunantworten auf Umwelt- oder Autoantigene verhindern.²⁷

Die spontane Entwicklung einer intestinalen Entzündung in verschiedenartigen Mausmodellen sowie die Vielzahl möglicher ursächlicher Gene beim Menschen zeigen, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) durch komplexe Mechanismen reguliert werden. Viele Mausmodelle wurden zur genaueren Untersuchung dieser intestinalen Inflammation etabliert. Dazu gehören genetisch veränderte Mäuse, kongene Mausstämme, chemisch induzierte Modelle und Zelltransfer Modelle. Tiermodelle können die Pathogenese humaner Erkrankungen nicht vollständig widerspiegeln, aber sie liefern gute Voraussetzungen, um die Vorgänge bei Darmentzündungen besser zu untersuchen. Tatsächlich haben Tiermodelle in den letzten Jahrzehnten nicht nur zu unserem besseren Verständnis der Mechanismen von CED beigetragen, sondern auch nützliche therapeutische Ansätze für diese Erkrankung aufgezeigt. Mausmodelle mit intestinaler Inflammation haben eine Schlüsselrolle der Treg in der Aufrechterhaltung des intestinalen Gleichgewichts hervorgehoben. Dies wird im Modell einer T-Zell vermittelten Kolitis gezeigt, die durch den Transfer von naiven CD4⁺ T-Zellen in RAG^{-/-} Mäuse induziert wird.³²⁻³⁴ Die Krankheitsentwicklung kann durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺ Treg verhindert oder die Krankheit geheilt werden. Dieser Ansatz stellt somit ein lenkbares Modell dar.

Mit seiner Hilfe können Kontrollfaktoren der Akkumulation und Funktion der Kolitis auslösenden T-Zellen und Treg in vivo aufgedeckt werden.³⁵

1.7 Wirkmechanismus regulatorischer T-Zellen

iTreg erhalten permanent die Homöostase an der mukosalen Barriere im Kolon aufrecht. Ihre Bedeutung für die Entwicklung einer akuten und chronischen intestinalen Inflammation ist akzeptiert, der Wirkmechanismus jedoch unklar.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte der Foxp3⁺ Treg Depletion auf die Entwicklung einer intestinalen Inflammation in genetisch veränderten Mäusen zu zeigen. Die vorübergehende Depletion von Foxp3⁺ Treg resultiert in einer generellen Aktivierung von Effektor-T-Zellen ohne Differenzierung in eine spezifische T-Helferzellsubpopulation. Weiter bildet die Foxp3⁺ Treg Depletion die Basis für die Entwicklung einer schweren akuten DSS-Kolitis und einer chronischen T-Zell vermittelten intestinalen Inflammation.

2. Material und Methoden

2.1 Mäuse

Für die Versuche wurden spezifische pathogen-freie Foxp3-GFP-DTR (C57BL/6) Mäuse von A. Rudensky (Washington University/ Sloan-Kettering Institute) zur Verfügung gestellt. Foxp3-GFP Mäuse konnten freundlicherweise von M. Oukka (Washington University) bezogen werden. Rag1^{-/-} Mäuse stammten von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Sowohl Foxp3-GFP-DTR als auch Foxp3-GFP Mäuse zeigen eine normale T- und B-Zell-Entwicklung. Rag1^{-/-} Mäuse haben dagegen kleine lymphatische Organe, die keine reifen B- und T-Lymphozyten besitzen.

Rag1^{-/-} Mäuse, Foxp3-GFP-DTR und Foxp3-GFP Mäuse wurden in den Tierställen an der Universität Regensburg untergebracht. Die Mäuse hatten zu Versuchsbeginn ein mittleres Gewicht von 20 g und ein mittleres Alter von sechs bis acht Wochen. Beim Umgang mit den Tieren wurden die Richtlinien der Universität Regensburg zur Pflege und zum Umgang mit Labortieren eingehalten. Alle Tierversuche wurden von der Regierung des Bezirkes Oberpfalz genehmigt.

2.2 Induktion der Kolitis und Verlust von Foxp3⁺ Treg

Dextransulfat ist ein Natriumsalz, das bei Veresterung von Dextran mit Chlorschwefelsäure entsteht. Für eine 5% Lösung wurden 50 g des geruchlosen, weißen Pulvers in einem Liter Leitungswasser gelöst. Durch fünftägige Gabe von 5% DSS im Trinkwasser wurde die akute DSS-Kolitis vermutlich durch eine erhöhte Permeabilität der Epithelbarriere der

Kolonschleimhaut induziert.³⁶ An Tag 6 und 7 wurden die Tiere mit unbehandeltem Leitungswasser versorgt und sie begannen Pathologien wie Gewichtsverlust und hämorrhagische Diarrhoe zu entwickeln. Durch DSS-Gabe kam es zu klinischen und histologischen Auffälligkeiten, die mit denen von Colitis ulcerosa Patienten vergleichbar sind. Die Transferkolitis wurde durch intravenöse Gabe von $CD4^+CD62L^+CD25^-$ Zellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/Maus) in T- und B-Zell-defiziente $Rag1^{-/-}$ Mäuse erreicht.³⁷⁻³⁹ Diese Zellen wurden aus Foxp3-GFP-DTR oder Foxp3-GFP Mäusen gewonnen, wobei zunächst der gesamte $CD4^+$ Zellpool transfundiert wurde und anschließend eine Foxp3⁺ Treg Depletion mit DTx durchgeführt wurde. Somit konnte bei intakter immunologischer Homöostase an der intestinalen Mukosa zu Versuchsbeginn eine verspätete Foxp3⁺ Treg Depletion erreicht werden. Als Kontrollgruppen gab es mit PBS-behandelte $Rag1^{-/-}$ Mäuse nach Transfer von $CD4^+$ Zellen aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen beziehungsweise mit DTx behandelte $Rag1^{-/-}$ Mäuse nach Rekonstitution aus einer Foxp3-GFP Maus.

Die spezifische Depletion von Foxp3⁺ Treg wurde mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion von 10 µg DTx pro kg Körpergewicht in Foxp3-GFP-DTR Mäusen durchgeführt. Im Genom dieser Mäuse findet sich eine für den humanen DTx-Rezeptor kodierende Sequenz. Der DTx-Rezeptor ist an GFP kodierende Sequenzen sowie an eine interne ribosomale Eintrittsstelle gebunden. Diese Sequenz ist in die 3' untranslatierte Region von Foxp3 eingebaut, um Foxp3^{DTR} zu produzieren. Durch Bindung des DTx an den DTR wird die Kodierung von Foxp3 gestört und es können keine Foxp3⁺ Treg mehr gebildet werden. Die DTx-Gabe allein ist nicht ursächlich für den Verlust der epithelialen Integrität. Erst auf Grund der Foxp3⁺ Treg Depletion entsteht ein Ungleichgewicht in der Immunabwehr, was zu fatalen Autoimmunerkrankungen führt.²¹

2.3 Zellisolierung und Zytokinmessung

CD4⁺ Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und der Milz wurden durch immunmagnetische Separation (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert und für 48 Stunden unter Stimulation mit am Plattenboden gebundenem anti-CD3 Antikörper (10 µg/ml) und dem löslichen anti-CD28 Antikörper (1 µg/ml) kultiviert (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA). (Abb.1)

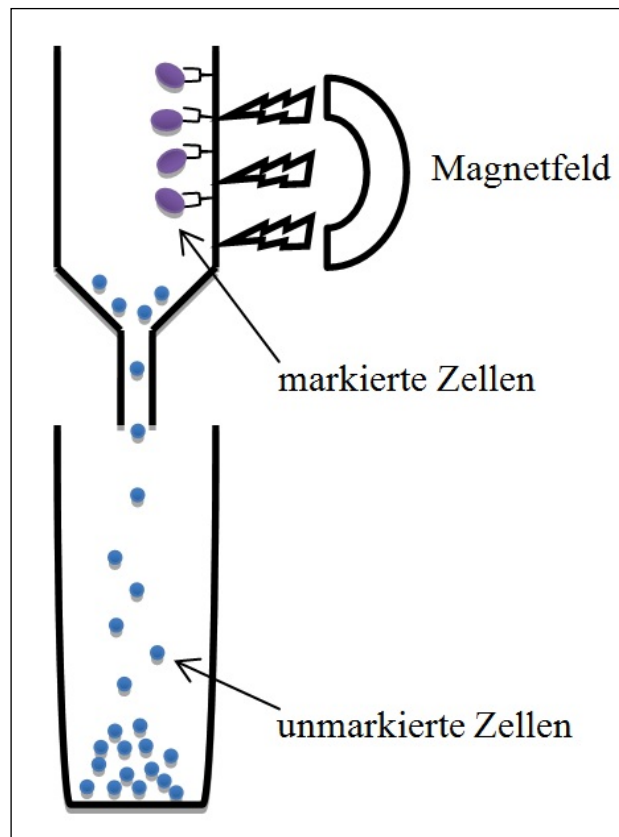


Abbildung 1: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation
(modifiziert nach Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D.
Der Experimentator, Immunologie. 2. Auflage. Spektrum Akademischer
Verlag. Heidelberg. ISBN: 9783827417305. 2006; S. 74.)

Die magnetische Zellisolierung ist ein geeignetes Verfahren zur Trennung einer großen Anzahl an Zellen nach bestimmten zellspezifischen Oberflächenmolekülen. Diese werden durch Magnetbead-gekoppelte Antikörper markiert. Man unterscheidet zwischen der magnetischen Markierung relevanter Zellen (Positiv-Selektion) und der Markierung irrelevanter Zellen (Negativ-Selektion). Diese vorbehandelte Zellsuspension wird durch eine ferromagnetische Matrix geschickt, die sich innerhalb eines Magnetfeldes befindet. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule und können als Eluat aufgefangen werden, während die markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten werden. Nach Entfernung des Magnetfeldes können auch die markierten Zellen eluiert werden, was einer Positiv-Selektion entspricht.⁴⁰⁻⁴³

Durch die Verwendung des CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden CD4⁺ T-Zellen der Maus durch Depletion der nicht-CD4⁺ T-Zellen isoliert, das heißt zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten (Negativ-Selektion). Nicht-CD4⁺ T-Zellen wurden indirekt magnetisch durch einen Cocktail an Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD8a (Ly-2), CD45R (B220), DX5, CD11b (Mac-1) und Ter-119 als primäres Markierungsreagent gekennzeichnet. Als sekundäres Markierungsreagent wurde ein monoklonaler anti-biotin Antikörper konjugiert an Micro-Beads verwendet. Zwischen diesen beiden Markierungsschritten war kein Waschvorgang nötig. Die magnetisch markierten nicht-CD4⁺ T-Zellen wurden aussortiert, indem sie auf der MACS-Säule im Magnetfeld des MACS Separators festgehalten wurden, während nicht-markierte CD4⁺ T-Zellen die Säule durchlaufen konnten (nach Angaben des Herstellers Miltenyi Biotec CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Bergisch Gladbach, Deutschland).

Diese CD4⁺ T-Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte im 96-Well-Format aufgetragen und für 48 Stunden unter Stimulation mit am Plattenboden gebundenem anti-CD3 Antikörper (10 µg/ml) und löslichem anti-CD28 Antikörper (1 µg/ml) kultiviert (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA). Um CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Lymphozyten zu erhalten, wurde die magnetische Zellisolierung mit dem CD25 MicroBead Kit von Miltenyi Biotec GmbH vor dem Ausplattieren wiederholt.

Nach 48 Stunden Kultivierung wurden die Zellen geerntet und die produzierten Zytokinkonzentrationen durch ELISA gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Es wurden ELISA kits von BD Biosciences (San Jose, Kalifornien, USA) und R&D Systems® (Minneapolis, Minnesota, USA) verwendet.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ist ein häufig angewandtes immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Reaktion basiert. Mittels colorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch nachweisbarer Substrate kann die Enzymaktivität bestimmt werden. Aufgrund des vorteilhaften Zeit- und Kostenaufwandes kommen colorimetrisch detektierbare Substrate am häufigsten zur Anwendung. Die vorhandene Antigenkonzentration wird anhand des Substratumsatzes bestimmt. Dabei bedient man sich der Eigenschaft spezifischer Antikörper, die am nachzuweisenden Antigen binden. Ein Enzym markiert das Antigen oder den Antikörper und katalysiert die Reaktion, welche als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient. Das Reaktionsprodukt wird durch Farbumschlag nachgewiesen und die Farbintensität im Photometer gemessen. Da sie eine Funktion der Antigenkonzentration ist, können quantitative Aussagen getroffen werden.⁴⁴⁻⁴⁸

In unserem Fall wurde ein sogenannter Sandwich-Assay verwendet, bei dem der antigenspezifische Antikörper auf der Platte bindet und mit der Antigen-Probe inkubiert,

nachdem unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Dies ermöglicht durch einfaches Waschen, freies Antigen von gebundenem Antigen zu trennen. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe können nach Zugabe eines weiteren Antikörpers gegen das Antigen, welches mit einem Enzym gekoppelt ist, photometrisch quantifiziert werden. Die Konzentration des gesuchten Antigens kann anhand des gebildeten Farbprodukts im Vergleich zur zugehörigen Standardkurve gemessen werden.⁴⁹ (Abb. 2)

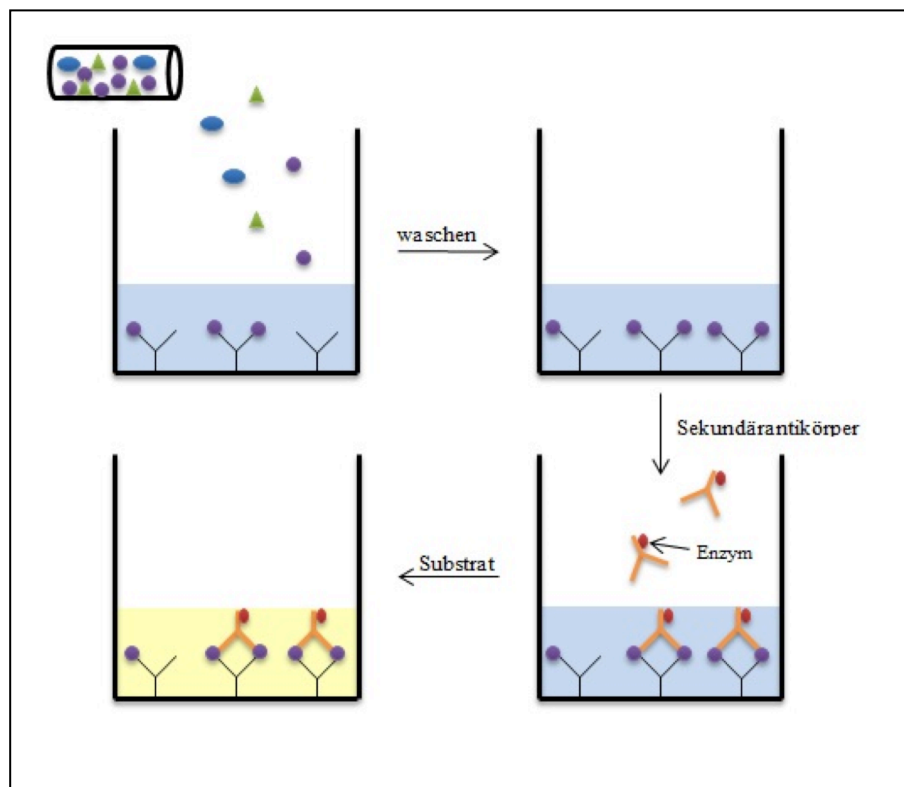


Abbildung 2: Sandwich ELISA

(modifiziert nach Lottspeich F, Engels JW. Bioanalytik. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. ISBN-13: 978-3827415202. 2006; S. 96.)

2.4 Immunhistochemie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Immunhistochemie wird zur Detektion von Antigenen im Gewebe durch Enzym-gekoppelte oder Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet. Durch die Affinität von Antikörpern zu einem bestimmten Epitop basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion ist der Nachweis von Antigenen möglich. Damit können bereits geringe Antigenmengen nachgewiesen werden. Als Primärantikörper bezeichnet man den Antikörper, der gegen das gesuchte Epitop gerichtet ist. Dieser ist durch hohe Spezifität und Affinität zum Epitop gekennzeichnet und weist keine Kreuzreaktionen zu ähnlichen Gewebeeigenschaften auf. In mehreren Schritten werden zwei weitere Antikörper hinzugefügt. Die Beurteilung der Immunhistochemie erfolgt auf morphologischer Basis.⁵⁰

Wir führten eine indirekte Immunhistochemie durch. Im ersten Schritt dieses Nachweisverfahrens wird das zu untersuchende Gewebe mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) inkubiert. Anschließend erfolgt im zweiten Schritt die Auftragung eines weiteren Antikörpers (Sekundärantikörper) der an den Primärantikörper bindet. Ein weiterer, tertiärer Antikörper, wird hinzugefügt, der nun gegen den Sekundärantikörper gerichtet ist und eine Signalverstärkung bewirkt. Der Tertiärantikörper ist in diesem Fall mit einem Enzym gekoppelt und ermöglicht die Bildung eines sichtbaren Farbstoffes durch eine Enzym-Substrat-Reaktion.

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Proben wurden entparaffiniert, rehydriert und mit 3% Hydrogenperoxidase in PBS Puffer vorbehandelt. Die Schnitte wurden mit anti-Ki-67 Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) für eine Stunde

bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ki-67 Antigen ist ein Kernprotein, das in jeder aktiven Phase des Zellzyklus exprimiert wird. Antikörper gegen das Ki-67 Antigen zeigen somit die Zellen, die sich in der Wachstumsphase befinden. Nach der Inkubation mit Biotin-konjugiertem sekundärem Antikörper und Streptavidin-HRP wurden positive Signale mit dem DAB Kit (BD Biosciences, San Jose, California, USA) sichtbar gemacht.

Außerdem wurden in Paraffin eingebettete Kolon-Abschnitte am Mikrotom geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen (vor allem Zellkerne) blau, nachdem er zu Hämalun aufbereitet wurde. Die Zytoplasmafärbung erfolgt in einer alkoholischen oder wässrigen Lösung von Eosin, da dieser synthetische saure Farbstoff alle acidophilen (eosinophilen) Strukturen rot färbt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 70 - 99% Ethanol wird dem histologischen Schnitt Wasser entzogen. Nach dem Klären mit Roti-Histol[®] (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) können die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt werden. Die lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate erfolgte an Geräten der Firma Zeiss (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland).

Für die Zählung von Entzündungsindices in behandelten Tieren und Mäusen der Kontrollgruppe wurden die H&E-Schnitte von Untersuchern, welche das Protokoll des Experimentes nicht kannten, nach bereits publizierten Auswertungssystemen für Kolitis ausgezählt.

2.5 Durchflusszytometrie/ Fluorescence-activated cell sorter

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei welchem physikalische und molekulare Eigenschaften von Partikeln, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, in einem Flüssigkeitsstrom einzeln gezählt und analysiert werden können.

Die Untersuchung basiert auf der Emission optischer Signale der Zelle bei Passage des Laserstrahls. Für die Messung werden die Zellen durch eine Kapillare angesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle, wodurch jeweils Streu- und Fluoreszenzlicht erzeugt wird. Die Menge des Streulichts korreliert mit der Größe und Granularität der Zellen und wird durch Photodetektoren gemessen. Granulozyten haben mit ihrer rauen Oberfläche und den vielen Vesikeln im Inneren eine deutlich höhere Lichtstreuung als T-Lymphozyten, da diese sehr glatt sind. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) ist vor allem von der Größe der Zelle abhängig, das heißt je größer die Zelle, desto größer das Vorwärtsstreulicht. Neben der Größe ist beim Seitwärtsstreulicht (SSC) auch die Granularität der Zelle wichtig. Eine Zelle mit hoher Granularität erzeugt ein großes Seitwärtsstreulicht. Das Punktdiagramm (dot plot) zeigt die Zellen nach Größe und Granularität aufgetrennt und ermöglicht eine Quantifizierung. In dieser zweidimensionalen Darstellung charakterisiert jeder Punkt im Diagramm eine Zelle. Bei der Analyse einer Zellpopulation wird das eindimensionale Histogramm verwendet, bei dem ein Messwert gegen die Häufigkeit der Zellen aufgetragen wird. Entsprechend der gemessenen Werte der Photodetektoren erhält jede Zelle entweder eine positive, negative oder keine Ladung. Dadurch kann sie mit Hilfe der nachgeschalteten Ablenkplatten abgelenkt und ins entsprechende Sammelröhrchen sortiert werden.

Dies ermöglicht eine Trennung von markierten, geladenen und nicht-markierten, ungeladenen Zellen. Zellen können somit über ihre spezifischen Oberflächenantigene nicht nur

identifiziert, sondern auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie sortiert werden. Da die eingesetzten Farbstoffe jeweils über ein charakteristisches Emissionsspektrum verfügen, ist eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Farbstoffen möglich, obwohl die Anregung bei gleicher Wellenlänge erfolgt.⁵¹⁻⁵⁵ (Abb. 3)

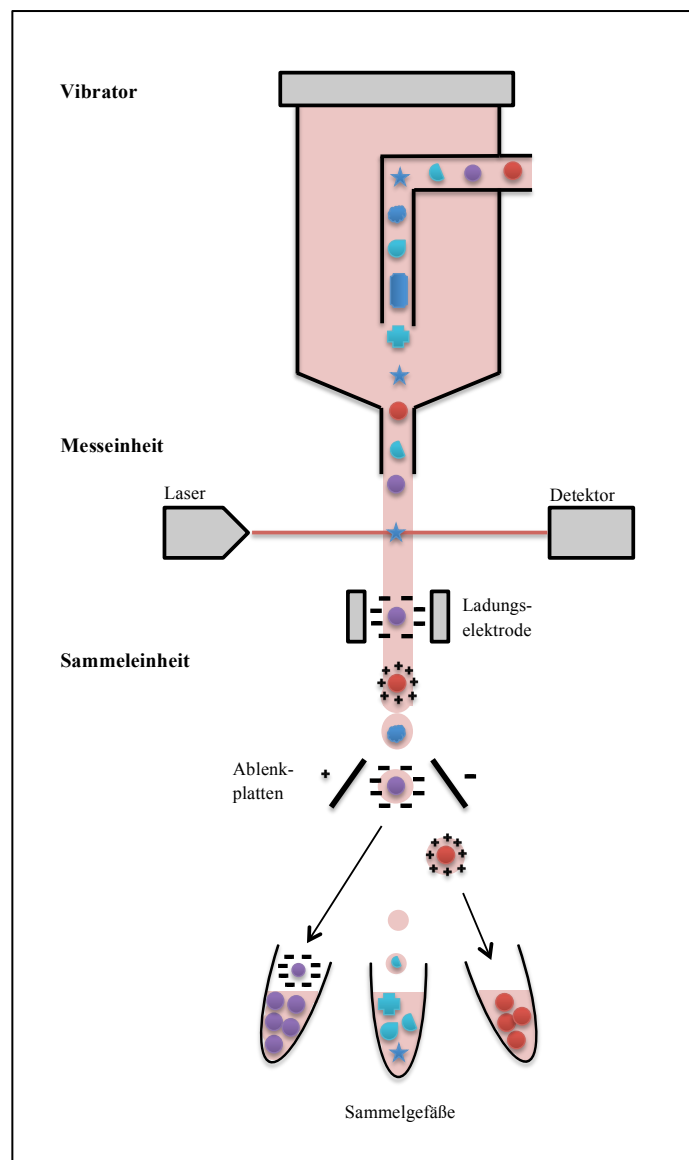


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Fluorescence-activated cell sorters (modifiziert nach Vollmar A, Dinger mann T. Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. WVG Stuttgart. ISBN 3-8047-2189-3. 2005; S. 428.)

In unserem Versuch wurden Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten und der Milz isoliert und anschließend eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Für die Färbung wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern für Maus anti-CD3- und anti-CD4-Antikörper (eBiosciences Inc., San Diego, Kalifornien, USA) dem Protokoll entsprechend behandelt. Foxp3 wurde mit Hilfe des genetisch festgelegten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) nachgewiesen. Nichtspezifisches Binden von Antikörpern wurde durch eine vorhergehende Inkubation mit Fcy-Block verhindert. Die Zellen wurden mit BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) vorbehandelt.

2.6 Statistische Analysen

Vor Durchführung der statistischen Auswertung wurde ein Test auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnow-Lilliefors-Test durchgeführt. Ein Wert von $p \leq 0.05$ wurde als normalverteilt betrachtet. Die normalverteilten Werte wurden mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test bewertet. Ein Wert von $p \leq 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für Werte, die keine Normalverteilung zeigten verwendeten wir den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur statistischen Auswertung.

Zum Vergleich von Überlebensraten wurde der Logrank-Test verwendet. Signifikante Werte wurden mit einem Asterisk (*) beschriftet. Die Auswertung der Statistik erfolgte mit der SPSS Statistik Software (SPSS GmbH Software, München, Deutschland). Graph Pad Prism wurde zur Bestimmung der Standardabweichung zwischen den experimentellen Datensätzen, die die gleiche Anzahl an Kopien beinhalten verwendet. Bei unterschiedlicher Anzahl an Kopien wurde die Standardabweichung vom Mittelwert benutzt.

3. Ergebnisse

Für die in dieser Arbeit präsentierten Experimente verwendeten wir Foxp3-GFP-DTR Mäuse auf einem C57BL/6 Hintergrund.^{20,21} Das Genom dieser Mäuse trägt eine cDNA-Sequenz, welche für den humanen Diphtherietoxin-Rezeptor kodiert. Dieser ist sowohl an Sequenzen gebunden, die das grüne Fluoreszenzprotein kodieren, als auch an eine interne ribosomale Eintrittsstelle. Diese Sequenz ist in die 3' untranslatierte Region von Foxp3 eingebaut, um Foxp3^{DTR} zu produzieren. In diesen Mäusen kann GFP und DTR nur in Foxp3⁺ Treg, nicht in Foxp3⁻ Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden. Um Foxp3⁺ Treg spezifisch zu eliminieren, muss das DTx intraperitoneal in diese Mäuse appliziert werden. Wie oben gezeigt und wie auch in Vorbereitungen für diese Experimente bestätigt, induziert eine einfache DTx-Injektion eine vorübergehende Depletion von Foxp3⁺ Treg für ungefähr 48 Stunden mit einer beinahe 50 prozentigen Wiederherstellung innerhalb von 72 Stunden nach DTx-Gabe (Abb. 4).

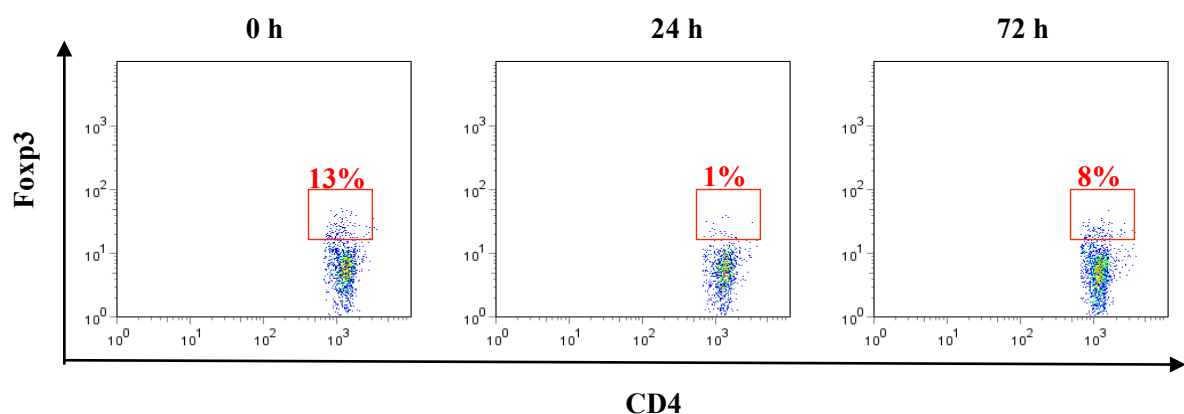


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Foxp3⁺ Treg nach 0, 24 und 72 Stunden nach Foxp3⁺ Treg Depletion. Durchflusszytometrie von CD4⁺ Foxp3-GFP⁺ Zellen nach einmaliger DTx-Gabe.

Um die genaue Dosis an DTx zu bestimmen, die die Foxp3⁺ Treg Depletion induziert, behandelten wir Foxp3-GFP-DTR Mäuse mit 50, 10, 5 oder 1 µg DTx pro kg Körpergewicht und bestimmten die Foxp3⁺ Treg Depletion nach 24 Stunden. Eine verminderte Expression von Foxp3⁺ Treg um mehr als 90% konnte bei einer Gabe von 10 oder 50 µg DTx pro kg Körpergewicht beobachtet werden. Daher entschieden wir uns, 10 µg DTx pro kg Körpergewicht in unseren Experimenten zu verwenden.

3.1 Gewichtskurve und Überleben unter Foxp3⁺ Treg Depletion in Foxp3-GFP-DTR Mäusen

Um die Konsequenzen einer laufenden Foxp3⁺ Treg Depletion in adulten Mäusen zu bestimmen, verabreichten wir drei Monate alten Mäusen jeden zweiten Tag 10 µg DTx pro kg Körpergewicht. Die Foxp3⁺ Treg Depletion induzierte eine schwere Pathologie mit Kachexie, Splenomegalie und Lymphadenopathie. Das Körpergewicht der Mäuse, die jeden zweiten Tag DTx erhalten haben, begann wenige Tage nach begonnener Foxp3⁺ Treg Depletion zu sinken. Die Gewichtsabnahme bestand über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 5).

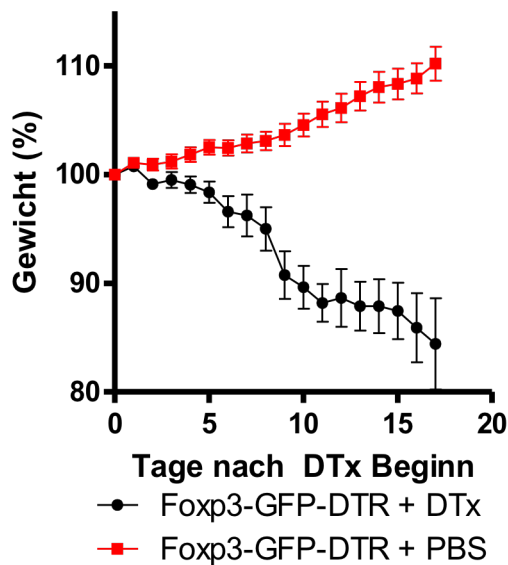


Abbildung 5: Gewichtskurve von Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung. Das Körpergewicht ist als prozentualer Wert des Ausgangsgewichts dargestellt. Das DTx wurde jeden zweiten Tag bis zum Ende des Beobachtungszeitraums verabreicht. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus zehn Mäusen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Zudem führte eine weitere DTx-Gabe zu einer permanenten Depletion von Foxp3⁺ Treg und zum Tod der Tiere zwischen Tag 18 und 28 nach Beginn der DTx-Behandlung (Abb. 6).

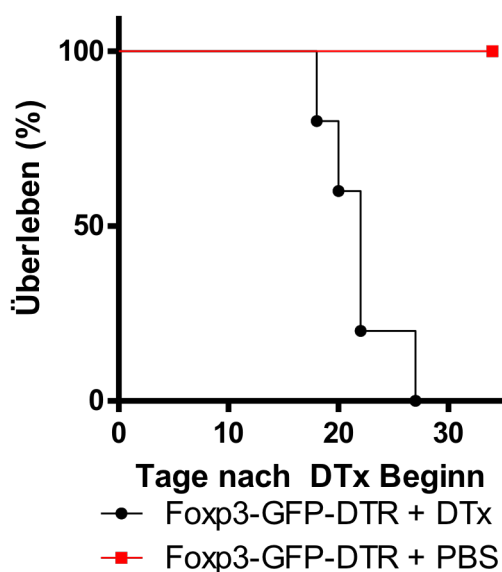


Abbildung 6: Kaplan Meier Überlebenskurve von Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung. Das Überleben ist als prozentualer Wert des Gesamtüberlebens dargestellt. Das DTx wurde jeden zweiten Tag bis zum Ende des Beobachtungszeitraums verabreicht. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus zehn Mäusen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Der Logrank-Test zeigte eine statistische Signifikanz von p = 0.0021.

Die permanente Gabe von DTx in Foxp3-GFP Mäuse, die den DTR nicht in ihrem Genom tragen und somit unanfällig für Foxp3⁺ Treg Depletion durch DTx sind, zeigten keinen Gewichtsverlust und keinen vorzeitigen Tod im Vergleich zu Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-Behandlung. So kann man schlussfolgern, dass die DTx-Gabe in geringer Dosis bei immunkompetenten Mäusen keine Pathologie verursacht.

3.2 Entzündungsaktivität in Lunge und Leber nach Foxp3⁺ Treg Depletion

Um den Effekt der Foxp3⁺ Treg Depletion auf andere Organe zu zeigen, untersuchten wir histologische Schnitte von Lunge, Leber und Kolon nach kontinuierlicher zehntägiger Foxp3⁺ Treg Depletion. Hierbei zeigten sich starke Infiltrationen von Lymphozyten und mononukleären Zellen im Lungeninterstitium und in den Lebersinusoiden in den mit DTx behandelten Mäusen zur Foxp3⁺ Treg Depletion im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Foxp3⁺ Treg Depletion induzierte dagegen keine beziehungsweise nur eine minimale lymphatische und mononukleare Infiltration im Kolon (Abb. 7).

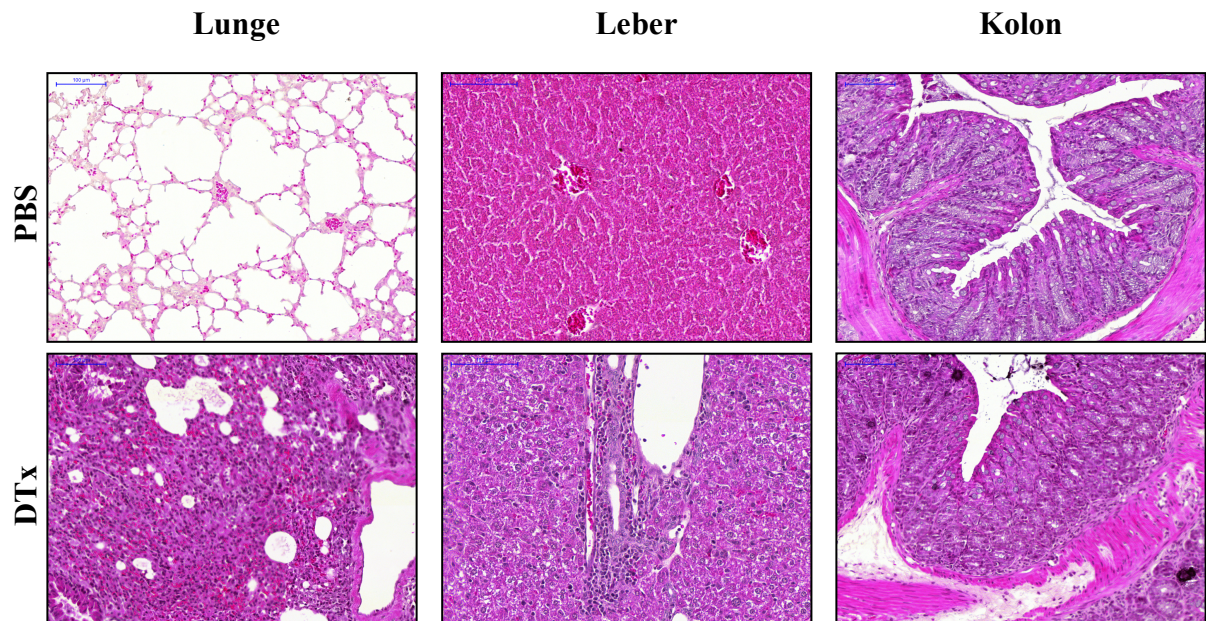


Abbildung 7: H&E-Färbung repräsentativer Lungen-, Leber- und Kolonabschnitte nach zehntägiger Foxp3⁺ Treg Depletion von Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung.

Die Ergebnisse aus der Analyse dieser histologischen Schnitte führten zu der Annahme, dass der zelluläre Proliferationsindex in den Organen von Mäusen ohne Foxp3⁺ Treg erhöht ist. Dies wurde durch eine immunhistologische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 bestätigt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, fanden wir eine stark erhöhte Proliferation von Entzündungszellen und auch Parenchymzellen in der Lunge und Leber von Mäusen nach Foxp3⁺ Treg Depletion. Ähnlich zu den Ergebnissen, die in Abbildung 7 präsentiert wurden, blieb der Proliferationsindex im Kolon unverändert unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von Foxp3⁺ Treg (Abb. 8).

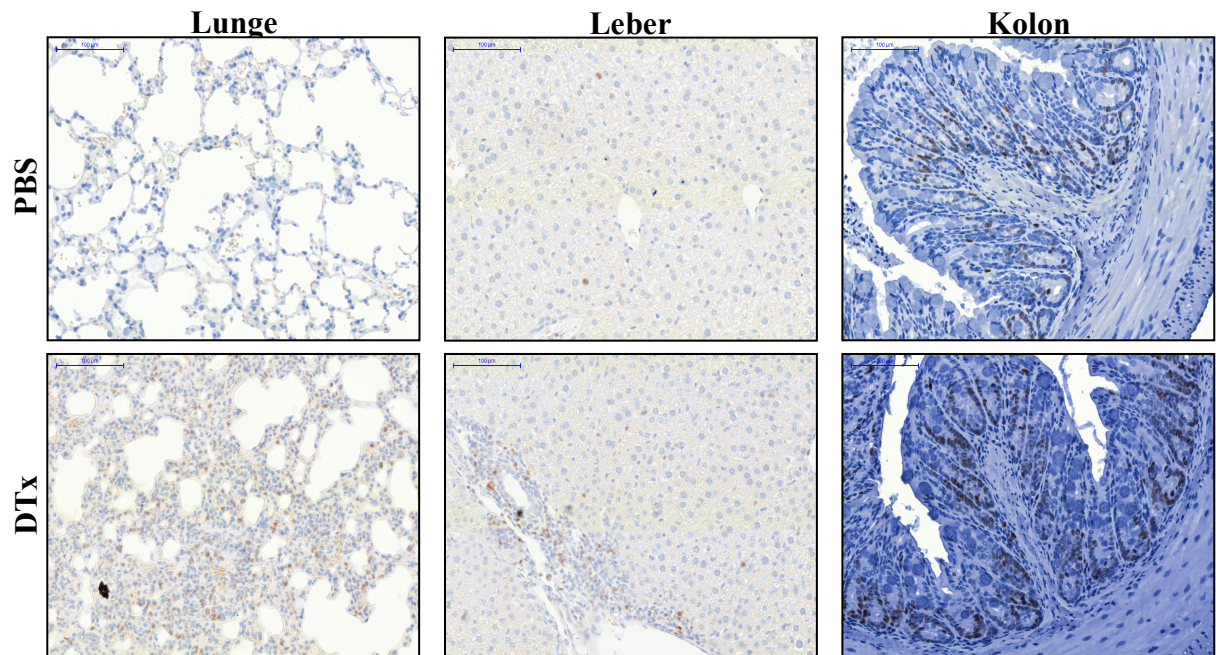


Abbildung 8: Ki-67-Färbung repräsentativer Lungen-, Leber- und Kolonabschnitte nach zehntägiger Foxp3⁺ Treg Depletion von Foxp3-GFP-DTR Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung.

3.3 Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und deren Zytokinproduktion nach Foxp3⁺

Treg Depletion

Um die immunologischen Folgen der permanenten Depletion von Foxp3⁺ Treg genauer zu untersuchen, isolierten wir CD4⁺ T-Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten und der Milz nach einer zehntägigen Foxp3⁺ Treg Depletion. Diese Zellen wurden restimuliert und aus dem Überstand die T-Helferzell-vermittelten Zytokine bestimmt. Die CD4⁺ T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten der kontrollbehandelten Foxp3-GFP-DTR Mäuse und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäuse zeigten kaum eine Produktion proinflammatorischer Zytokine über eine polyklonale T-Zell-Rezeptor Stimulation und Kostimulation.

Im Gegensatz dazu produzierten $CD4^+$ T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten von Mäusen ohne Foxp3⁺ Treg große Mengen an IFN- γ , IL-13 und IL-17A (Abb. 9).

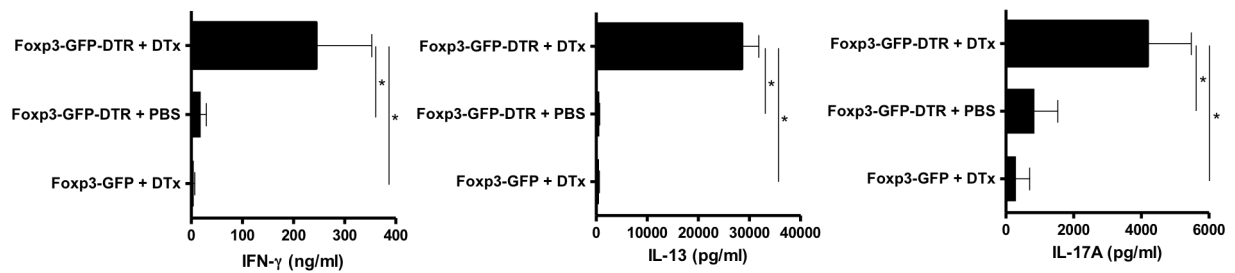


Abbildung 9: IFN- γ , IL-13 und IL-17A Produktion nach zehntägiger Foxp3⁺ Treg Depletion. $CD4^+$ Zellen wurden aus den mesenterialen Lymphknoten extrahiert und für 48h stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden aus dem Überstand der Kultur durch ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert der Konzentration der jeweils sezernierten Zytokine von mindestens fünf Mäusen pro Gruppe jeweils zweimal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. *, $p \leq 0.05$.

Um eine mögliche systemische Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen zu zeigen, isolierten wir diese Zellen aus Milzen von kontrollbehandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen, DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen. Hierbei konnten, wie bereits für Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten gezeigt, ähnliche Ergebnisse auch mit $CD4^+$ Zellen aus der Milz erzielt werden (Abb. 10).

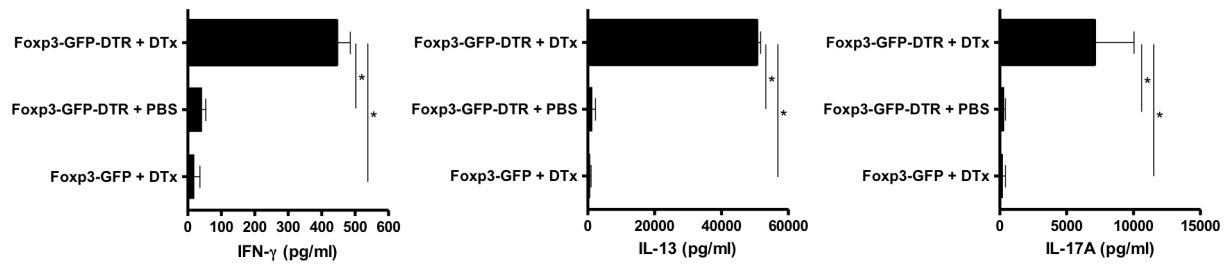


Abbildung 10: IFN- γ , IL-13 und IL-17A Produktion nach zehntägiger Foxp3⁺ Treg Depletion. CD4⁺ Zellen wurden aus den Milzen extrahiert und für 48h stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden aus dem Überstand der Kultur durch ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert der Konzentration der jeweils sezernierten Zytokine von mindestens fünf Mäusen pro Gruppe jeweils zweimal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. *, $p \leq 0.05$.

Dies macht deutlich, dass die Depletion von Treg zu einer systemischen Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führt und ein breites Spektrum an proinflammatorischen Zytokinen bietet.

3.4 Chronische T-Zell-vermittelte Darmentzündung nach Foxp3⁺ Treg Depletion

Eine chronische T-Zell-vermittelte Darmentzündung kann durch den Transfer von naiven CD4⁺CD62L⁺Foxp3⁻ T-Zellen in T- und B-Zell-defiziente Rag1^{-/-} Mäuse induziert werden.³⁷⁻³⁹ Der Transfer dieser naiven T-Zellen in immundefiziente Mäuse resultiert in einer chronischen Kolitis mit auszehrender Krankheit, die auf der Bildung von Th17 Zellen im Zuge der Erkrankung basiert. Der Transfer des gesamten CD4⁺ Zellpools dagegen, der Foxp3⁺ Treg enthält, oder die Gabe von Foxp3⁺ Treg nach dem Transfer von naiven

CD4⁺CD62L⁺Foxp3⁻ T-Zellen schützt vor der Entwicklung einer chronischen Darmentzündung, solange das immunologische Gleichgewicht an der intestinalen Schleimhautoberfläche intakt bleibt. Um den Effekt einer Foxp3⁺ Treg Depletion bei intakter immunologischer Homöostase an der Mukosabarriere im Darm genauer zu untersuchen, rekonstituierten wir Rag1^{-/-} Mäuse mit dem gesamten CD4⁺ Zellpool, den wir aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen erhalten haben und verabreichten diesen rekonstituierten Tieren DTx (oder PBS als Kontrolle) jeden zweiten Tag zwischen den Tagen 14 und 18. Dadurch konnten wir einerseits eine intakte immunologische Homöostase an der mukosalen Barriere im Darm auf Grund der Rekonstitution mit dem gesamten CD4⁺ Zellpool und andererseits eine verspätete Foxp3⁺ Treg Depletion erreichen. Wir fanden, dass die DTx-Gabe zwischen dem 14. und 18. Tag, was ursächlich für die Foxp3⁺ Treg Depletion ist, zu einem sofortigen Gewichtsverlust der Mäuse führte und somit den Beginn der Kolitis anzeigte. Kontrolltiere und mit DTx behandelte Rag1^{-/-} Mäuse nach dem Transfer von CD4⁺ T-Zellen aus Foxp3-GFP Mäusen nahmen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stetig an Gewicht zu (Abb. 11).

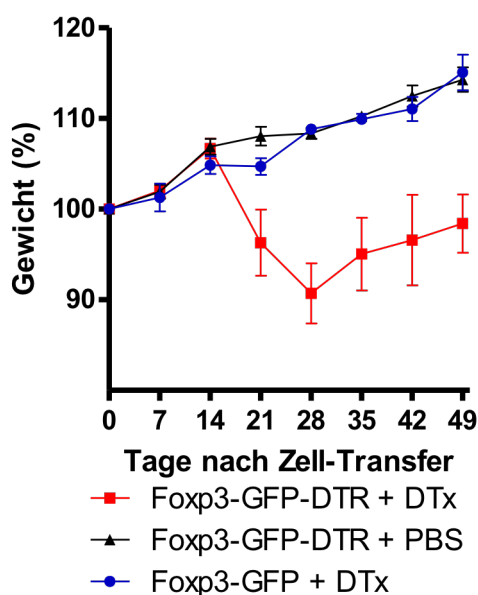


Abbildung 11: Gewichtskurve von Rag1^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung. Das Körpergewicht ist als prozentualer Wert des Ausgangsgewichts von DTx- und PBS-behandelten Rag1^{-/-} Mäusen nach Transfer des gesamten CD4⁺ Zellpools aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen oder Foxp3-GFP Mäusen dargestellt. Das DTx wurde jeden zweiten Tag zwischen dem 14. und 18. Tag verabreicht. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus zehn Mäusen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Gemäß dem Gewichtsverlust, der der Depletion von Foxp3^+ Treg folgte, beobachteten wir eine Todesrate von 40% unter den Mäusen, die eine chronische Transferkolitis als Folge der Foxp3^+ Treg Depletion entwickelten. Alle Mäuse mit intakten Foxp3^+ Treg dagegen überlebten (Abb. 12).

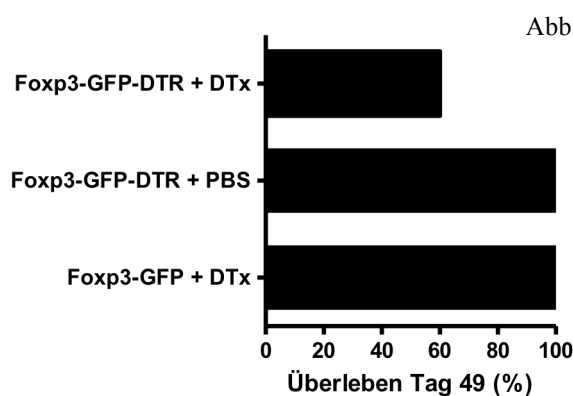


Abbildung 12: Überlebenskurve von $\text{Rag1}^{-/-}$ Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung.. Das Überleben ist als prozentualer Wert des Gesamtüberlebens von DTx- und PBS-behandelten $\text{Rag1}^{-/-}$ Mäusen nach Transfer des gesamten CD4^+ Zellpools aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen oder Foxp3-GFP Mäusen dargestellt. Das DTx wurde jeden zweiten Tag zwischen dem 14. und 18. Tag verabreicht. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus zehn Mäusen.

Die histologische Evaluierung zeigte eine intestinale Inflammation mit lymphozytären und mononuklearen Zellinfiltraten im Kolon von CD4^+ T-Zell (aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen)-rekonstituierten $\text{Rag1}^{-/-}$ Mäusen nach DTx-Gabe. Kontrolltiere und $\text{Rag1}^{-/-}$ Mäuse nach Transfer von CD4^+ T-Zellen, die aus Foxp3-GFP Mäusen isoliert wurden, und DTx-Gabe zeigten dagegen keine intestinale Inflammation (Abb. 13).

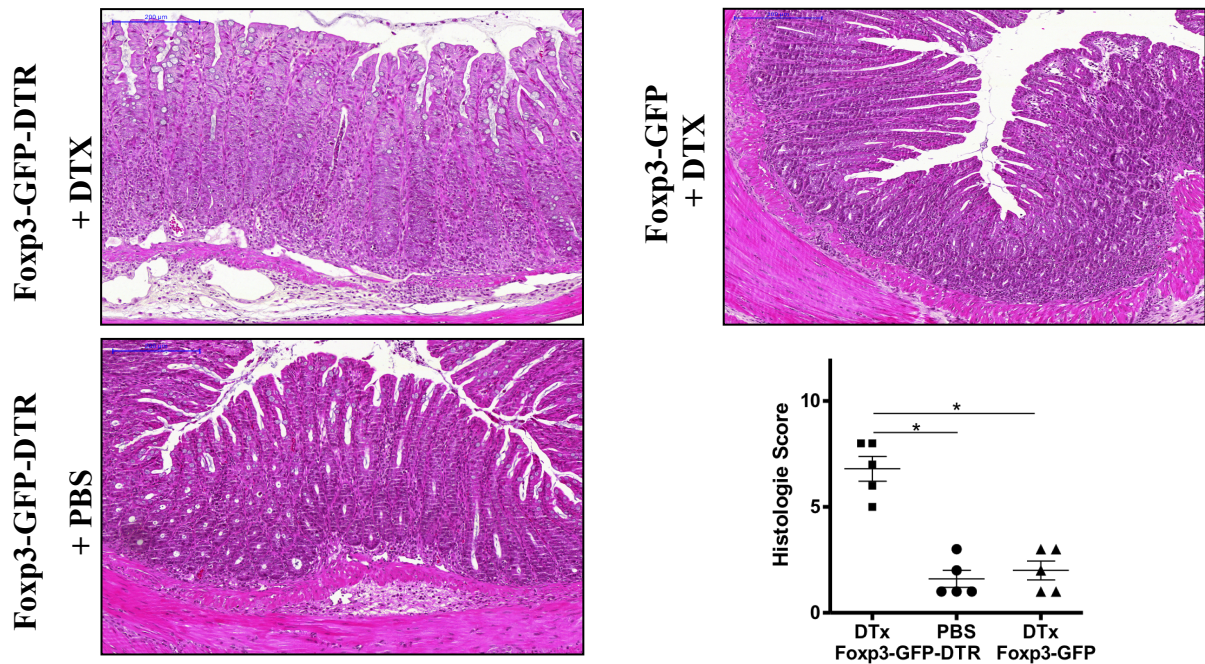


Abbildung 13: H&E-Färbung und Histologie Score repräsentativer Kolonquerschnitte an Tag 49 nach Transfer des CD4⁺ Zellpools aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen oder Foxp3-GFP Mäusen. Das DTx wurde jeden zweiten Tag zwischen dem 14. und 18. Tag verabreicht. Die horizontalen Linien des scatter plot sind Mittelwerte, die aus fünf Mäusen pro Gruppe gebildet wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert. Jeder Punkt repräsentiert den Histologie Score der korrespondierenden Maus. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. *, $p \leq 0.05$.

Weiter untersuchten wir die Expression von T-Zell vermittelten Zytokinen an Tag 49 nach T-Zell Transfer. Wir fanden einen starken Anstieg der IL-17A und IFN- γ Expression von CD4⁺ Zellen, isoliert aus mesenterialen Lymphknoten von Mäusen, welche DTx zur Foxp3⁺ Treg Depletion erhalten haben im Vergleich zu Mäusen ohne Foxp3⁺ Treg Depletion (Abb. 14).

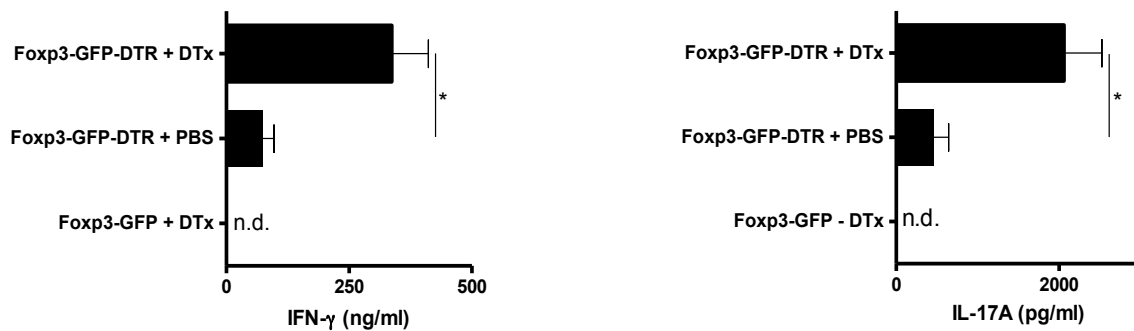


Abbildung 14: IFN- γ und IL-17A Produktion von Rag1^{-/-} Mäusen mit PBS-/ DTx-Behandlung nach Transfer des gesamten CD4⁺ Zellpools aus Foxp3-GFP-DTR Mäusen oder Foxp3-GFP Mäusen. Das DTx wurde jeden zweiten Tag zwischen dem 14. und 18. Tag verabreicht. CD4⁺ Zellen wurden aus den mesenterialen Lymphknoten extrahiert und für 48 Stunden stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden aus dem Überstand der Kultur durch ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert der Konzentration der jeweils sezernierten Zytokine von mindestens fünf Mäusen pro Gruppe jeweils zweimal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. *, $p \leq 0.05$.

3.5 Verschlechterung der akuten Darmentzündung nach Foxp3⁺ Treg Depletion

Der supprimierende Effekt der Foxp3⁺ Treg wirkt am stärksten auf T-Helferzellen. Daher haben wir aufbauend auf der Untersuchung am Kolitis Modell, welches vollkommen T-Zell-abhängig ist, die Experimente auf eine akute intestinale Inflammation durch DSS erweitert. Ursächlich dafür ist hauptsächlich eine Zerstörung der Integrität an der Mukosabarriere. Diese Form der akuten Kolitis kann durch eine orale Gabe von Natriumdextransulfat im Trinkwasser (DSS-Kolitis) induziert werden. Um eine schwere, akute Kolitis zu verursachen, verabreichten wir 5% DSS im Trinkwasser für fünf aufeinanderfolgende Tage gefolgt von zwei Tagen mit normalem Trinkwasser. Das Ende des Versuchs war an Tag 7 nach Beginn der DSS-Gabe. Die Foxp3⁺ Treg Depletion in dieser

Versuchsreihe wurde einen Tag vor der DSS-Gabe begonnen und wurde jeden zweiten Tag bis zum Ende der Beobachtungsperiode wiederholt. Wir konnten zeigen, dass 5% DSS im Trinkwasser zu einer etwa 20 prozentigen Gewichtsabnahme an Tag 7 nach Beginn der DSS-Gabe bei den kontroll-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen und bei den DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen führte. Bei der Foxp3⁺ Treg Depletion der DTx-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäuse kam es dagegen zu einem signifikant höheren Gewichtsverlust im Vergleich zu den Mäusen mit intakten Foxp3⁺ Treg. Dieser signifikante Unterschied war bereits an Tag 4 nach DSS-Gabe ersichtlich und an Tag 7 sogar noch ausgeprägter (Abb. 15).

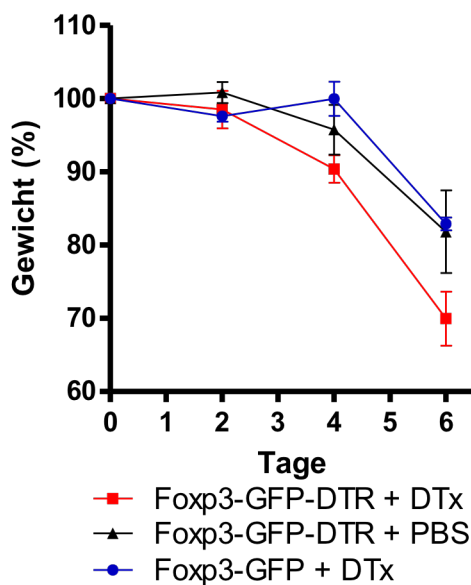


Abbildung 15: Gewichtskurve von Rag1^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung. Das Körpergewicht ist als prozentualer Wert des Ausgangsgewichts von DTx- und PBS- behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen dargestellt. Das DTx wurde an den Tagen -1, 1 und 3 verabreicht. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus fünf Mäusen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Außerdem war der starke Gewichtsabfall bei den mit DTx behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen von einer 80 prozentigen Mortalität im Verlauf der kurzen Erkrankungsperiode begleitet, wohingegen die kontroll-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäuse und die mit

DTx behandelten Foxp3-GFP Mäuse nur eine Mortalität von 0% beziehungsweise 20% aufwiesen (Abb. 16).

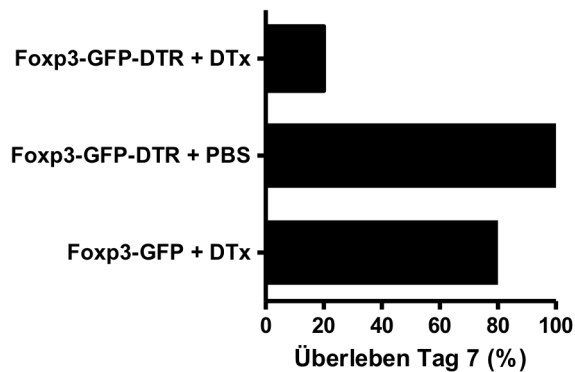


Abbildung 16: Überlebenskurve von Rag1^{-/-} Mäusen mit DTx-/ PBS-Behandlung. Das Überleben ist als prozentualer Wert des Gesamtüberlebens von DTx- und PBS-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen dargestellt. Das DTx wurde an den Tagen -1, 1 und 3 verabreicht. Jede Gruppe bestand ursprünglich aus fünf Mäusen.

Diese Ergebnisse wurden durch die histologische Evaluierung von H&E-gefärbten Querschnitten des Kolons bestätigt. Wir fanden eine starke Kolitis mit entzündlicher Zellinfiltration bei den mit DTx behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen (Abb. 17).

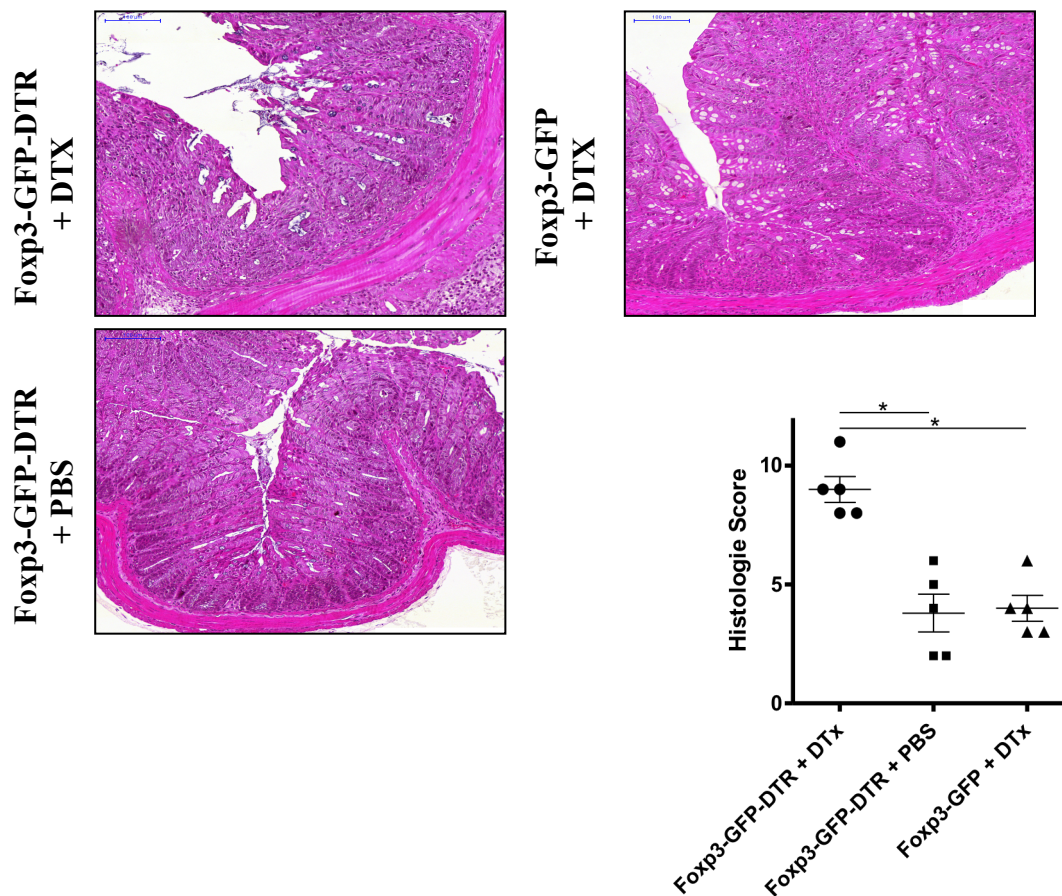


Abbildung 17: H&E-Färbung und Histologie Score repräsentativer Kolonquerschnitte von DTx- und PBS-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen. Das DTx wurde an den Tagen -1, 1 und 3 verabreicht. Die horizontalen Linien des scatter plot sind Mittelwerte, die aus fünf Mäusen pro Gruppe gebildet wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert. Jeder Punkt repräsentiert den Histologie Score der korrespondierenden Maus. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. *, $p \leq 0.05$.

Darüberhinaus wurden isolierte $CD4^+$ T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten an Tag 7 der akuten Kolitis restimuliert und $IFN-\gamma$ und IL-17A durch ELISA im Überstand bestimmt. In Bezug auf $IFN-\gamma$ und IL17-A konnte ein starker Anstieg der Zytokinproduktion aus $CD4^+$ Zellen, isoliert aus mit DTx behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen, gemessen werden. Die $IFN-\gamma$ und IL-17A Konzentrationen bei kontroll-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen

und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen, beide Gruppen mit intakten Foxp3⁺ Treg, waren auf einem niedrigen Niveau (Abb. 18).

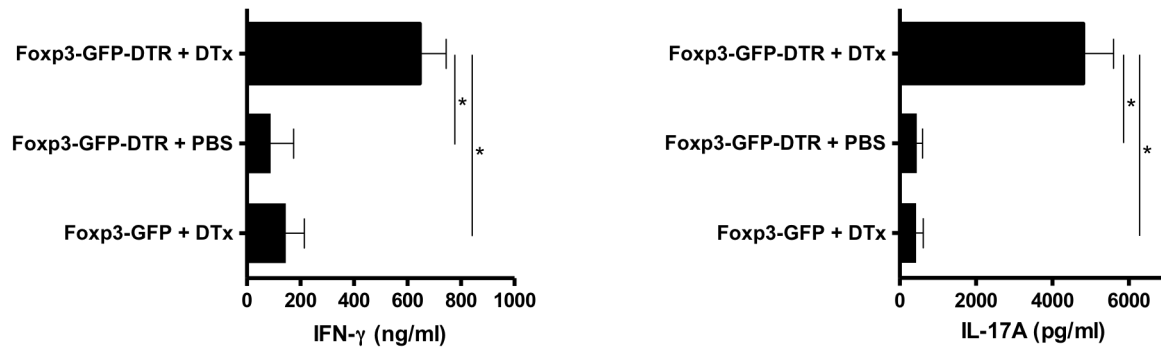


Abbildung 18: IFN- γ und IL-17A Produktion von DTx- und PBS-behandelten Foxp3-GFP-DTR Mäusen und DTx-behandelten Foxp3-GFP Mäusen. Das DTx wurde an den Tagen -1, 1 und 3 verabreicht. CD4⁺ Zellen wurden aus den mesenterialen Lymphknoten extrahiert und für 48 Stunden stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen wurden aus dem Überstand der Kultur durch ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert der jeweils sezernierten Zytokine von mindestens fünf Mäusen pro Gruppe jeweils zweimal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten T-Test Konfidenzintervall von 95% ausgewertet. *, $p \leq 0.05$.

4. Diskussion

Die Schleimhäute, wie beispielsweise im Intestinaltrakt, stehen mit einer Vielzahl von Organismen in Kontakt. Einerseits kommen potentiell pathogene Keime vor und andererseits physiologisch die Darmflora besiedelnde Mikroorganismen. Daher benötigt man ein Gleichgewicht zwischen Selbsttoleranz und Erregerabwehr, was eine große regulatorische Herausforderung darstellt. Das intestinale Gleichgewicht entsteht aus einer hoch dynamischen Balance zwischen protektiver Immunität und regulatorischen Mechanismen.⁵⁶

Die Integrität der intestinalen Schleimhaut wird durch zahlreiche Faktoren aufrechterhalten. Dazu gehören die epithelialen Zellschichten, schleimproduzierende Becherzellen und Paneth-Zellen, die antimikrobiell wirkende Peptide bilden, ebenso wie IgA-freisetzende Plasmazellen und GALT, wie die Payer Plaques. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zur Inflammation aufgrund unzureichender Kontrolle der Immunantwort. Das Immunsystem greift dann auch körpereigene Zellen an.^{56,57}

4.1 Molekulare Manipulation im Foxp3-Gen

Eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase spielen die $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg, indem sie proinflammatorische Reaktionen unterdrücken.⁵⁷

Patienten mit Mutationen, die das Foxp3-Gen betreffen, entwickeln eine Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie. Diese Mutationen werden x-chromosomal vererbt. IPEX ist eine schwere Autoimmunkrankheit, die in jungen Jahren beginnt und unter anderen Organen auch die Haut und endokrine Drüsen betrifft. Falls es nicht zu einer schwerwiegenden Manifestation des IPEX Syndroms bereits in der Kindheit kommt, fallen

diese Patienten mit einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus, einer Wachstumsretardierung, Hauterkrankungen oder einer Hypothyreose mit kürzlich durchgemachter Infektion wie Meningitis, Pneumonie oder Sepsis auf.⁵⁸⁻⁶¹

Das jedoch am häufigsten betroffene Organ ist der Darm. Die Klinik des IPEX kann der des Morbus Crohn, der Colitis ulcerosa oder der Zöliakie ähneln. Dies zeigt die Wichtigkeit der Treg in der Aufrechterhaltung der intestinalen Toleranz.³⁰

In der Maus triggert der Mangel an Foxp3-Gen eine schnelle, schwere, multiple Organe betreffende Autoimmunerkrankung.^{20,21} Die Zeitdauer einer spezifischen Organentzündung in der Maus scheint im Vergleich zur humanen Erkrankung anders zu sein. Wahrscheinlich wegen der schnellen Entwicklung einer Lungenerkrankung kommt es bei diesen Mäusen zu keiner Darmentzündung, da sie vor einer möglichen Kolitis an einer schweren respiratorischen Insuffizienz versterben.

Um den tatsächlichen Einfluss einer Foxp3⁺ Treg Depletion für die Entwicklung einer intestinalen Inflammation zu bestimmen, nutzten wir die Möglichkeit Foxp3⁺ Treg in einem genetisch veränderten Mausmodell spezifisch auszulöschen. Die Foxp3-GFP-DTR Maus selbst ist immunkompetent und zeigt an sich keinen inflammatorischen Phänotyp. Durch die Gabe von DTx konnte bei diesen Mäusen eine spezifische Depletion der regulatorischen T-Lymphozyten erreicht werden, da in ihrem Genom eine für den humanen DTR kodierende Sequenz unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors ist. Mit diesem Werkzeug konnten wir Foxp3⁺ Treg aus einer Maus mit anfangs intakter intestinaler Homöostase und anfänglicher Barrierefunktion eliminieren. Wie erwartet konnten wir zeigen, dass die Foxp3⁺ Treg Depletion bei Mäusen mit intakter mukosaler Homöostase zum Ausbruch und zur Verschlechterung von Autoimmunerkrankungen, wie die Kolitis führte. Die DTx-Injektion alleine verursacht keinen Verlust der epithelialen Integrität im

Foxp3-GFP-DTR Modell. Stattdessen ist die Foxp3-Expression Treg spezifisch und die Foxp3⁺ Treg Depletion führt zu starken Autoimmunreaktionen. Die Autoimmunität kann durch einen Transfer von intakten regulatorischen T-Lymphozyten in Treg-defiziente Mäuse wieder erreicht werden.^{20,21}

4.2 Persistierende Inflammation trotz erhöhter Anzahl Foxp3⁺ Treg

Tatsächlich ist die Entzündung häufig mit einer erhöhten Anzahl an Treg verbunden. Während die Zahl an Foxp3⁺ Treg im peripheren Blut beispielsweise von Patienten mit CED vermindert scheint, ist die absolute Anzahl an Treg in der Mukosa der Patienten mit CED oder Zöliakie offenbar erhöht. Wahrscheinlich stellt dies die Gegenregulation der stattfindenden Entzündung dar. Die Anzahl der regulatorischen T-Lymphozyten korreliert mit der Entzündungsaktivität im Kolon und dem C-reaktiven Protein im Serum.⁶²⁻⁶⁸

Es bleibt jedoch offen, warum die Entzündung bei Patienten mit aktiver CED trotz erhöhter Anzahl an Foxp3⁺ Treg persistiert. Gewiss ist es möglich, dass es in Entzündungsphasen zu einem relativen Mangel dieser Zellen kommt. Treg werden zur Mukosa rekrutiert oder werden dort gebildet. Dieser relative Mangel an Foxp3⁺ Treg führt zu einer unvollständigen Kontrolle der Entzündung und ermöglicht eine ausgeprägte lymphatische Infiltration. Ebenso ist es vorstellbar, dass beide Methoden, in vitro Assays und Mausmodelle, die Komplexität der Regulation im humanen intestinalen Milieu unterschätzen. An der intestinalen Schleimhaut verändern möglicherweise verschiedene Antworten auf Zytokine oder kostimulierende Interaktionen die supprimierenden Fähigkeiten von Foxp3⁺ Treg. In diesem Zusammenhang konnte für das inflammatorische Zytokin IL-23 gezeigt werden, dass es die Generierung von Foxp3⁺ Treg im Kolon verhindern kann. IL-23 ist an der Pathogenese der CED bei Mäusen

und Menschen beteiligt. Ein Fehlen von IL-23 erhöht die Anzahl an Foxp3⁺ Treg im Kolon. Dies deutet auf eine Kontrolle der intestinalen Treg Induktion hin. IL-23 hat jedoch nur geringen Einfluss auf eine systemische T-Zell Reaktion. Dieses Ergebnis macht IL-23 zu einem Beteiligten an der Autoimmunreaktion im Darm und stellt möglicherweise einen neuen therapeutischen Angriffspunkt bei CED des Menschen dar.⁶⁹⁻⁷⁴

Zusätzlich exprimieren beide, die aus der Maus und vom Menschen stammenden Treg TLR. Sie sind daher der Regulierung durch Pathogene unterworfen, die möglicherweise ihre in vivo Funktion verändern. Die TLR-vermittelte Erkennung spezifischer Strukturen eindringender Pathogene initiiert durch APC sowohl angeborene, also auch erworbene Immunreaktionen. Dadurch wird vermutlich das Gleichgewicht zwischen CD4⁺ T-Helferzellen und CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Lymphozyten verändert und folglich ein Einfluss auf die Immunantwort ausgeübt. Das TLR-Signal kann entweder in einer erhöhten (TLR 4 und TLR 5) oder aufgehobenen (TLR 8 und TLR 9) Foxp3⁺ Treg-vermittelten Suppressorfunktion, abhängig vom beteiligten Liganden resultieren. Diese Immunmodulation könnte ebenso die Behandlung von Autoimmunerkrankungen verändern.⁷⁵

4.3 Regulation der intestinalen Homöostase

Das intestinale Immunsystem muss ein komplexes Gleichgewicht zwischen proinflammatorischer und antiinflammatorischer Immunantwort gegenüber intraluminalen Antigenen herstellen. Eine Störung dieser Balance, kann zu CED führen. Hierzu gehört die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn. Sie sind charakterisiert durch eine Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria des Intestinaltraktes. Obwohl die Ätiologie dieser Erkrankungen nicht vollständig geklärt ist, lassen Daten von Patienten und Mausmodellen

eine übermäßige Immunantwort auf die intestinale Mikroflora vermuten.^{76,77} Zusätzlich zeigen Daten, dass eine intakte Darmflora für die Entwicklung einer CED notwendig ist.⁷⁸ Antibiotika und Probiotika scheinen unter bestimmten Umständen nützlich für die Behandlung von Patienten mit CED zu sein.⁷⁹

Im gesunden Darm ist die Schleimhaut mit einer großen Anzahl an Mikroorganismen und Antigenen aus der Nahrung in Kontakt. Treg spielen möglicherweise bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen gegenüber diesen nicht-pathogenen Antigenen eine wichtige Rolle. Defekte in dieser T-Zell-Subpopulation sind maßgeblich an der Pathogenese von CED beteiligt. Treg helfen bei der Aufrechterhaltung des intestinalen Gleichgewichtes und verhindern eine überschießende angeborene oder erworbene Immunantwort. Zusätzlich zu den Foxp3⁺ Treg sind Subgruppen von CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen an der Regulierung der intestinalen Homöostase beteiligt.⁸⁰⁻⁸³

In murinen CD4⁺ Zellen kann Foxp3 als Antwort auf Aktivierung des TCR bei Vorhandensein von TGF- β induziert werden und wirkt supprimierend.⁸⁴ Im Gegensatz zu Mäusen, bei denen Foxp3 ausschließlich in Treg vorkommt, konnte bei Menschen gezeigt werden, dass Foxp3 vorübergehend in humanen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach TCR Aktivierung produziert werden kann.⁸⁵⁻⁸⁹ Darüber hinaus entwickeln diese Zellen nicht immer eine regulatorische Funktion, obwohl TGF- β in humanen naiven T-Zellen die Expression von Foxp3 induziert.⁸⁸ Weiter kommt erschwerend hinzu, dass ein Vorhandensein von humanen Foxp3 Antikörpern vermutet wird.⁹⁰⁻⁹² Aus diesen Gründen muss eine Verwendung von Foxp3 als Marker für humane Treg genau überprüft werden.

Es wurden auch Treg beschrieben, die kein Foxp3 exprimieren, aber sowohl in vitro als auch in vivo eine supprimierende Wirkung ausüben. Dazu gehören Tr1-Zellen, die IL-10 produzieren. Sie können durch orale Einnahme von Antigenen, durch in vitro Kultivierung

mit IL-10 oder durch Kontakt zu unreifen dendritischen Zellen induziert werden.⁹³⁻⁹⁵ Eine weitere Subpopulation der Treg sind die Th3-Zellen. Sie unterdrücken die Immunantwort durch TGF- β abhängige Mechanismen.⁹⁶ Man vermutet, dass Th3-Zellen durch TGF- β de novo Foxp3⁺ Treg induzieren können.⁸⁴

Foxp3⁺ Treg sind essentiell in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase durch IL-10- und TGF- β -abhängige Mechanismen.^{57,97} Ihre Aktivität wird mit Hilfe von anderen T- und B-Lymphozyten vervollständigt. Um die Induktion und Auflösung einer fremd protektiven Immunantwort zu ermöglichen, ist die Treg-Entwicklung und Treg-Aktivität eng mit der Immunantwort verbunden. Einerseits muss die Treg-Kontrolle beschränkt werden, um den Ablauf einer Immunantwort zu ermöglichen. Andererseits müssen Treg mit den stattfindenden Immunantworten schritthalten, um das immunologische Gleichgewicht dann, wenn die Entzündung nicht länger benötigt wird, wiederherzustellen. Treg sind für die Aufrechterhaltung der intestinalen Selbsttoleranz entscheidend und bieten einen möglichen Angriffspunkt für Therapien bei CED.

4.4 Medikamentöser Einfluss auf Foxp3⁺ Treg

Der tatsächliche Effekt der Foxp3⁺ Treg Depletion auf die Entwicklung einer intestinalen Inflammation ist äußerst wichtig für die Evaluierung therapeutischer Strategien. In der Behandlung von humanen Patienten mit CED beeinflusst die Medikation vor allem die Verteilung und Funktion der Foxp3⁺ Treg. Saruta et al. haben bewiesen, dass der Gebrauch von 6-Mercaptopurin und Azathioprin, aber nicht Steroide oder anti-TNF Wirkstoffe mit einer geringeren Anzahl an peripheren Treg korreliert.⁹⁸ Darüberhinaus haben Studien bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine gestörte supprimierende Funktion von Treg im peripheren

Blut signalisiert. Diese hat sich nach Infliximab Therapie normalisiert.^{99,100} Eine kürzlich durchgeführte Studie bei Kindern mit Morbus Crohn hat eine erhöhte Anzahl an Foxp3⁺ Treg im Kolon der Patienten unter Infliximab-Therapie gezeigt. Im Vergleich dazu hatten Patienten, die mit anderen Medikamenten behandelt wurden weniger Treg. Im Gegensatz zu den Beschreibungen bei Erwachsenen zeigte diese Studie, dass Kinder mit aktivem Morbus Crohn eine erniedrigte Anzahl an Treg im Kolon im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe hatten. Die Ursache dieser Diskrepanz zwischen Kindern und Erwachsenen ist allerdings unklar.¹⁰¹ Zusätzlich erhöht das Probiotikum VSL#3 (Sigma-Tau Pharmaceuticals, Gaithersburg, Maryland, USA) die Anzahl der Foxp3⁺ Treg in der Lamina propria im Ileum-Pouch bei Patienten mit Pouchitis.¹⁰² Diese Studien sehen eine potentielle Rolle der Treg Modulation in der anti-TNF- und probiotischen Therapie.

4.5 Ausblick

Trotz unseres begrenzten Wissens über die Rolle von Foxp3⁺ Treg in der Pathogenese der humanen CED, kann die Möglichkeit Regulationsmechanismen zu verändern ein entscheidender Weg sein, eine langfristige Remission in Patienten zu erreichen. Ergebnisse aus Tiermodellen deuten an, dass der Foxp3⁺ Treg-Transfer in Patienten nützlich sein kann. Die meisten Mausmodelle jedoch, die Prävention oder Heilung der Kolitis mit Foxp3⁺ Treg zeigen, wurden mit lymphopenischen Tieren durchgeführt, in welchen die homöostatische Ausdehnung von Foxp3⁺ Treg möglicherweise ihren Einfluss auf die Erkrankung erleichtert. In Anbetracht der Tatsache, dass Foxp3⁺ Treg in der Lamina propria bei Patienten mit CED bereits in der Anzahl erhöht sind, benötigt man wahrscheinlich große Mengen an Foxp3⁺ Treg, um die Balance zwischen einer regulatorischen und einer proinflammatorischen

Antwort zu beeinflussen. Auch gab es Begeisterung für Versuche, Treg aus peripheren $CD4^+$ Zellen unter TGF- β Einfluss zu entwickeln. Scurfy Mäuse, die neonatal mit solchen vorbehandelten murinen Treg behandelt wurden, entwickelten keine Autoimmunerkrankungen.¹⁰³ Es ist jedoch unklar, ob ähnliche Protokolle bei humanen Patienten erfolgreich sind. Foxp3, das durch TGF- β induziert ist, korreliert bei Menschen möglicherweise nicht mit der regulierenden Aktivität.⁸⁸

Zusätzlich zur großen Anzahl an Foxp3⁺ Treg, die für die Zell-therapeutische Behandlung notwendig ist, besteht die Gefahr, dass Foxp3⁺ Treg ihre supprimierenden Fähigkeiten im Laufe der Zeit verlieren. So wurde gezeigt, dass Foxp3⁺ Treg in der Lage sind, einen proinflammatorischen Phänotypen zu entwickeln, indem sie zu exFoxp3 non Treg werden, was vermutlich schädliche Effekte in vivo haben kann.^{104,105}

Durch ein verlängertes Überleben der Treg könnte man möglicherweise die notwendige Anzahl verringern und somit manche Schwierigkeiten beim Generieren der Treg umgehen. Bevor es allerdings zu klinischen Anwendungen bei Patienten mit CED kommen kann, muss man die Sicherheit dieser Therapien noch genauer untersuchen. Es gibt noch einen erheblichen Bedarf, mehr Informationen über die Rolle von Foxp3⁺ Treg, die intestinale Homöostase und die Entwicklung einer Darmentzündung zu sammeln.

5. Zusammenfassung

Mausmodelle haben gezeigt, dass Treg entscheidend sind für die Aufrechterhaltung der intestinalen Toleranz gegenüber intraluminalen Antigenen und für die Verhinderung von intestinaler Inflammation. Es wurden schon viele Mechanismen der Treg Funktion in der intestinalen Mukosa identifiziert. Abhängig vom jeweiligen Antigen und der Umgebungsreaktion interagieren verschiedene supprimierende Systeme.

Die intermittierende Depletion von Foxp3⁺ Treg verstärkt die intestinale inflammatorische Antwort, was die Wichtigkeit von Foxp3⁺ Treg für das Gleichgewicht an der Schleimhautoberfläche des Darmes zeigt. Aus der Literatur und den Daten, welche in dieser Arbeit präsentiert wurden, kann man schließen, dass Foxp3⁺ Treg eine bedeutende Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und für die Kontrolle der intestinalen Inflammation übernehmen. Obwohl es zu einer erhöhten Anzahl an Treg in der intestinalen Lamina propria kommt, zeigen Studien, dass diese Anzahl im Vergleich zu anderen entzündlichen Erkrankungen niedrig ist. Therapien, die die Treg Anzahl erhöhen und ihre supprimierende Funktion verstärken können, sind Gegenstand der Forschung. Sie stellen vielversprechende Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit CED dar. Bis zur klinischen Anwendung muss jedoch das komplexe Zusammenspiel zwischen Foxp3⁺ Treg und der mukosalen Immunität genauer untersucht werden, um mögliche ungünstige Nebeneffekte dieser Behandlung zu verhindern.

6. Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. ISBN 978-3-8274-2047-3. 2009; S. 3-5.
2. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. ISBN 978-3-8274-2047-3. 2009; S. 5-50.
3. Vollmar A, Dingermann T. Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. WVG Stuttgart. ISBN 3-8047-2189-3. 2005; S. 3-7.
4. Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*. 2009; 30(5): 616-625.
5. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. ISBN 978-3-8274-2047-3. 2009; S.407-472.
6. Wieczorek G, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Research*. 2009; 69(2): 599-608.
7. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *Journal of Immunology*. 2008; 81(8): 5396-5404.
8. Van Kaer L. Alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nature Reviews Immunology*. 2005; 5(1): 31-42.

-
9. Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *nature immunology*. 2005; 6(4): 327-330.
 10. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *nature immunology*. 2005; 6(4): 331-337.
 11. Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *nature immunology*. 2005; 6(4): 338-344.
 12. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *nature immunology*. 2005;6(4): 345-352.
 13. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *nature immunology*. 2005; 6(4): 353-360.
 14. Ochs H, Gambineri E, Torgerson T. IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunologic Research*. 2007; 38(1-3): 112–121.
 15. Torgerson T, Ochs H. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 120(4): 744–750.
 16. Powell B, Buist N, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *Journal of Pediatrics*. 1982; 100(5): 731–737.
 17. Battaglia M, et al. Rapamycin promotes expansion of functional CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *Journal of Immunology*. 2006; 177(12): 8338–8847.

18. Rao A, et al. Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Blood*. 2007; 109(1): 383–385.
19. Brunkow M, et al. Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lympho- proliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*. 2001; 27: 68–73.
20. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cell prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *nature immunology*. 2007; 8(2):191-197.
21. Kim J, Lahl K, Hori S, Loddenkemper C, Chaudhry A, deRoos P, Rudensky A, Sparwasser T. Cutting edge: Depletion of Foxp3⁺ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice. *Journal of Immunology*. 2009; 183(12): 7631-7634.
22. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *nature immunology*. 2003; 4(4): 330-336.
23. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003; 299(5609): 1057-1061.
24. Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *nature immunology*. 2003; 4(4):337-342.
25. Lu L, Rudensky A. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells. *Genes & Development*. 2009; 23(11): 1270–1282.
26. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *nature immunology*. 2010; 11(1): 7–13.

-
27. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009; 30(5): 636-645.
28. 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): 329-341.
29. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*. 2001; 27(1): 68-73.
30. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2002; 39(8): 537-545.
31. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3(7): 521-533.
32. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Reviews*. 2006; 212: 256-271.
33. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Reviews of Immunology*. 2009; 27: 313-338.
34. Izcue A, Powrie F. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cell and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology*. 2008; 123(1): 6-10.
35. Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunological Reviews*. 2005; 204(1): 184-194.

-
36. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347(6): 417-429.
37. Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp*. 2003; 252: 92-8; discussion 98-105, 106-114.
38. Read S, Powrie F. Induction of inflammatory bowel disease in immunodeficient mice by depletion of regulatory T cells. *Current Protocols in Immunology*. 2001; Chapter 15: Unit 15. 13.
39. Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunological Reviews*. 2001; 182: 190-200.
40. Molday RS, Yen SP, Rembaum A. Application of magnetic microspheres in labelling and separation of cells. *Nature*. 1977; 268(5619): 437-438.
41. Owen CS, Winger LA, Symington FW, Nowell PC Rapid magnetic purification of rosette-forming lymphocytes. *Journal of Immunology*. 1979; 123(4): 1778-1780.
42. Radbruch A, Recktenwald D. Detection and isolation of rare cells. *Current Opinion in Immunology*. 1995; 7(2): 270-273.
43. Stanciu LA, Shute J, Holgate ST, Djukanovic R Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4+ and CD8+ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *Journal of Immunology. Methods*. 1996; 189(1): 107-115.

-
44. Avrameas S, Guilbert B A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *European Journal of Immunology*. 1971; 1(5): 394-396.
45. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971; 8(9): 871-874.
46. Engvall E Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Methods in Enzymology* . 1980; 70: 419-439.
47. Labrousse H, Guesdon JL, Ragimbeau J, Avrameas S (1982) Miniaturization of β -galactosidase immunoassay using chromogenic and fluorogenic substrates. *Journal of Immunology. Methods*. 1982; 48(2): 133-147.
48. Porstmann T, Kiessig ST Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of Immunology. Methods*. 1992; 150(1-2): 5-21.
49. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Immunology*. 5. Auflage, W. H. Freeman. New York. ISBN 0-7167-4947-5. 2003; S. 148-150.
50. Vollmar A, Dingermann T. Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. WVG Stuttgart. ISBN 3-8047-2189-3. 2005; S. 427-429.
51. Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*. 2000; 42(1): 97-114.
52. Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA. Flow Cytometry. 2. Auflage. Academic Press San Diego. ISBN-13: 978-0125641425. 1994.

-
53. Radbruch A. Flow Cytometry and Cell Sorting. Springer Verlag Berlin. ISBN-13: 9783540656302. 2001.
54. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 4. Auflage. Wiley-Liss New York. ISBN-13: 978-0471411253. 2003.
55. Vollmar A, Dingermann T. Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. WVG Stuttgart. ISBN 3-8047-2189-3. 2005; S. 419-421.
56. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*. 2008; 8: 411-420.
57. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009; 31(3): 401-411.
58. Moraes-Vasconcelos D, Costa-Carvalho BT, Torgerson TR, Ochs HD Primary immune deficiency disorders pre- senting as autoimmune diseases: IPEX and APECED. *Journal of Clinical Immunology*. 2008. 28(Suppl 1):11–19.
59. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD Immune dys- regulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T cell homeostasis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2003; 15: 430–435.
60. Nieves DS, Phipps RP, Pollock SJ et al. Dermatologic and immunologic findings in the immune dysregulation, polyendo- crinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Archives of Dermatology*. 2004; 140: 466–472.
61. Torgerson TR, Ochs HD Immune dysregulation, poly- endocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 120: 744–750.

-
62. 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 cell during cure of colitis. *Journal of Immunology*. 2006; 177(9): 5852-5860.
63. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cell in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005; 128(7): 1868-1878.
64. Holmen N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjovall H, Ohman L. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006; 12(6): 447-456.
65. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Immunology*. 2010; 30(1): 80-89.
66. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *Journal of Immunology*. 2004; 173(5): 3119-3130.
67. Sitohy B, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. Basal lymphoid aggregates in ulcerative colitis colon: a site for regulatory T cell action. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008; 151(2): 326-333.
68. Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007; 13(2): 191-199.

-
69. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006; 314(5804): 1461-1463.
70. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203(11): 2473-2483.
71. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2359-2370.
72. Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, Hue S, Gorelick PL, McKenzie BS, Cua DJ, Powrie F, Cheever AW, Maloy KJ, Sher A. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203(11): 2485-2494.
73. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, Robinson N, Buonocore S, Tlaskalova-Hogenova H, Cua DJ, Powrie F. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; 25(2): 309-318.
74. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T-cell dependent colitis. *Immunity*. 2008; 28(4): 559-570.
75. Liu G, Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Immunology*. 2007; 122(2): 149-156.

-
76. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3: 521–533.
77. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007; 369: 1627–1640.
78. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *Journal of Gastroenterology*. 2008; 43: 1–17.
79. Gionchetti P, Rizzello F, Lammers KM, et al. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12: 3306–3313.
80. Metwali A, Setiawan T, Blum AM, et al. Induction of CD8⁺ regulatory T cells in the intestine by heligmosomoides polygyrus infection. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006; 291: G253–G259.
81. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *Journal of Immunology*. 2006; 176: 705–710.
82. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gamma delta T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2003; 3: 233–242.
83. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*. 2005; 435: 598–604.
84. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *Journal of Immunology*. 2007; 178(1): 179–185.

-
85. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 6659–6664.
86. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *European Journal of Immunology*. 2005; 35: 1681–1691.
87. Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clinical Immunology*. 2007; 123: 18–29.
88. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4⁺FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 2007; 110: 2983–2990.
89. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International Immunology*. 2007; 19: 345–354.
90. Fox BC, Bignone PA, Brown PJ, Banham AH. Defense of the clone: antibody 259D effectively labels human FOXP3 in a variety of applications. *Blood*. 2008; 111: 3897–3899.
91. Pillai V, Karandikar NJ. Attack of the clones? Human FoxP3 detection by PCH101, 236A/E7, 206D, and 259D reveals 259D as the outlier with lower sensitivity. *Blood*. 2008; 111: 463–464.
92. Tran DQ, Shevach EM. Response: antihuman FOXP3 mAb PCH101 stains activated human T cells nonspecifically. *Blood*. 2008; 111: 464–466.

-
93. Battaglia M, Gianfrani C, Gregori S, Roncarolo MG. IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1029: 142-53.
94. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997; 389: 737-742.
95. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192(9): 1213-1222.
96. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews*. 2001; 164: 183-190.
97. Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2008; 24(6): 733-741.
98. Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmitdt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clinical Immunology*. 2007; 125(3): 281-290.
99. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downregulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 2006; 108(1): 253-261.
100. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204(1): 33-39.

-
101. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumor necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology*. 2008; 125(2): 178-183.
 102. Pronio A, Montesani C, Butteroni C, Vecchione S, Mumolo G, Vestri A, Vitolo D, Boirivant M. Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2008; 14(5): 662-668.
 103. Huter EN, Punkosdy GA, Glass DD, et al. TGF-beta-induced Foxp3(+) regulatory T cells rescue scurfy mice. *European Journal of Immunology*. 2008; 38: 1814-1821.
 104. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Current Opinion in Immunology*. 2009; 21(3): 281-285.
 105. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*. 2009; 10(9): 1000-1007.

7. Sonstiges

7.1 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die diese Promotion unterstützt haben.

In besonderer Weise danke ich Herrn Prof. Dr. med. Fichtner-Feigl für die Bereitstellung und großzügige Unterstützung meiner Forschungsarbeit. Insbesondere danke ich ihm für seine intensive fachliche und persönliche Betreuung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern im Labor, allen voran Maria Martin, für die gute Zusammenarbeit und große Unterstützung bedanken.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen, dass sie immer für mich da ist.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag: 05.04.1987
Geburtsort: Mainburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: Römisch-katholisch

Schulische Laufbahn

09/1997 – 07/2006 Gabelsberger Gymnasium Mainburg
30.06.2006 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2006 – 12/2012 Universität Regensburg: Humanmedizin
09/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2012 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.11.2012 Approbation als Ärztin

Doktorarbeit:

Depletion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen verändert die intestinale Homöostase
(Experimentelle Chirurgie, Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl)

Publikation:

Boehm F, Martin M, Kesselring R, Schiechl G, Geissler EK, Schlitt HJ, Fichtner-Feigl S: Deletion of Foxp3⁺ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. BMC Gastroenterol. 2012 Jul 31;12:97.

Vortrag:

„Depletion of Foxp3⁺ regulatory T-cells in genetically targeted mice induces altered intestinal homeostasis and inflammation“
(14. Chirurgische Forschungstage, 23.- 25.09.2010, Rostock)

Praktische Erfahrung

08/2006 – 10/2006 Krankenpflegepraktikum, Kreiskrankenhaus Mainburg

Famulatur

08/2009 – 09/2009 Prof. Dr. Schlitt, Abteilung für Viszeralchirurgie, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universität Regensburg

11/2009 – 11/2009	Prof. Dr. Poets, Abteilung für Neonatologie, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
02/2010 – 02/2010	Praxisfamulatur, Kinderarztpraxis Udo Mülitze, Mainburg
08/2010 – 09/2010	Dr. Collinson, Abteilung für Kardiologie, Chelsea and Westminster Hospital, Faculty of Medicine Imperial College London

Praktisches Jahr

08/2011 – 12/2011	Prof. Dr. Schlitt, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universität Regensburg
01/2012 – 04/2012	Prof. Dr. Greminger, Departement Innere Medizin, Kantonsspital St. Gallen, Universität Zürich
04/2012 – 07/2012	Prof. Dr. Melter, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universität Regensburg, Klinik St. Hedwig

Beruflicher Werdegang

03/2013	Assistenzärztin in der Kinder- und Jugendmedizin, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg, Klinik St. Hedwig
---------	--

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Fließend in Wort und Schrift
Französisch	Gute Schulkenntnisse
Latein	

Sonstiges

- Teddydoc in der Teddyklinik Regensburg 2007, 2008
- Wissenschaftliche Hilfskraft im Anatomiekurs WS 2007/08, Anatomisches Institut der Universität Regensburg
- Nachhilfelehrer an der Volkshochschule Mainburg in Englisch, Deutsch, Mathematik
- Kampfrichter der Rhythmischen Sportgymnastik
- Gute Grundkenntnisse in MS-Office Word, Excel, Power Point

Mainburg, den 28.02.2013

Franziska Böhm

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die Doktorschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Mainburg, den 28.02.2013

Franziska Böhm