

Aus dem Institut für molekulare und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Rolle c-Flip-abhängiger NKp46-positiver Zellen in der intestinalen Homöostase

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Robert Jänsch
Beckendorf-Neindorf
2024

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Jänsch, Robert: Die Rolle c-Flip-abhängiger NKp46-positiver Zellen in der intestinalen Homöostase. – 2024. – 85 Bl., 27 Abb., 10 Tab.

Kurzreferat:

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind häufige Erkrankungen die mit einer hohen Morbidität einhergehen. Trotzdem ist die Pathogenese dieser Erkrankungen noch unvollständig verstanden. Eine große Rolle spielt jedoch das Immunsystem. Das Mausmodell der DSS-induzierten Kolitis ähnelt der Colitis ulcerosa und steht somit als Modell dieser Erkrankung zur Verfügung. So kann die Pathogenese untersucht werden. Der konditionale knock-out von c-Flip in NKp46 exprimierenden Zellen ($NK^{\Delta c\text{-Flip}}$) reduziert die Zahl der NKp46⁺-Zellen. Dabei bleiben NKp46⁻-Zellen weitestgehend unbeeinflusst. Dies gilt auch im Gewebe, unter anderem im Darm. Bei NKp46⁺-Zellen handelt es sich um verschiedene Untergruppen der „innate lymphoid cells“ (ILCs). Diese umfassen konventionelle NK-Zellen (cNK-Zellen), ILC1 und NKp46⁺-ILC3. Im Modell der DSS-induzierten Colitis konnte eine protektive Rolle der NKp46⁺-ILCs in der akuten, wie auch der chronischen Colitis gezeigt werden. In $NK^{\Delta c\text{-Flip}}$ -Mäusen kam es zu vermehrten perianalen Blutabgängen sowie einem stärkeren Gewichtsverlust als Ausdruck einer stärker symptomatischen Kolitis. Ursächlich hierfür scheint u.a. die vermehrte Infiltration von neutrophilen Granulozyten zu sein. Morphologisch zeigen sich bei $NK^{\Delta c\text{-Flip}}$ -Mäusen nach einer DSS-Colitis verkürzte Colons. Auch histologisch können schwerwiegendere Veränderungen durch die Entzündung nachgewiesen werden. Veränderungen in der Komposition von Zytokinen wurden ebenfalls gefunden. Dennoch bleibt der Mechanismus, mit dem NKp46⁺-ILCs eine DSS-induzierte Colitis abschwächen, unvollständig geklärt,

Schlüsselwörter: Innate lymphoid cells (ILCs), dextrane sulfate sodium (DSS), Colitis, chronisch entzündliche Darmerkrankung, intestinale Homöostase, c-Flip

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	1
1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen stellen eine häufige Ursache von Morbidität dar.....	1
1.2. Gliederung des Immunsystems.....	3
1.3. Die Einteilung und Funktionen der „Innate lymphoid cells (ILCs)“.....	8
1.4. Das mukosale Immunsystem.....	12
1.5. Das anti-apoptotische Molekül „cellular-FLICE-inhibitory protein“ (c-Flip).....	14
1.6. Zielstellung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Material.....	18
2.1.1. Reagenzien.....	18
2.1.2. Geräte und Software.....	22
2.1.3. Sonstiges.....	23
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Das verwendete Mausmodell.....	23
2.2.2. Präparation des Dün- und Dickdarms.....	25
2.2.3. Präparation von Lamina-propria Leukozyten (LPL) aus Dick- und Dünndarm.....	27
2.2.4. Präparation von Leukozyten aus der Milz.....	28
2.2.5. Zellzählung.....	29
2.2.6. Analyse der Leukozytensubpopulationen.....	29
2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse der ILCs.....	32
2.2.8. FACS-Analysen der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten.....	32
2.2.9. Das Modell der DSS-Colitis.....	33
2.2.10. Histologie des Colongewebes.....	36
2.2.11. Zytokin-/Chemokinmessungen.....	37
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	38
2.3.1. Isolation von DNA aus dem Mäuseschwanzgewebe.....	38
2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.3.3. Agarosegelelektrophorese zur Erfassung der Größe der PCR-Produkte.....	40
2.3.4. mRNA-Isolation, Umschreibung zur cDNA und qPCR auf Reg3 γ aus Epithelzellen.....	41
2.4. Statistische Analysen.....	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1. NKp46 ⁺ ILC-Subtypen im Darmgewebe von NK ^{Δc-Flip} -Mäusen.....	44
3.2. T- und B-Zellen sowie myeloide Zellen in NK ^{Δc-Flip} -Mäusen.....	47
3.3. Der Verlauf einer akuten DSS-induzierten Colitis bei NK ^{Δc-Flip} -Mäusen.....	49
3.4. Der Verlauf einer chronischen DSS-induzierten Colitis bei NK ^{Δc-Flip} -Mäusen.....	55

3.5. Das Zytokinmilieu in der Erholungsphase der Colitis.....	60
3.6 Veränderungen der Reg3 γ Produktion in NK Δ c-Flip-Mäusen	61
4. Diskussion.....	63
4.1. NKp46 $^{+}$ -ILCs sind c-Flip abhängig	63
4.2. NKp46 $^{+}$ - ILC-Subgruppen wirken protektiv in einer akuten und einer chronischen Colitis.....	63
4.3. Die Regulation der NKp46 $^{+}$ -ILCs auf die Mikrobiota spielt während einer Colitis ebenfalls eine Rolle.....	67
4.4. Implikationen für die Klinik	68
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	70
Danksagung	82
Ehrenerklärung.....	83
Darstellung des Bildungsweges.....	84

Abkürzungsverzeichnis

a488 = Alexa Flour 488

ACK = Ammonium-Chlorid-Kalium

AhR = Aryl-Hydrocarbon Rezeptor

APC = Allophycocyanin

ATG16L1 = Autophagy-related 16-like 1

BV510 = Brilliant Violet 510

CCR6 = C-C Chemokinrezeptor Typ 6

CD = Cluster of differentiation

cDNA = komplementäre DNA

CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankung

CFLAR = CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator

c-Flip = cellular-FLICE inhibitory protein

CHILP = common helper-like ILC progenitor

cre = causes recombination oder cyclization recombination

CTLA-4 = Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen 4

Cy7 = Cyanin 7

DAMPs = Danger oder Damage associated molecular patterns

DD = death domain

DED = death effector domain

DEPC = Diethylprocarbonat

DISC = death-inducing signaling complex

DNA = Desoxyribonucleinsäure

dNTP = Desoxyribonucleosidtriphosphate

DSS = Dextrane sulfate sodium

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

EF = Einzelfärbungen

eF450 = eFlour 450

ELISA = Enzyme-linked immunosorbant assay

Ep-CAM = Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (Epithelial-cellular adhesion molecule)

FACS = Fluorescence activated cell sorting

FADD = Fas-associating death domain containing-protein

FBS = Fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)

FCS = Fetales Kälberserum (Fetal Calb Serum)

FITC = Fourescein Isothiocyanat

FLICE = FADD-like IL-1 β -converting enzyme

floxed (fl) = flanked by loxP

FMO = Fluorescence minus one

FoxP3 = Forkhead-Box-Protein 3

FSC = Forward scatter

GALT = gut-associated lymphatic tissue

GATA3 = Glutamyl Aminotransferase-Untereinheit A

GWAS = Genomweite Assoziationsstudie

HBSS = Hank's balanced salt solution

hILC = Helfer-ähnliche ILC

Hpf = high power field

HPRT = Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase

HRP = horse redish peroxidase

ICAD = Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase

iCre = improved Cre

Ig = Immunglobulin

IL = Interleukin

ILC = Innate lymphoid cell

INF- γ = Interferon- γ

IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle

Lin = Linage

loxP = locus of X-over P1

JAK = Janus-Kinase

LPL = Lamina-propria Leukozyten

LPS = Lipopolysaccharid

MALT = mucosa-associated lymphatic tissue

MHC = Major histocompatibility complex

MMVL = Moloney Murines Leukämie Virus

MPO = Myeloperoxidase

mRNA = messenger RNA

NCR = Natural cytotoxicity receptor

NET = neutrophil extracellular trap

NKp46 = NCR protein of 46 kDa

NK-Zelle = Natürliche Killer-Zelle

NOD = Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein

PAMP = pathogen associated molecular pattern

pANCA = perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper

PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)

PCR = Polymerase Kettenreaktion

PE = Phycoerythrin

PMN = Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

PRR = Pattern recognition receptor

qPCR = quantitative PCR

REG3 γ = regenerating islet-derived protein

RNA = Ribonukleinsäure

ROR γ t = Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t

ROS = Reactive oxygen species

rpm = rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RPMI = Roswell Park Memorial Institute

RT = reverse Transkriptase

SEM = Standard error of the mean

SNP = single nucleotide polymorphism

SSC = Side scatter

Taq-PM = *Termus aquaticus*-Polymerase

TEA = TRIS-Acetat-EDTA

TGF- β = Transforming growth factor- β

TNF = Tumornekrosefaktor

TRAIL = TNF-related apoptosis inducing ligand

UNG = Uracil-DNA-Glykosidase

WT = Wildtyp

1. Einführung

1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen stellen eine häufige Ursache von Morbidität dar

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gehören die Krankheitsbilder Colitis ulcerosa sowie Morbus Crohn. Die Inzidenz in Deutschland beträgt für beide Krankheiten jeweils etwa sechs Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei der Häufigkeitsgipfel der Erstmanifestation im frühen Erwachsenenalter liegt^{1,2}. Es handelt sich um chronische Erkrankungen mit langen Krankheitsverläufen. Zu den Symptomen zählen im Wesentlichen schubweise auftretende abdominelle Schmerzen sowie schleimig-blutige Durchfälle mit häufigen Rezidiven³. Im Verlauf können je nach Entität intrainestinale Komplikationen, wie zum Beispiel Stenosen, Fistelbildung oder Karzinome, auftreten³. Weiterhin werden extraintestinale Manifestationen wie Arthritiden, Augenbeteiligungen oder Hautbeteiligungen wie das Erythema nodosum beobachtet³. Zusätzlich kommt es zu erheblichen sozialen Einschränkungen und zu einer hohen psychischen Belastung bei den Erkrankten⁴.

Der Morbus Crohn präsentiert sich häufiger durch starke abdominelle Schmerzen und kann alle Abschnitte des gastrointestinalen Trakts, von der Mundhöhle bis zum Anus, betreffen³. Histologisch zeigt sich eine disproportionierte, transmurale Entzündungsreaktion mit sogenannten „skip lesions“⁴. Die Entzündung breitet sich nicht kontinuierlich, sondern diskontinuierlich mit entzündungsfreien Schleimhautarealen zwischen den entzündeten Arealen aus^{3,4}.

Die Erkrankungsform Colitis ulcerosa ist häufiger durch das Auftreten schleimiger bis blutiger Durchfälle gekennzeichnet. Sie betrifft das Colon und breitet sich ausgehend vom Rektum bis maximal zum terminalen Ileum aus. Hier zeigt sich die Entzündung kontinuierlich und histologisch auf die Lamina mucosa beschränkt³.

Die Pathogenese beider Erkrankungsformen ist bis heute nicht endgültig geklärt³. Es konnten sowohl genetische Suszeptibilitäten als auch Assoziationen zu Umwelteinflüssen, wie der Ernährung, identifiziert werden⁵. So ist beispielsweise die Inzidenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen bei Individuen, die gestillt wurden, nachweislich niedriger⁶. Der vermehrte Konsum von Fleisch, Fisch, Öl und Süßwaren scheint hingegen die Manifestation chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu begünstigen^{7,8}. Hierfür spricht unter anderem der Anstieg der Inzidenzen beider Entitäten in Asien in Korrelation mit der zunehmend westlichen Ernährungsweise in den letzten Jahrzehnten⁹. Auch antibiotische Therapien stehen im Verdacht, das Auftreten der Erkrankungen begünstigen zu können¹⁰. In diesem

Zusammenhang wird diskutiert, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms eine weitere wichtige Rolle bei der Manifestation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt. Daten aus Mausmodellen zeigen, dass der Transfer des Mikrobioms von an Colitis ulcerosa erkrankten Tieren bzw. der Transfer des Mikrobioms von an einer dem Morbus Crohn ähnlichen Ileitis bei Mäusen auf gesunde Empfänger die entsprechenden Krankheiten auslösen kann^{11,12}. Weiterführende Studien haben deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms bei Patienten mit CED, verglichen zu gesunden Probanden, aufzeigen können¹³⁻¹⁵. So ist die Diversität des Mikrobioms bei CED-Patienten verringert und bestimmte bakterielle Spezies sind vorherrschend. Die Bakterienfamilien *Firmicutes spp.* oder *Bacteroides spp.* sind eher vermindert, wohingegen die *Acinetobacter spp.* eher vermehrt vorkommen^{13,14}. Dies gilt neben der bakteriellen Flora auch für Veränderungen der Zusammensetzung von Fungi und Viren¹⁵.

In Zusammenhang mit genetischen Suszeptibilitäten ist für den Morbus Crohn beispielsweise die Assoziation mit einer Mutation im *NOD2*-Gen entdeckt worden¹⁶⁻¹⁸. Das entsprechende Genprodukt spielt eine wichtige Rolle als Mustererkennungsrezeptor („pattern-recognition receptor“ = PRR) und somit bei der Interaktion des Immunsystems mit Pathogenen, insbesondere mit Bakterien¹⁹. Bei dieser genetischen Assoziation handelt es sich um eine der wenigen, die mehrfach für den Morbus Crohn bestätigt wurde. Weiterführende genomweite Assoziationsstudien (GWAS) haben mittlerweile multiple weitere Gene identifizieren können, in denen beispielsweise SNPs (single nucleotide polymorphisms) mit der Manifestation von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert sind. Viele Gene kodieren dabei für Faktoren des Immunsystems oder spielen eine Rolle bei der Prozessierung von Pathogenen. So wurde auch die Assoziation eines bestimmten SNPs auf dem Genlokus *ATG16L1* (= Autophagy-related 16-like 1) mit dem Auftreten des Morbus Crohn beschrieben²⁰. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das eine wichtige Rolle unter anderem in der intrazellulären Prozessierung von Bakterien zur Antigenpräsentation und schließlich der Einleitung einer Immunantwort spielt. Eine Interaktion des Immunsystems mit der mikrobiellen Flora und damit einhergehende Barrierestörungen der enteralen Schleimhaut sowie gesteigerte Entzündungsreaktionen werden daher als wichtige pathogenetische Faktoren diskutiert²¹⁻²⁴.

Weiterhin wurden verschiedene Autoantikörper mit dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert. Dazu zählen beispielsweise Autoantikörper gegen die intestinalen Epithelzellen oder auch pANCA (= perinucleäre anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper), die gegen Antigene aus neutrophilen Granulozyten gerichtet sind²⁵. Die pathogenetische Bedeutung dieser Autoantikörper ist allerdings nicht hinreichend geklärt.

Zusammen gefasst spielen verschiedene Bestandteile des Immunsystems eine wesentliche Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen²⁶. Aufgrund dessen

werden zur Therapie der Erkrankungen Immunmodulatoren wie beispielsweise Cyclosporin A als Calcineurin-Inhibitor eingesetzt²⁷. In den letzten Jahren wurden durch den Einsatz zielgerichteter Antikörpertherapien (sogenannte Biologika) und „small molecules“ gegen Bestandteile des Immunsystems therapeutische Erfolge erzielt. Hierzu zählen unter anderem Antikörper gegen die Zytokine TNF- α und Interleukin-12/23 oder gegen das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, das auf darmassoziierten T-Helferzellen exprimiert wird²⁸⁻³². Die „small molecules“ sind beispielsweise gegen Janus-Kinasen (JAK) gerichtet und inhibieren intrazelluläre, proinflammatorische Signalwege^{33,34}. Das Verständnis der Komplexität des Immunsystems ist also eine Kernvoraussetzung für die weitere Erforschung der Pathogenese und die Entwicklung weiterer Therapieansätze für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

1.2. Gliederung des Immunsystems

Das Immunsystem unterteilt sich in einen angeborenen oder unspezifischen und einen adaptiven oder spezifischen Teil. Beide Teile werden jeweils noch in zelluläre und humorale Bestandteile untergliedert (s. Abb. 1.1)³⁵.

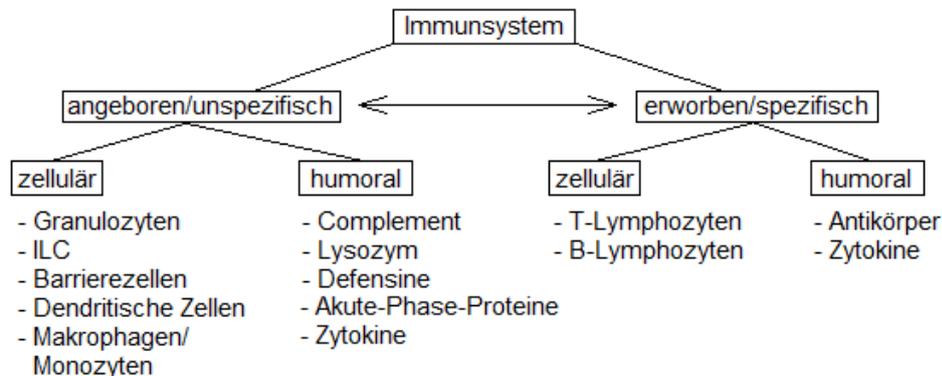


Abb. 1.1: Gliederung des Immunsystems.

Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem weisen humorale und zelluläre Bestandteile auf. Die verschiedenen Komponenten sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems beeinflussen sich gegenseitig.

Neben gewebspezifischen chemischen und physikalischen Barrieren zur Außenwelt bilden humorale Komponenten des unspezifischen Immunsystems, wie das Complementsystem, Lysozym und Defensine, eine erste wichtige Front der Immunabwehr³⁵. Die meisten zellulären Bestandteile des unspezifischen Immunsystems entstammen der myeloischen Entwicklungslinie. Dazu zählen die neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, die Monozyten/Makrophagen, die Mastzellen und die dendritischen Zellen³⁵. Makrophagen

und dendritische Zellen sind im Gewebe lokalisiert und spielen als professionelle Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Rolle in der Initiierung der Immunantwort³⁶. Aus der lymphoiden Entwicklungslinie abstammende Zellen des angeborenen Immunsystems bilden die heterogene Gruppe der „innate lymphoid cells“ (ILCs). Auf diese komplexe und relativ neu charakterisierte Gruppe von Immunzellen wird später ausführlicher eingegangen (s. 1.3).

Das angeborene Immunsystem stellt eine erste Linie der Immunabwehr dar und ist in der Lage, innerhalb weniger Minuten auf potenzielle Krankheitserreger zu reagieren³⁵. Pathogene werden unter anderem anhand von bestimmten molekularen Mustern (PAMPs = Pathogene-associated molecular patterns) wie beispielsweise dem für gramnegative Bakterien typischen Lipopolysaccharid (LPS) erkannt. Die Erkennung ist jedoch nicht antigenspezifisch^{35,37}. Auch unabhängig von Infektionen kann es zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems kommen. Bei Zellschädigung kann es zur Freisetzung von Molekülen kommen, die ähnliche Signalwege aktivieren wie PAMPs. Man spricht bei diesen endogenen Molekülen von DAMPs (= Danger- oder Damage-associated molecular patterns). Hierzu zählen zum Beispiel die normalerweise intranukleär lokalisierten Histone^{38–40} oder freie RNA^{35,41}.

Im Menschen stellen neutrophile Granulozyten die zahlenmäßig größte Gruppe der Leukozyten dar und bilden auch oftmals die erste Linie der leukozytären Immunantwort. Sie phagozytieren extrazelluläre Pathogene und töten diese mit Hilfe reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS)⁴² und lysosomaler Enzyme ab^{43,44}. Weiterhin sind sie in der Lage, mit antimikrobiellen Peptiden und Enzymen ausgestattete DNA-Fragmente - die „neutrophil extracellular traps“ (NETs)⁴⁵ – freizusetzen, die ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung entfalten. Derartige Prozesse sind mit einer Zelltodinduktion auch der Granulozyten selbst verbunden. Darum sind terminal ausdifferenzierte und in die Zirkulation freigesetzte neutrophile Granulozyten mit einer maximalen Lebensdauer von mehreren Stunden bis wenigen Tagen verglichen mit anderen Leukozyten sehr kurzlebig⁴⁶.

Auch die basophilen und eosinophilen Granulozyten gehören zu den myeloischen Zelltypen, die sehr schnell agieren, kommen jedoch verglichen mit neutrophilen Granulozyten in wesentlich geringerer Anzahl in der Zirkulation vor. Sie spielen eine Rolle in der Abwehr von Helminthen und in der Mediation von allergischen Reaktionen³⁵.

Die ebenfalls zu den myeloischen Leukozyten gehörenden Monozyten/Makrophagen sind funktionell sowohl für unspezifische Abwehrprozesse, als auch für die Induktion spezifischer, adaptiver Immunreaktionen wichtig³⁵. Sie phagozytieren ebenfalls Pathogene und produzieren ROS. Die phagozytierten Fremddantigene werden lysosomal prozessiert und über MHC-II-Proteine (= major histocompatibility complex) präsentiert⁴⁷. Makrophagen entwickeln sich aus peripher zirkulierenden Monozyten. Sie sind in der Regel gewebsständig und stellen gewebsspezifische Funktionszustände bzw. Reifegrade der Monozyten dar. Sie können wie

neutrophile Granulozyten über $Fc\gamma$ -Rezeptoren IgG-markierte Pathogene erkennen, phagozytieren und präsentieren^{35,48,49}.

Auch dendritische Zellen gehören zur myeloischen Linie, befinden sich vorrangig in Lymphknoten sowie an Kontaktflächen zur Außenwelt. Sie sind in der Lage, Pathogene zu phagozytieren und prozessieren³⁵. Wie Monozyten/Makrophagen präsentieren sie Fremdartige über MHC-II-Moleküle und spielen eine wesentliche Rolle in der Initiation antigenspezifischer Immunantworten^{35,50}. Makrophagen/Monozyten und dendritische Zellen gehören darum zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (= APC). Dendritische Zellen sind auch in der Lage in andere Organe wie die Lymphknoten zu migrieren um dort Antigene zu präsentieren⁵¹. Dabei ist jedoch auch die Produktion von Zytokinen - Botenstoffen, die der Kommunikation von Zellen dienen - essenziell. Zytokine werden von zahlreichen Zellen des Immunsystems, aber auch von nicht-Immunzellen produziert³⁵. Sie tragen wesentlich zur Vernetzung von Immunantworten bei. Abhängig von den erkannten PAMPs bzw. DAMPs, werden bestimmte Zytokinmuster ausgeschüttet, die eine entsprechend angepasste adaptive Immunantwort modulieren aber auch die angeborene Immunantwort beeinflussen³⁵.

Anders als das angeborene Immunsystem weisen die Immunzellen des adaptiven Immunsystems antigenspezifische Rezeptoren auf³⁵. Dies ermöglicht die spezifische Erkennung von individuellen Pathogenen. Allerdings sind naive, bisher antigenunerfahrene Zellen des adaptiven Immunsystems nicht zur sofortigen Reaktion in der Lage³⁵. Nach primärer Aktivierung benötigen sie etwa sieben Tage, um die zur Infektabwehr benötigten Effektorfunktionen zu entwickeln^{35,52}. Das adaptive Immunsystem besteht aus den B-Lymphozyten und der heterogenen Gruppe der T-Lymphozyten. Beide Zellreihen entstammen gemeinsamen lymphoiden Progenitorzellen des Knochenmarks. Während die B-Zellen im Knochenmark weiter reifen, migrieren die Vorläufer der T-Zellen für den weiteren Reifungsprozess in den Thymus (T = Thymus)³⁵. Im Rahmen der Reifung beider Zellreihen findet eine zufällige Rekombination von Gensequenzen der B- oder T-Zell-Rezeptoren statt^{35,53}. Die zufällige Rekombination ermöglicht die Entstehung einer großen Vielfalt an verschiedenen, jeweils antigenspezifischer Rezeptoren. Die Funktionalität der entstandenen Rezeptoren wird durch die positive Selektion überprüft und setzt eine leichte Bindung der Rezeptoren an Antigene voraus^{35,53,54}. Ist die Antigenbindung der zufällig rekombinierten antigenspezifischen Rezeptoren zu stark, verhindert die negative Selektion die weitere Reifung potenziell gegen das Selbst reagierender Zellen^{35,55}. B- und T-Zellen, die den Reifungsprozess durchlaufen haben, migrieren anschließend in die sekundären lymphatischen Organe wie Milz oder Lymphknoten³⁵.

Kommt es zum Eindringen eines Pathogens, wird dieses zunächst von den Zellen der angeborenen Immunantwort erkannt oder von humoralen Bestandteilen des Immunsystems

gebunden. Insbesondere die dendritischen Zellen als Vertreter der professionellen antigenpräsentierenden Zellen migrieren nach Erkennung und Prozessierung des Pathogens oder Anteilen des Pathogens in die sekundären lymphatischen Organe^{35,56}. Hier präsentieren sie den zirkulierenden T-Zellen Peptidfragmente via MHC-II und bewirken so eine klonale Proliferation und Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen^{35,57}. Die aktivierten T-Zellen können ihrerseits beispielsweise mit B-Zellen oder Makrophagen interagieren und lösen eine Proliferation und Aktivierung aus³⁵. Aufgrund dieser notwendigen Schritte benötigen die Zellen der adaptiven Immunantwort mehr Zeit als die Zellen der angeborenen Immunantwort bis zur Ausübung ihrer Effektorfunktionen³⁵.

Aktiviert B-Zellen produzieren Antikörper verschiedener Klassen als humorale Komponente des adaptiven Immunsystems³⁵. Diese werden meistens sezerniert, können aber auch, insbesondere im Rahmen der Reifung und Selektion, membranständig in Form von B-Zellrezeptoren exprimiert werden. Reife B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und exprimieren nur einen bestimmten antigenspezifischen Antikörper³⁵. Zusätzlich exprimieren B-Zellen MHC-II-Moleküle und fungieren als professionelle antigenpräsentierende Zellen^{35,58}.

T-Zellen besitzen ebenfalls jeweils einen bestimmten, antigenspezifischen T-Zellrezeptor. Dieser bildet unter anderem zusammen mit CD3 (CD = Cluster of differentiation) als Oberflächenmolekülkomplex eine Einheit^{35,59}. Die T-Lymphozyten sind eine heterogene Gruppe, die sich in die CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten und die CD4-positiven T-Helferzellen (T_H-Zellen) untergliedern lässt³⁵. Während die T-Zellrezeptoren der CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten mit peptidbeladenem MHC-I auf allen kernhaltigen Zellen interagieren⁶⁰, interagieren die T-Zellrezeptoren der CD4-positiven T_H-Zellen mit peptidbeladenem MHC-II professioneller antigenpräsentierender Zellen^{35,61}. Im Rahmen einer Immunantwort entstammen die Peptidfragmente auf den MHC dem auslösendem Pathogen wie z.B. Bakterien oder Viren. Es können aber ebenfalls mutierte körpereigene Proteine z.B. bei Tumorerkrankungen auf MHC erkannt werden³⁵.

Aufgabe der zytotoxischen T-Zellen ist es, das peptidbeladene MHC-I virusbefallener Zellen oder Tumorzellen zu erkennen und Apoptose in den Zielzellen auszulösen^{35,60}. Aufgabe der T-Helferzellen ist es hingegen, mit anderen Immunzellen zu interagieren. Dies wird unter anderem durch die Produktion löslicher Botenstoffe, sogenannter Zytokine, gewährleistet. Diese können mittels parakriner Effekte die Funktion anderer Immunzellen in der unmittelbaren Umgebung beeinflussen. Über autokrine Effekte können Zytokine auch auf die produzierenden T-Helferzellen selbst wirken³⁵. In Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmikromilieu nehmen T_H-Zellen verschiedene Funktionszustände an^{35,62}. Auf diese Funktionszustände wird später genauer eingegangen.

Die größte und wichtigste Gruppe der Zytokine sind die Interleukine (IL). Zellen des angeborenen Immunsystems sowie auch Stroma- und Epithelzellen produzieren abhängig von Pathogenen eine Vielzahl an Zytokinen. Die Zytokine induzieren schließlich die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H-Effektorzellen mit ihrerseits charakteristischen Zytokinprofilen³⁵. Dies bezeichnet man als Polarisierung und man unterscheidet anhand der von den T_H-Zellen produzierten Zytokine unter anderem zwischen T_{H1}⁻, T_{H2}⁻, T_{H17}⁻ und den T_{reg}-Zellen^{35,62,63}.

Bakterielle Infektionen führen zur Produktion von IL-12 und IL-18 durch Makrophagen oder dendritische Zellen^{35,64–66}. IL-12/18 fördern die Expression des Transkriptionsfaktors Tbet in T_H-Zellen, der wiederum die Aktivität des *IFNG*-Gens fördert und so die Differenzierung Interferon- γ (IFN- γ) produzierender T_H-Zellen vorantreibt³⁵. In diese Richtung polarisierte T_H-Zellen werden als T_{H1}-Zellen bezeichnet^{35,67}. Die exprimierten Zytokine verstärken einerseits die Aktivierung von Makrophagen und induzieren andererseits einen Immunglobulin (= Ig)-Klassenwechsel in B-Zellen zur Klasse der IgG2a in Mäusen⁶⁸.

Bei Infektionen mit Parasiten (z.B. *Schistosoma mansoni*) oder dem Eindringen von Allergenen produzieren u.a. Mastzellen IL-4 und Epithel- und Stromazellen IL-25 und IL-33. Dieses Zytokinmilieu fördert die Differenzierung IL-4, IL-5 und IL-13 produzierender T_{H2}-Zellen^{35,69}. Durch diese Effektorzytokine werden eosinophile Granulozyten, der Ig-Klassenwechsel der B-Zellen zur Produktion von IgE und IgG1⁷⁰ und die Degranulation der Mastzellen induziert³⁵. T_{H2}-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA3³⁵.

Infektionen mit extrazellulären Pathogenen (z.B. Pilze und einige Bakterien) führen zur Produktion von IL-1, IL-6, IL-23 und Transforming growth factor- β (TGF- β)³⁵. Dieses Zytokinmilieu begünstigt die Differenzierung von proinflammatorischen T_{H17}-Zellen. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktoren ROR γ t³⁵. STAT3 als weiterer Transkriptionsfaktor wird (z.B. durch Phosphorylierung⁷¹) aktiviert und führt zur Expression der Zytokine IL-17 und IL-22³⁵. Während IL-17 insbesondere durch Aktivierung und Rekrutierung des angeborenen Immunsystems proinflammatorisch wirkt, ist IL-22 neben seiner proinflammatorischen Funktion auch ein wichtiger Faktor für die Integrität und Regeneration von entzündeten Epithelien z.B. im Gastrointestinaltrakt^{72,73}. IL-22 wird ausschließlich von Immunzellen produziert und bindet an Rezeptoren, die auf Epithelzellen in verschiedenen Organen exprimiert werden, wodurch die Bedeutung der Immunzellen für die epitheliale Homöostase weiter unterstrichen wird⁷⁴.

Bei T_{H22}-Zellen handelt es sich um einen relativ neu beschriebenen Funktionszustand, der vor allem durch die Produktion von IL-22 charakterisiert ist⁷⁵. T_{H22}-Zellen differenzieren überwiegend in einem von IL-6 dominierten Milieu und weisen Ähnlichkeiten mit T_{H17} und T_{H1}-Zellen auf⁷⁵. Sie exprimieren ROR γ t sowie AhR (Aryl-Hydrocarbon Rezeptor)⁷⁵ und in

geringem Maße Tbet⁷⁶. Die genaue Funktion der T_{H22}-Zellen ist nicht abschließend geklärt, allerdings scheinen sie eine Rolle in verschiedenen Autoimmunreaktionen sowie der Homöostase von Epithelien zu spielen⁷⁵⁻⁷⁷.

Schließlich werden regulatorische T-Zellen, sogenannte T_{reg}-Zellen (T_{regs}) beschrieben. Diese Gruppe von CD4⁺-T-Zellen wird unterteilt in natürliche T_{regs} (nT_{regs}) und induzierbare T_{regs} (iT_{regs})⁷⁸. Die nT_{regs} grenzen sich bereits während der Reifung im Thymus ab und entstehen dort durch Erkennung von MHC-II-Peptid (MHCIIp)-Komplexen. Die iT_{regs} hingegen gehen aus aktivierten CD4⁺-T-Helferzellen in der Peripherie hervor⁷⁸. In der unterschiedlichen Entwicklung von nT_{reg} oder iT_{regs} scheinen die Methylierungsgrade von Gensequenzen eine wichtige Rolle zu spielen⁷⁹. T_{regs} agieren stets antigenspezifisch und sind wichtig für die Modulation aktivierter T-Helferzellen³⁵. Die Unterscheidung differenzieller Funktionen beider T_{reg} Populationen ist noch immer Gegenstand aktueller Forschung. Als dominanter Transkriptionsfaktor wird von T_{regs} FoxP3 (Forkhead-Box-Protein 3) exprimiert^{35,80}. Anders als die bisher beschriebenen T-Zellen bewirken T_{regs} durch Expression der Zytokine TGF-β und IL-10 eine Suppression der Immunfunktion^{35,81-83}. Zusätzlich weisen sie eine hohe Dichte an hochaffinen Rezeptoren für IL-2 auf, das sie zur Reifung benötigen⁸⁴. Da IL-2 auch für andere T-Zellen als Signal für Wachstum und Proliferation wirkt³⁵, vermindern T_{regs} die Bioverfügbarkeit dieses für alle T-Zelluntergruppen wichtigen Zytokins³⁵. Über die Expression des inhibitorisch wirkenden Liganden CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte Associated Antigen-4) blockieren T_{regs} das kostimulatorische Molekül B7 (CD80/86) auf APC³⁵ und verhindern so die Aktivierung weiterer T-Zellen^{35,85}. Durch ihre immunsuppressive Wirkung verhindern T_{regs} demnach überschießende, potenziell gewebsschädigende Immunreaktionen und tragen damit entscheidend zur immunologischen Selbsttoleranz bei³⁵.

1.3. Die Einteilung und Funktionen der „Innate lymphoid cells (ILCs)“

ILCs sind lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems, die im Jahre 2011 erstmals klassifiziert wurden⁸⁶. Allerdings wurden lymphoide Zellen mit heterogener Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren schon zuvor beschrieben und oftmals als Untergruppen der NK-Zellen (NK-like) verstanden^{87,88}. Im Unterschied zu T- und B-Lymphozyten exprimieren ILCs keine antigenspezifischen Rezeptoren^{35,86}. Basierend auf den Expressionsprofilen von Transkriptionsfaktoren und Effektormolekülen lassen sich ILCs in ähnliche Subtypen unterteilen, wie dies oben für T-Zellen beschrieben wurde⁸⁶. Man unterscheidet zwischen konventionellen natürlichen Killer-Zellen (cNK-Zellen), die CD8⁺ Killer T-Zellen entsprechen, sowie Helferzell-ähnlichen ILCs (hILCs), die CD4⁺ TH-Zellen ähneln⁸⁶. Diese spiegeln bzgl. der Expression von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen die verschiedenen funktionellen Untergruppen der T-Helferzellen wider (s. Abb. 1.2)^{89,90}. Daneben existieren die sogenannten

LTi (Lymphoid tissue inducer), die schon länger als hämatopoetischer Zelltyp bekannt und später näher erläutert werden⁸⁶. Die cNK-Zellen sind im Gegensatz zu den hILCs schon seit langer Zeit bekannt³⁵. Sie benutzen ähnliche Mechanismen wie zytotoxische T-Zellen zur Einleitung einer Apoptose in entsprechenden Zielzellen^{35,91}. Hierbei dienen sie hauptsächlich der Abwehr virusinfizierter bzw. maligner Zellen, die sie unter anderem anhand der fehlenden Expression von MHC-I erkennen^{91,92}. Zusätzlich exprimieren cNK-Zellen das Zytokin IFN- γ ^{35,93}. Dieses führt wie oben beschrieben beispielsweise zur T_{H1}-Polarisierung, aktiviert Makrophagen und bewirkt einen Klassenwechsel der B-Zellen zu IgG2a⁶⁸.

Auch hinsichtlich ihrer Entwicklung unterscheiden sich hILCs und cNK-Zellen. Ein gemeinsamer Vorläufer der hILCs wurde beschrieben, der „common helper-like ILC progenitor“ (CHILP), aus dem alle hILCs, nicht aber die NK-Zellen differenzieren⁹⁰. Zur Entwicklung der hILCs sind die Transkriptionsfaktoren Id2 sowie GATA3 notwendig^{90,94}. Ein weiteres Charakteristikum von hILCs stellt die Expression von CD127, dem Rezeptor für IL-7, dar^{35,86,94}. IL-7 ist für die Entwicklung der hILCs essenziell. Die Differenzierung von NK-Zellen hingegen ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Eomes (Eomesodermin)⁹⁵. Eine Ausnahme stellen die thymischen NK-Zellen dar, deren Entwicklung ebenfalls von CD127 abhängig ist^{96,97}. Für die Entwicklung und Reifung der NK-Zellen sowie für die Gruppe 1 der ILCs, die später erläutert wird (s. Abb. 1.2), ist zusätzlich das Zytokin IL-15 ausschlaggebend⁹⁸. In den Signaltransduktionswegen von IL-7 und IL15 stellt STAT-5 eine wichtige Komponente dar⁹⁹⁻¹⁰².

Bei den hILCs handelt es sich um hauptsächlich gewebsständige, sessile Zellen^{35,103}. Mit Hilfe von Parabiose-Experimenten wurde nachgewiesen, dass hILCs im Gegensatz zu T-Zellen nur in einem sehr geringen Maße zirkulieren (Frequenz in der Zirkulation unter 2%)¹⁰³. Ebenso findet die Proliferation der hILCs überwiegend im peripherem Gewebe statt¹⁰³. Vorläuferzellen der hILCs sind in der fötalen Leber sowie im späteren Leben im Knochenmark zu finden¹⁰⁴. Nicht vollständig geklärt ist, wann und aus welchem Zellpool die Besiedlung der Gewebe mit hILCs erfolgt. Auf Grund der Gewebsständigkeit und der fehlenden Antigenspezifität können hILCs schneller aber weniger spezifisch auf das Eindringen von Pathogenen oder Veränderungen der Homöostase im Gewebe reagieren als die T-Helferzellsubtypen¹⁰⁵.

Anhand der Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren und von Zytokinen lassen sich hILCs in drei Gruppen unterteilen (s. Abb. 1.2)^{35,86,106}. Die hILCs der Gruppe 1 (ILC1) exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet sowie das Effektorzytokin Interferon- γ (IFN- γ)^{107,108}. Sie dienen der Aktivierung von Makrophagen, der zellulären Immunabwehr, sowie der Einleitung von Entzündungsreaktionen ähnlich der oben beschriebenen T_{H1}-Zellen^{107,108}. Von einigen Autoren werden die cNK-Zellen auf Grund ihrer Expression von T-bet und IFN- γ

ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet¹⁰⁶. Allerdings exprimieren cNK-Zellen zusätzlich den charakteristischen Transkriptionsfaktor Eomes und entstehen, wie bereits erwähnt, aus einer anderen Vorläuferzelle als die hILC1^{90,109}.

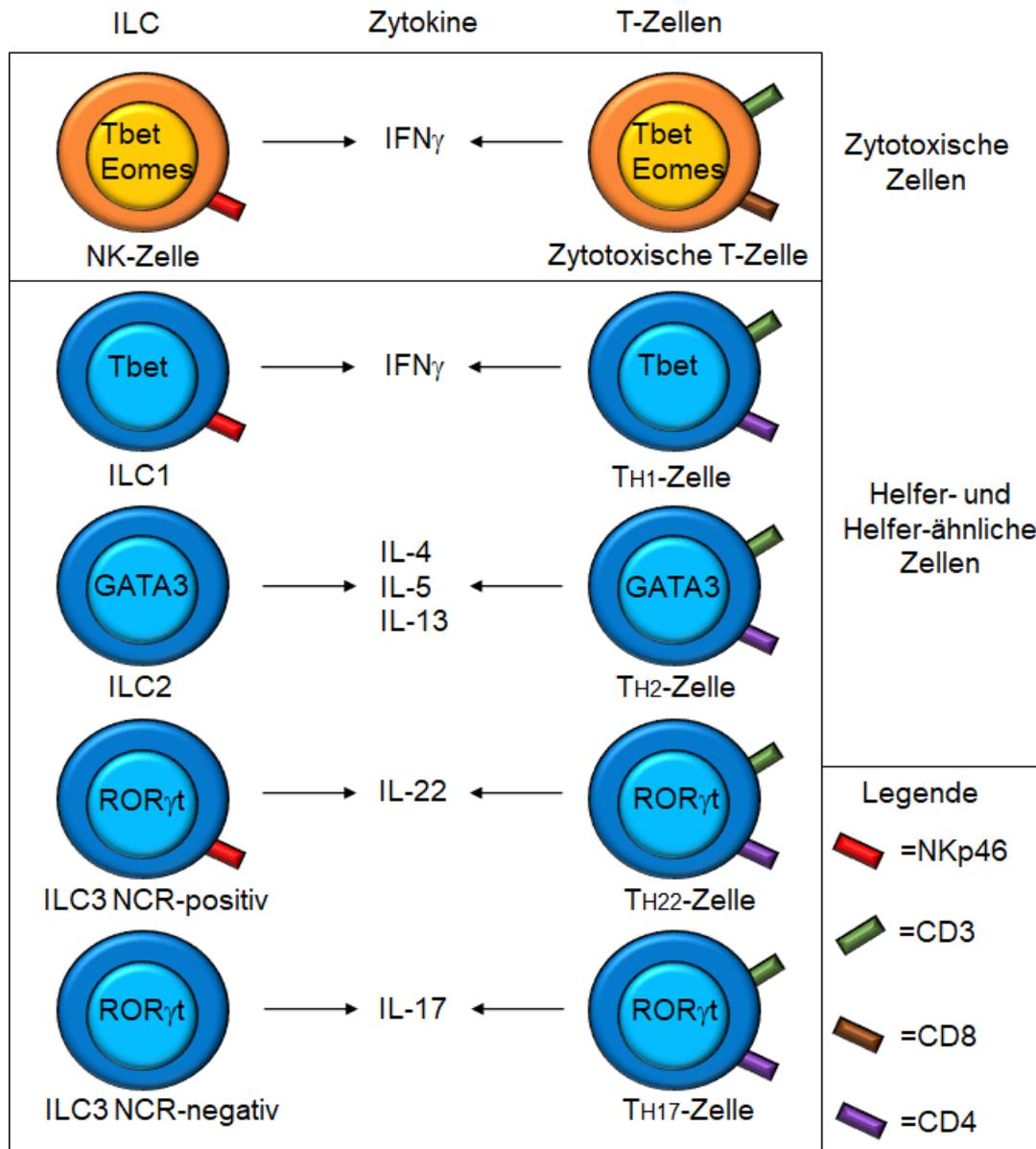


Abb. 1.2: Gegenüberstellung von ILCs und den entsprechenden T-Zell Untergruppen. Die Darstellung zeigt vereinfacht die Redundanzen bezüglich den dominierenden Transkriptionsfaktoren sowie den Zytokinexpressionsprofilen zwischen bestimmten ILC-Subpopulationen und den korrespondierenden T-Zell-Untergruppen. Zusätzlich dargestellt sind T-Zell-spezifische Marker und welche ILC-Subtypen den NCR1 (natural cytotoxicity receptor) NKp46 exprimieren.

ILC2 exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA3 sowie die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und ähneln demnach den T_{H2}-Zellen^{35,110}. Sie spielen damit eine Rolle bei der Abwehr von Parasiten und der Mediation von allergischen Reaktionen^{110–112}.

Der Transkriptionsfaktor ROR γ t ist typisch für ILC3, die anhand funktionaler Merkmale weiter unterteilt werden können⁸⁶. Dazu zählt die Gruppe der „lymphoid-tissue inducer“-Zellen (LTi-Zellen). Sie sind für die Bildung sekundärer lymphatischer Organe, sogenannter „Anlagen“, wichtig und können in Mäusen CD4 exprimieren^{113,114}. Weiterhin lassen sich „natural-cytotoxicity“-Rezeptor (NCR)-positive und -negative ILC3 unterscheiden⁸⁶. Hierbei exprimieren die NCR-positiven ILC3 in Mäusen Oberflächenproteine aus der Gruppe der NCR. Hierzu zählen NKp46 (NCR1), welches vorrangig in Mäusen exprimiert wird, NKp44 (NCR2) und NKp30 (NCR3). Diese Rezeptoren werden von NCR-negativen ILC3 nicht exprimiert¹¹⁵. Im Menschen exprimieren die NCR-positiven ILC3 überwiegend das Oberflächenprotein NKp44 (NCR2), aber auch NKp46 (NCR1)¹¹⁶. In der vorliegenden Arbeit werden die NCR-positiven ILC3 anhand ihrer Expression von NKp46 unterschieden. Sie werden daher im Weiteren als NKp46⁺-ILC3 bezeichnet. NKp46⁺-ILC3 exprimieren IL-22 und kein IL-17 und ähneln somit den T_{H22}-Zellen^{117,118}. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Homöostase von mukosalen Epithelien sowie in der Wechselwirkung von Schleimhäuten mit der lokalen mikrobiellen Flora⁷³. Die NCR-negativen ILC3 können hingegen IL-17 als auch IFN γ exprimieren, sind den T_{H17}-Zellen ähnlich und spielen eine pro-inflammatorische Rolle^{86,106}. Ähnlich wie bei den T-Helferzellsubtypen besteht auch bei den hILCs eine Plastizität zwischen bestimmten Gruppen. Insbesondere zwischen ILC1 und ILC3 sind, abhängig vom Zytokinmilieu, Übergänge ineinander möglich¹¹⁹. Als Beispiel sind die exROR γ t⁺ ILC3 zu nennen, die unter bestimmten Bedingungen ihre ROR γ t-Expression verlieren und einen hILC1-ähnlichen Phänotyp annehmen können¹¹⁹. Eine hohe Konzentration an IL-2, IL-1 β und IL-23 stabilisiert eher einen ILC3 Funktionszustand, wohingegen das isolierte Vorliegen hoher IL-2-Mengen oder IL-2 zusammen mit IL-12 eher eine Polarisierung in Richtung ILC1 bewirkt^{120,121}. Insgesamt sind diese Prozesse reversibel.

Unter den gewebsständigen Leukozyten machen die hILCs einen vergleichsweise kleinen Anteil aus^{35,103}. Die höchste Dichte weisen die ILCs in Organen mit Kontakt zur Außenwelt auf. Dazu zählen die Dermis und noch ausgeprägter mukosale Oberflächen^{108,122}. Durch den ständigen Kontakt zur kommensalen mikrobiellen Flora, aber auch unbekanntem, exogenen Antigenen, sind besondere Erfordernisse an das mukosale Immunsystem gestellt. Die komplexe Situation insbesondere im gastrointestinalen Trakt wird im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

1.4. Das mukosale Immunsystem

Die Wandschichtung im Gastrointestinaltrakt ist im Wesentlichen über die gesamte Länge hinweg konstant. Von lumenwärts aus besteht die Wand zunächst aus der Tunica mucosa, die wiederum aus einer Epithelschicht, der Lamina propria und der Lamina muscularis mucosae besteht¹²³. Darauf folgen die Tela submucosa, die Tunica muscularis sowie die Tunica adventitia bzw. die Tela subserosa mit der Tunica serosa je nach retro- oder intraperitonealer Lage des Darmabschnitts¹²³. Die Immunzellen sind generell eher in den lumenwärts gerichteten Wandschichten lokalisiert³⁶. Die größte Dichte liegt in der Lamina propria vor, aber auch zwischen den Epithelzellen befinden sich vereinzelt intraepitheliale Leukozyten³⁶. Innerhalb der Lamina propria sammeln sich insbesondere die B-Lymphozyten in Form von Lymphfollikeln, die solitär oder aber gehäuft vorliegen können. Besonders im Jejunum und im Ileum bilden Ansammlungen von Lymphfollikeln die Peyer-Plaques, die in Richtung des terminalen Ileums in ihrer Anzahl zunehmen, aber im Colon fehlen¹²³. In den Peyer-Plaques befinden sich zwischen den Follikeln Ansammlungen von T-Lymphozyten³⁶. Nach Übergang des Ileums in das Colon an der Ileozökalklappe befindet sich am Coecum die Appendix vermiformis, die eine spezielle anatomische Ansammlung von Lymphfollikeln in hoher Menge darstellt und dementsprechend auch als „Darmtonsille“ bezeichnet wird¹²³.

Bei den vereinzelt in den Wandschichten vorliegenden Leukozyten handelt es sich vornehmlich um T-Lymphozyten, IgA-produzierende Plasmazellen, dendritische Zellen, Makrophagen und ILCs³⁶. Insgesamt werden diese Ansammlungen von Immunzellen im Gastrointestinaltrakt als „GALT“ (= gut-associated lymphatic tissue) bezeichnet (s. Abb. 1.3)^{123,124}. Die Vielfalt an Antigenen, die die Mukosa passieren, wird von M-Zellen aufgenommen und über Transzytose an dendritische Zellen weitergeben, die diese Antigene dann präsentieren^{35,125,126}. M-Zellen stellen hierbei spezialisierte Epithelzellen dar, die selber keine Antigene präsentieren aber transportieren können^{125,126}. Durch den ständigen Kontakt zu Antigenen, PAMPs und bakteriellen Metaboliten weisen die Lymphozyten in der Lamina propria einen aktivierten Phänotyp auf und liegen häufig als Effektorzellen vor^{127–130}. Anschließend können sie einen Gedächtniszell-Phänotyp annehmen^{130–132}. Inwiefern auch für die ILCs ein Effektorzustand existiert ist Gegenstand aktueller Forschung. Zumindest für die ILC1 scheint eine Differenzierung zu „Effektor-ILC1“ mit zytotoxischer Funktion jedoch möglich zu sein¹³³. Der höhere Aktivierungszustand der Darmleukozyten soll das Eindringen von Mikroorganismen aus dem Darmlumen verhindern. Möglicherweise mit Gewebsschäden einhergehende überschießende Reaktionen werden durch darmständige T_{regs} verhindert. Hierbei spielt TGF- β eine wichtige Rolle^{36,134}. Im Falle von Infektionen verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten einer antimikrobiellen Immunantwort³⁶.

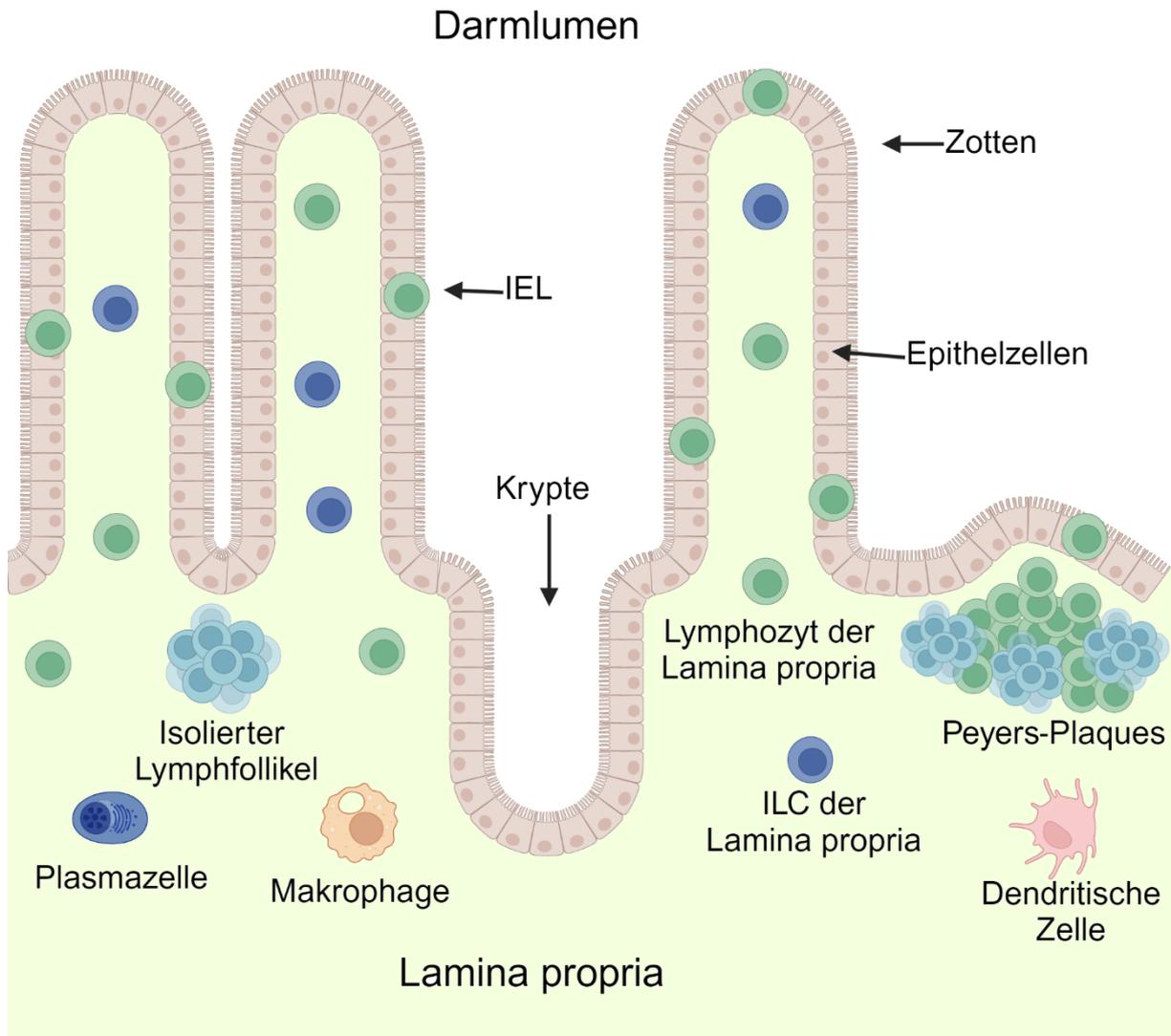


Abb. 1.3: Verteilung der Immunzellen in der Tunica mucosa des Dünndarms. Wie im Text beschrieben, sind einige Lymphozyten zwischen den Epithelzellen als intraepitheliale Lymphozyten (= IEL) lokalisiert, die überwiegende Mehrzahl befindet sich jedoch in der Lamina propria. Die Peyer-Plaques bilden eine Ansammlung von Lymphfollikeln, die sogar makroskopisch sichtbar sein können. Zudem kommen solitäre Lymphfollikel in der Mucosa vor. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com.

Es erfolgt das „homing“, also die zielgerichtete Einwanderung weiterer Immunzellen in die Lamina mucosa. Hierbei stellt das bereits erwähnte $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf T-Lymphozyten einen wichtigen Rezeptor für das „homing“ dar³⁶.

In der Interaktion mit der kommensalen mikrobiellen Flora ist das angeborene Immunsystem von herausragender Bedeutung³⁵. Als gewebständige Zellen mit der Fähigkeit zur Zytokinproduktion spielen die ILCs hierbei eine besondere Rolle. Während ILC2 eher in der Mukosa des respiratorischen Traktes sowie dermal zu finden sind¹³⁵, kommen ILC3 insbesondere im Gastrointestinaltrakt vor¹³⁶.

Aufgrund ihrer Lokalisation in Geweben, der funktionellen Redundanz zu T-Zellen und einer relativ geringen Anzahl ist die Analyse der ILC-Zusammensetzung und Funktion schwierig.

Erste Daten zu den Funktionen der ILCs wurden daher in RAG (Rekombination-aktivierender Genkomplex) knock-out Mäusen (RAG^{-/-}) generiert^{108,111,117,137}. Durch die Inaktivierung von RAG kommt es zu einem Defekt der somatischen Rekombination, die für die Bildung antigenspezifischer T- bzw. B-Zellrezeptoren notwendig ist. RAG-defiziente Mäuse sind daher durch das Fehlen reifer T- und B-Lymphozyten gekennzeichnet³⁵. Experimente unter Einsatz dieser artifiziellen Mausmodelle mit inkomplettem Immunsystem besitzen darum nur begrenzte Aussagekraft. Zur Evaluation der Funktion von ILCs in immunkompetenten Mäusen sind also neue Modelle notwendig. Eine Chance bieten konditionale Knock-out-Modelle, in denen Gene selektiv in bestimmten ILC-Subtypen, jedoch nicht in korrespondierenden T-Zellsubtypen manipuliert werden können. Der konditionale Knock-out von Molekülen, die zum Überleben der ILC-Subtypen notwendig ist, stellt eine Option dar.

1.5. Das anti-apoptotische Molekül „cellular-FLICE-inhibitory protein“ (c-Flip)

Bei c-Flip handelt es sich um ein Protein in eukaryotischen Zellen, das in drei Splicevarianten vorkommt: c-Flip_L (long), c-Flip_S (short) und c-Flip_R (Raji)¹³⁸. Jede dieser Varianten besitzt zwei „death-effector domains“ (DED) und die c-Flip_L-Form zusätzlich eine Caspase-ähnliche Domäne mit hoher struktureller Ähnlichkeit zur Procaspase 8, allerdings ohne katalytische Aktivität¹³⁸. Die c-Flip_L-Form spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation des extrinsischen Weges der Apoptoseinduktion, der bei Bindung von Liganden an die sogenannten Todesrezeptoren ausgelöst wird. Zu den Todesrezeptoren gehören unter anderem CD95 (Fas-Rezeptor), TNF-Rezeptor 1 (TNF = Tumornekrosefaktor) und TRAIL-Rezeptor 1 (TRAIL = TNF-related apoptosis inducing ligand)¹³⁸. Nach Bindung der Liganden wie z.B. Fas-Ligand (= FasL) erfolgt die Oligomerisierung des entsprechenden Todesrezeptors. Hierbei bindet an die „death-domains“ (DD) des Todesrezeptors das Fas-assoziierte Protein mit death-domain (FADD), das seinerseits bestimmte, als „death effector domains“ (DEDs) bezeichnete Proteinbindungsdomänen enthält¹³⁸. An diese Domänen bindet Procaspase 8 und komplettiert den „death-inducing signalling complex“ (DISC). Nach Rekrutierung und Dimerisierung der Procaspase 8-Moleküle erfolgt eine autokatalytische Aktivierung zu proteolytisch aktiver Caspase 8¹³⁹. Die Caspase 8 gilt als Initiatorcaspase und aktiviert kaskadenartig durch limitierte Proteolyse die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 des extrinsischen Weges sowie auch zusätzliche Effektoren des intrinsischen Weges der Apoptose^{138,139}. Die Effektorcaspasen sind ihrerseits proteolytisch aktiv und spalten unter anderem Proteine des Zytoskeletts und Inhibitoren von DNAsen wie ICAD (= Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase), woraus die Fragmentierung der DNA (= Desoxyribonukleinsäure) resultiert¹³⁹.

Bereits die initialen Schritte der Apoptoseinduktion münden in einen unumkehrbaren programmierten Tod einer Zelle und müssen daher streng reguliert sein. Durch die bereits

erwähnte strukturelle Ähnlichkeit von c-Flip_L zu Procaspase 8 erfolgt eine Heterodimerbildung von Procaspase 8 und c-Flip_L über die DEDs. Dadurch wird die autokatalytische Aktivierung der Procaspase 8 zur Caspase 8 verhindert^{138,139}. Die Expression von c-Flip stellt somit einen Schutzmechanismus von Zellen gegen die Induktion der Apoptose dar (s. Abb. 1.4)^{139,140}.

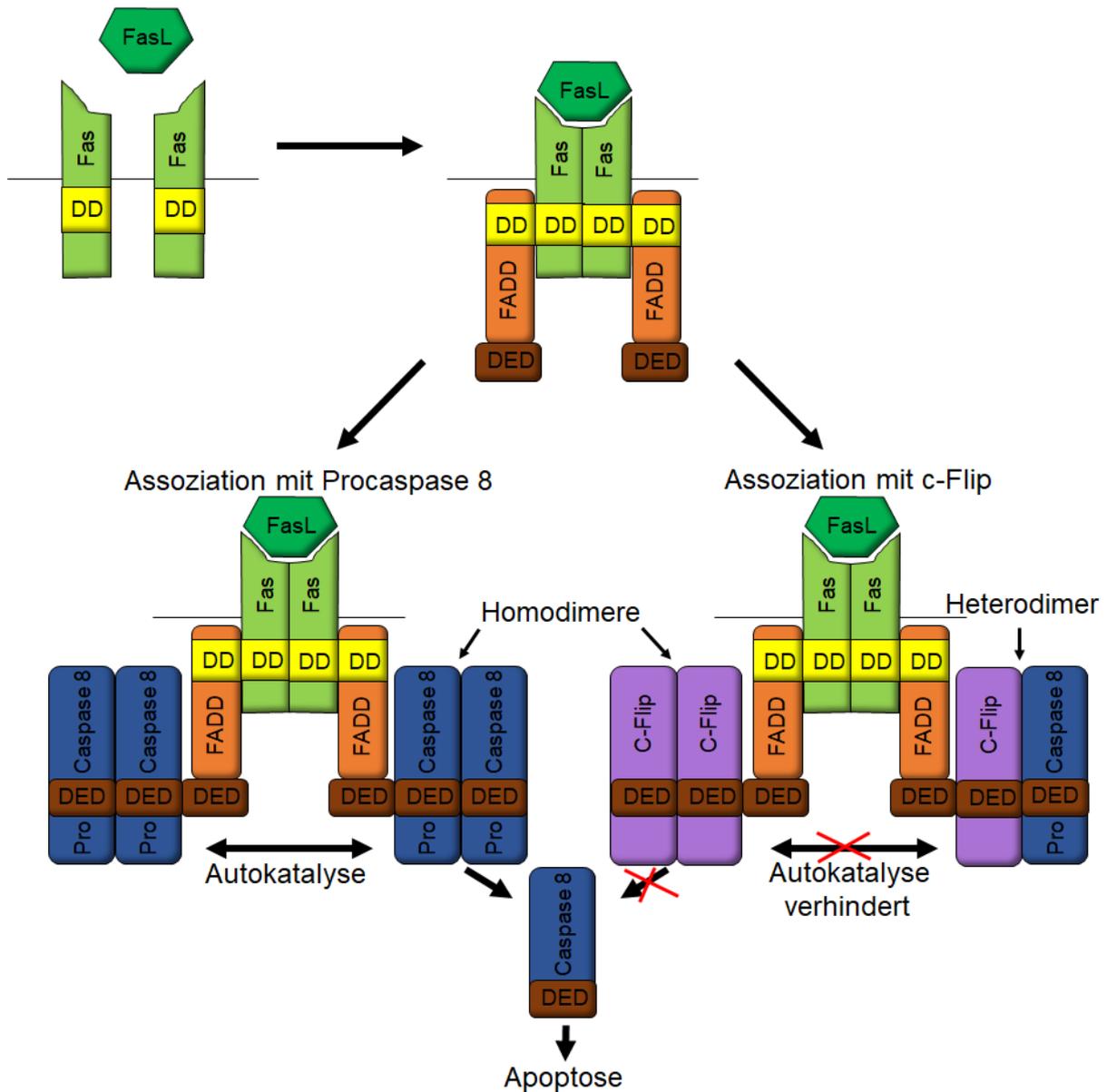


Abb. 1.4: Formierung des DISC und die Funktion von c-Flip. Schematisch dargestellt ist die Formierung eines DISC bei Bindung des FasL an den Rezeptor Fas mit anschließender autokatalytischer Aktivierung der Procaspase 8 zur aktiven Caspase 8 bei Aktivierung des extrinsischen Wegs der Apoptose. Dem gegenübergestellt ist die Bindung des Caspase 8-ähnlichen Moleküls c-Flip. Die Autokatalyse und so die Aktivierung der Procaspase 8 wird durch Bindung von c-Flip an die DEDs gehemmt.

Es konnte gezeigt werden, dass c-Flip ein wichtiges Molekül für die Reifung und das Überleben verschiedener Zellen, unter anderem auch für T-Zellen, darstellt¹⁴¹⁻¹⁴³.

Diese Erkenntnisse wurden mit Hilfe von Modellen konditionaler c-Flip Knock-out-Mäuse gewonnen. Mit Hilfe des Cre/loxP Systems (siehe Kapitel 2.2.1) wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. rer. nat. T. Schüler eine neue konditionale Knockout-Mauslinie generiert. NKp46^{iCre/wt}-Mäuse, bei denen unter Kontrolle des NKp46-Promotors die Rekombinase iCre exprimiert wird, wurden mit Mäusen verpaart, deren c-Flip-Genlokus von loxP-Stellen flankiert ist. In Nachkommen dieser Verpaarung ist in allen NKp46-exprimierenden ILC-Subpopulationen das c-Flip-Gen spezifisch inaktiviert. Diese konditionale Mauslinie wird im Folgenden als NK^{Δc-Flip} bezeichnet.

1.6. Zielstellung der Arbeit

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. T. Schüler haben ergeben, dass die spezifische Inaktivierung der Genexpression von c-Flip in NKp46-exprimierenden Zellen zu einer Veränderung der Komposition von ILCs in verschiedenen Immunorganen wie der Milz und dem Knochenmark, aber auch in der Leber führt. Andere Zelltypen des Immunsystems blieben dabei unbeeinflusst (medizinische Dissertation von Rebecca Labrenz)¹⁴⁴.

Weiterführende *in-vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Entwicklung der NKp46⁺-ILCs bei Fehlen von c-Flip in einem frühen Reifestadium abbricht. Die erhobenen Ergebnisse legen nahe, dass c-Flip im Laufe der Entwicklung von NKp46⁺-ILCs für das Überleben der Zellen essenziell ist.

Da ILCs überwiegend gewebsständige Zellen mit ausgeprägtem Bezug zum mukosalen Immunsystem unter anderem des Gastrointestinaltrakts sind, ergeben sich folgende Zielstellungen der vorliegenden Dissertation:

Die Komposition der ILC-Subpopulationen in der Lamina propria des Darmgewebes von konditionalen NK^{Δc-Flip}-Mäusen soll zunächst mit der in genetisch intakten Kontrolltieren verglichen werden. Dazu werden relative und absolute Zellzahlen der ILC-Subpopulationen und anderer Zellgruppen im Darmgewebe mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Nachdem in den vergangenen Jahren überwiegend experimentelle Systeme mit T- und B-Zell-defizienten Mäusen verwendet wurden, um die Funktion von ILCs zu studieren, zeigten Arbeiten von Vely et al. und Fischer & Rausell 2016, dass Patienten mit selektivem ILC-Mangel keine verstärkte Vulnerabilität gegenüber bestimmten Erkrankungen zu haben scheinen^{145,146}. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die Rolle der ILCs bei intakten T- und B-Zellfunktionen unter pathophysiologischen Bedingungen zu definieren. Daher sollen die Auswirkungen einer veränderten ILC-Komposition auf die Induktion und den Verlauf einer akuten sowie einer chronischen Colitis in konditionalen NK^{Δc-Flip}-Mäusen untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll auch die Komposition des mukosalen

Immunsystems, mit besonderem Augenmerk auf die NKp46⁺-ILCs, in akuter und chronischer Colitis analysiert werden.

Zur Simulation von Colitiden in Mäusen stehen verschiedene Modelle zur Verfügung¹⁴⁷. Zum einen existieren Modelle in denen sich in genetisch veränderten Mäusen spontan eine Colitis entwickelt. Zum anderen kann dieses Krankheitsbild auch durch Infektion oder die Gabe von Substanzen induziert werden, die das Darmepithel direkt schädigen. Besonders gut untersucht ist das Modell der DSS- (dextrane sulfate sodium) induzierten Colitis¹⁴⁸. DSS wird mit dem Trinkwasser verabreicht und wirkt nach enteraler Applikation direkt epithelzelltoxisch. Es löst eine mukosale Entzündungsreaktion vorrangig im Colon aus¹⁴⁸. Auf Grund des histologischen Erscheinungsbildes und der resultierenden Symptomatik in Form von rektalen Blutabgängen, Gewichtsverlust und Änderung der Kotkonsistenz, ähnelt eine DSS-induzierte Colitis der humanen Colitis ulcerosa¹⁴⁸.

In der vorliegenden Dissertation wurde das Modell der DSS-induzierten Colitis gewählt, mit dem einerseits durch einmalige Applikation eine akute Colitis simuliert wird, andererseits durch zyklische Applikationen auch die chronische Situation mit schubweisem Verlauf imitiert werden kann¹⁴⁸.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Antigen	Antikörperklon	Hersteller	Fluorochrom
B220	RA3-6B2	BD Bioscience	PE
CCR6	29-2L17	BioLegend	APC
CD11b	M1/70	BioLegend	BV510
CD11c	N418	BioLegend	a488
CD127	A7R34	BioLegend	PE
CD16/CD32 Fc Block 2.4G2		eigene Herstellung	
CD19	1D3	BD Bioscience	a488
CD19	eBio1D3	eBioscience	APC
CD3 ϵ	145-2C11	BioLegend	BV421
CD4	RM4-5	BioLegend	BV450
CD44	1M7	BioLegend	APC
CD45	30-F11	BioLegend	APC-Cy7
CD5	53-7.3	BioLegend	a488
CD62L	MEL-14	BioLegend	FITC
CD8a	53-6.7	BioLegend	PE-Cy7
CD90.2	53-2.1	BioLegend	BV510
Ep-CAM	G8.8	BioLegend	PE-Cy7
Gr-1	RB6-8C5	BioLegend	FITC
NK1.1	PK136	BioLegend	PE-Cy7
NKp46	29A1.4	BD Bioscience	eF450

Reagenz	Hersteller
Chloroform	Sigma-Aldrich
Collagenase D	Roche
Corning Dispase	BD Bioscience
Dextran sodium sulfate, MW=36.000-50.000	MP Biomedicals
DNase I	Sigma-Aldrich
dNTPs	Applied Biosystems/Roth
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma Aldrich
Easycoll	Biochrom
Easycoll, Dichte 1,124 g/ml	Biochrom
Ethanol, absolut	AppliChem Panreac
Ethydiumbromid	Roth
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
FCS	PAN-Biotech
Fetales Rinderserum, Süd-Afrika (Fetal Bovine Serum, FBS)	PAN-Biotech
Foxp3-Fixations-/Permeabilisierungspuffer (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set)	Invitrogen eBioscience
Hanks Salzlösung (Hank's balanced salt solution; HBSS)	Biochrom
HEPES (1M)	Gibco
Isofluran CP	CP-Pharma
Isopropanol (2-Propanol für die Molekularbiologie)	AppliChem Panreac
LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel	BioLegend
Mouse IL-22 ELISA Ready SET-Go	eBioscience
PBS Dulbecco	Biochrom
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	Gibco
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen

Proteinase K	Sigma Aldrich
RNase-freies Wasser (RNase free water)	Qiagen
RPMI 1640 Medium	Biochrom
Streptavidin	BD Bioscience
TaqMan Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems
Trypanblau (C.I. 23850)	Carl Roth
Trypsin/EDTA-Lösung (10x), 0,5%/0,2% (w/v) in (10x) PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom

Medien, Puffer, Lösungen

ACK-Lysepuffer (1x):	0,1mM Na ₂ EDTA 10 mM KHCO ₃ 155 mM NH ₄ Cl pH: 7,2-7,4
MACS-Puffer:	1x PBS 2mM EDTA 0,5% BSA pH: 7,2-7,4
PBS (1x):	1,7 mM NaH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 154 mM NaCl pH: 7,2-7,4
PBS-EDTA (1x):	1x PBS 2 mM EDTA pH: 7,2-7,4
PBS/PS	1x PBS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
Biopsie-Lyse Puffer (1x):	100 mM Tris/HCl (pH=8) 5 mM Na ₂ EDTA (pH=8)

	0,2% SDS (pH=7,2)
	200 mM NaCl
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris-Base
	57 ml Essigsäure
	100 ml 0,5 mM EDTA
	pH: 8,0
TE Puffer (1x):	10 mM Tris/HCl (pH=8)
	0,1 mM Na ₂ EDTA (pH=8)
Standard-Medium:	RPMI 1640
	10% FCS
	100 U/ml Penicillin/Streptomycin
Verdau-Mix:	RPMI 1640
	4% FCS
	0,25 mg/ml Collagenase D
	0,2 mg/ml Dispase II
	0,25 mg/ml DNase I
Zell-Dissoziationslösung:	HBSS
	5 mM EDTA
	10 mM HEPES
	100 U/ml Penicillin/Streptomycin
PCR-Primer:	
NKp46Cre	
NKp46ex7-Forward:	5'-GGA ACT GAA GGC AAC TCC TG-3'
NKp46-IRES-Reverse:	5'-CCC TAG GAA TGC TCG TCA AG-3'
NKp46ex7- Reverse:	5'-TTC CCG GCA ACA TAA AAT AAA-3'
FLIP-fl	
FLIP-flox F new:	5'-CAT GAG CAC TGA GGG ACA CAG CAC-3'
FLIP-flox-Rev1 new:	5'-CGG AGT TTC CTA CAG GAA GGC CAC-3'
Reg3γ	
Forward	5'-CGT GCC TAT GGC TCC TAT TGC T-3'

Reverse 5'-TTC AGC GCC ACT GAG CAC AGA C-3'

HPRT

Forward 5'-CTG GTG AAA AGG ACC TCT CGA AG-3'

Reverse 5'-CCA GTT TCA CTA ATG ACA CAA ACG-3'

2.1.2. Geräte und Software

Geräte

Hersteller

Falcon 15 mL Zentrifugationsröhrchen	fisher scientific
Falcon 50 mL Zentrifugationsröhrchen	fisher scientific
Flow Cytometer LSR Fortessa	BD Bioscience
Homogenisator Precellys24	Peqlab
Inkubator (Incubating Orbital Shaker)	VWR
Mikrotiterplatten	Carl Roth
Mikrowelle	Severin
Multiwell-Platten	Corning
Neubauer Zählkammer	Hartenstein
Petrischale	VWR
Präzisionswaage M-Pact AX423	Sartorius
Reaktionsgefäße 1,5/2 mL mit safe lock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5/2 mL	Eppendorf
Spectrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer Compact	Eppendorf
Vortex LMS	Kisker Biotech
Waage (CS Series, CS200)	OHAUS
Zellsiebe 40/70/100 µm	Falcon, Corning

Zentrifuge Fresco 17	Heraeus-Thermo Scientific
Zentrifuge Megafuge 40R	Heraeus-Thermo Scientific
Zentrifuge Pico 17	Heraeus-Thermo Scientific

Software

BD FACSDiva v9.0

BioRender.com

Citavi 6

FlowJo 9.7.5

GraphPad Prism 5

Microsoft 365

Microsoft Excel 2013

Microsoft Word 2013

Hersteller

BD Bioscience

BioRender

Swiss Academic Software

BD Life Science

Statcon

Microsoft

Microsoft

Microsoft

2.1.3. Sonstiges

hemoCARE

CARE diagnostica

2.2. Methoden

2.2.1. Das verwendete Mausmodell

Zur Generierung konditionaler Knockout-Mäuse, bei denen das c-Flip-Gen spezifisch in NKp46-exprimierenden ILC-Subpopulationen inaktiviert ist, wurde das Cre/loxP-Rekombinationssystem genutzt (Abb. 2.1)¹⁴⁹. Es wurden NKp46^{iCre/wt}-Mäuse¹¹⁵ verwendet, die von Prof. Eric Vivier (Marseille) zur Verfügung gestellt wurden. In diesen Mäusen wurde mit Hilfe des Knock-in Verfahrens die cDNA (cDNA = komplementäre DNA) der Rekombinase iCre ins 3'-Ende des *NKp46/Ncr1* Genlokus eingebracht, sodass die Expression der Rekombinase unter Kontrolle des *NKp46*-Promotors erfolgt. Bei iCre (improved Cre) handelt es sich um eine ursprünglich aus einem Bakteriophagen gewonnene Rekombinase, die durch genetische Modifikation auf die Nutzung und Expression in eukaryontischen Zellen optimiert wurde¹⁵⁰. Da das gezielte Einbringen des iCre-Transgens die Expression des NKp46-Proteins verhindert und NKp46 als aktivierender NK-Rezeptor fungiert, wurden im Rahmen der Dissertation

ausschließlich Tiere verwendet, die heterozygot für den NKp46-Genlocus sind (NKp46^{iCre/wt}-Mäuse). Lediglich für Verpaarungen wurden auch homozygote NKp46^{iCre/iCre}-Männchen eingesetzt.

C-Flip^{fl/fl}-Mäuse¹⁴¹ wurden von Prof. Ingo Schmitz (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Bei diesen Tieren wurden loxP-Sequenzen in das für c-Flip codierende *CFLAR*-Gen integriert. Diese loxP Sequenzen werden durch die Rekombinase iCre erkannt und die dazwischenliegende Gensequenz deletiert. In Folge der Deletion ist die Expression des c-Flip Proteins spezifisch in iCre-exprimierenden Zellen inaktiviert.

Durch Verpaarung beider oben beschriebenen transgenen Inzuchtmauslinien mit C57BL/6-Hintergrund wurden konditionale Knock-out-Mäuse generiert, bei denen ausschließlich in NKp46-exprimierenden Zellen das *CFLAR*-Gen inaktiviert ist (s. Abb. 2.1). Um für die geplanten Untersuchungen konditionale NK^{Δc-Flip}-Tiere und die geeigneten Geschwistertierkontrollen mit intaktem c-Flip-Gen (NK^{WT}) zu generieren, wurde folgende Verpaarungsstrategie angewendet.

Männliche Tiere, die auf beiden NKp46-Allelen das iCre-knock-in Konstrukt trugen (NKp46^{iCre/iCre}), aber nur auf einem Chromosom das loxp-flankierte c-Flip-Gen besaßen (cFlip^{fl/wt}), wurden mit Weibchen verpaart, die über Wildtyp-NKp46-Allele (NKp46^{WT/WT}) verfügten und ebenfalls heterozygot für das mit loxP-Sequenzen flankierte *CFLAR*-Gen waren. Bei den Nachkommen dieser Verpaarungen resultiert stets der heterozygote Genotyp NKp46^{iCre/wt} und den mendelschen Regeln folgend entweder c-Flip^{fl/fl}, c-Flip^{wt/wt} oder c-Flip^{fl/wt}. Für alle Experimente im Rahmen dieser Dissertation wurden NKp46^{iCre/wt} x c-Flip^{fl/fl}-Mäuse verwendet, die im Weiteren als NK^{Δc-Flip}-Mäuse bezeichnet werden. Als Kontrolltiere mit intakter c-Flip-Expression dienten NKp46^{iCre/wt} x c-Flip^{wt/wt}-Mäuse, die im Weiteren als NK^{ΔWT}-Mäuse bezeichnet werden.

Wie bereits erwähnt, wurden auf Grund der gewählten Verpaarungsstrategie beide für die Experimente relevanten Genotypen als Geschwistertiere erzeugt. Sofern möglich, wurden entweder männliche oder weibliche Geschwistertiere mit verschiedenen Genotypen im Rahmen eines „Cohousings“ in einem gemeinsamen Käfig gehalten, um mögliche Einflüsse von Umweltfaktoren auf die intestinale Mikroflora zu vereinheitlichen.

Alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Tiere wurden im zentralen Tierlabor der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gehalten. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Anleitung und Aufsicht einer fachkundigen Betreuerin durchgeführt. Die entsprechenden tierschutzrechtlichen Genehmigungen lagen vor (2-1202 Uni MD, Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt).

Die Versuchstiere wurden durch Inhalation einer Überdosis des gasförmigen Anästhetikums Isofluran durch autorisiertes Laborpersonal entsprechend den tierschutzrechtlichen Richtlinien getötet.

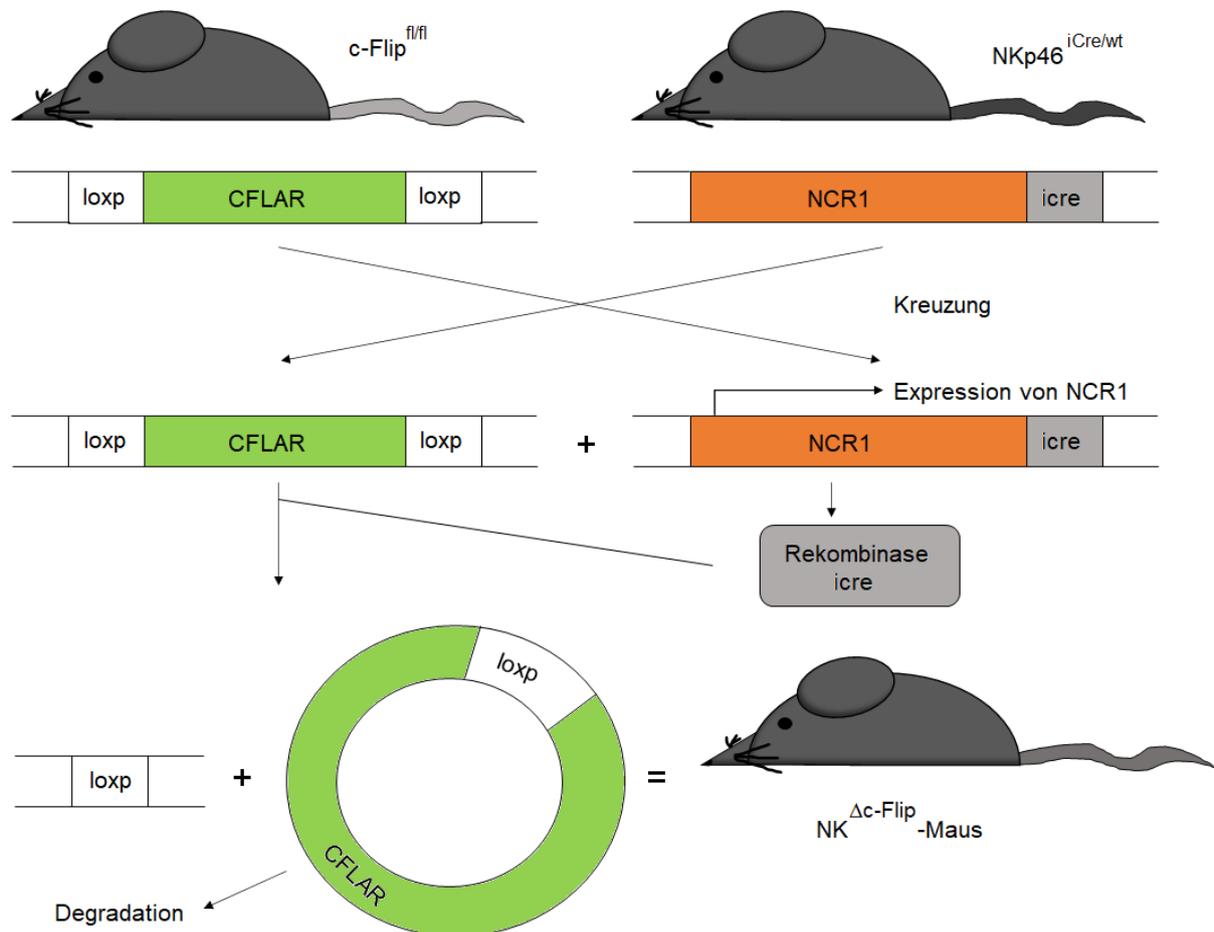


Abb. 2.1: Kreuzungsschema des Mausmodells.
 In $c\text{-Flip}^{fl/fl}$ -Mäusen ist das Gen für c-Flip ($CFLAR$) beidseits von $loxP$ Stellen flankiert (floxed). Die $NKp46^{iCre/wt}$ -Mäuse produzieren abhängig von der Expression des $NKp46$ Gens ($Ncr1$) die Rekombinase $iCre$ auf einem Allel. Diese erkennt und schneidet spezifisch an den $loxP$ -Stellen. Nach der Paarung der Mauslinien entstehen daher $NK^{\Delta c\text{-Flip}}$ -Mäuse. In diesen wird $NKp46$ -abhängig $iCre$ exprimiert und $iCre$ exzidiert das von $loxP$ flankierte $CFLAR$ Gen aus der Gensequenz. Es handelt sich somit um einen konditionalen knock-out von c-Flip.

2.2.2. Präparation des Dün- und Dickdarms

Die Versuchsmäuse wurden danach in dorsaler Lage mit Hilfe von Nadeln an den Extremitäten auf einem Präparierbrett fixiert. Es erfolgte eine großflächige und großzügige Desinfektion mit 70%igem Ethanol. Mit einer Pinzette wurde das Fell der Mäuse abdominell angehoben und mit einer stumpfen Schere im Unterbauch die Haut eröffnet und vom Peritoneum gelöst. Der Schnitt wurde etwa median in Richtung kranial bis zum Hals erweitert. Kaudal wurde der Schnitt in beide Richtungen jeweils nach lateral erweitert. Es resultierte ein etwa Y-förmiger Schnitt, so dass die Haut aufgeklappt und ebenfalls mit einer Nadel fixiert werden konnte. Der Thorax wurde eröffnet und aus dem rechten Ventrikel mittels 18G Kanüle und einer 1 ml

Spritze so viel Blut wie möglich drainiert, um einerseits Blut für verschiedenste Analysen zu asservieren und andererseits Blutungen im Präparationsgebiet zu minimieren. Anschließend erfolgte die vorsichtige Öffnung der Peritonealhöhle ebenfalls mittels eines Y-förmigen Schnitts. Das Peritoneum wurde ebenfalls per Nadel seitlich fixiert.

Zur Präparation des Dünndarms wurde zunächst der Magen aufgesucht und der proximale Teil des Dünndarms vom Magen abgetrennt. Anschließend wurde mit einer Pinzette der Dünndarm angehoben und mit einer zweiten Pinzette das Mesenterium vom Dünndarm bis zum Übergang des terminalen Ileums in das Colon ascendens abgezogen. Hier wurde das Ileum vom Colon abgetrennt.

Zur Präparation des Dickdarms wurde zunächst der Anus der Maus kreisförmig umschnitten. Daraufhin wurde der Beckenknochen einseitig rechts oder links durchtrennt und der Analkanal bzw. das Rektum der Maus von dorsal, lateral und auch ventral präpariert und gelöst. Anschließend wurde das Caecum aufgesucht und das Colon in ähnlicher Weise wie der Dünndarm vom Mesenterium getrennt. Nach Entfernung des Colons wurde die Länge des Colons erfasst und final sowohl das Caecum als auch der Anus abgetrennt.

Das auf diese Weise gewonnene Darmgewebe wurde vorsichtig von Kot befreit und für die Isolation von Lamina-propria Leukozyten verwendet oder für histologische Analysen und Messung von Zytokinen asserviert.

Im Falle der Asservierung wurde das Colon in seiner gesamten Länge gedrittelt, so dass eine ungefähre Einteilung in die Abschnitte Colon ascendens (proximal), Colon transversum (medial) und Colon descendens (distal) erfolgte. Diese Drittel wurden wiederum gedrittelt, um die Asservierung für drei weiterführende Untersuchungen zu ermöglichen (s. Abb. 2.2)

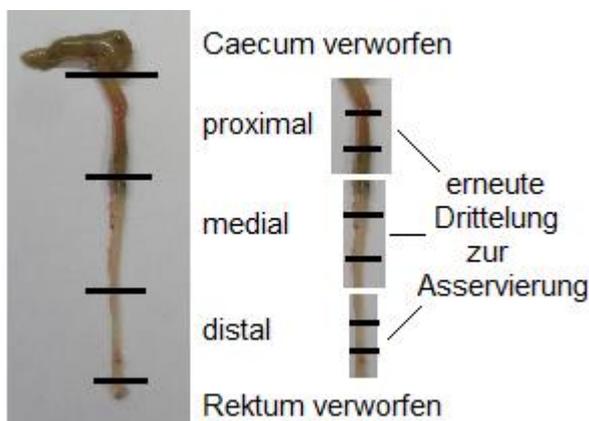


Abb. 2.2: Schema zur Teilung des Colons für weiterführende Untersuchungen. Um Daten aus verschiedenen Colonabschnitten zu generieren, die sich geringfügig in ihrer Architektur und Physiologie unterscheiden, wurde das Colon in seiner gesamten Länge gedrittelt. Aus den Abschnitten Colon ascendens (proximal), Colon transversum (medial) und Colon descendens (distal) wurden jeweils ein Drittel für verschiedene weiterführende Untersuchungen asserviert und eingesetzt.

Pro Abschnitt wurde ein Drittel (ca. 1cm Länge) für histologische Untersuchungen in 4%igem Formalin eingebettet (s. 2.2.10). Ein weiteres Drittel jedes Abschnitts wurde in 500 µl Standard-Medium (RPMI 1640 mit 2% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) für Zytokinanalysen inkubiert (s. 2.2.11). Die verbliebenen Neuntel wurden für weitere, spätere Analysen bei -80°C eingefroren.

2.2.3. Präparation von Lamina-propria Leukozyten (LPL) aus Dick- und Dünndarm

Nach der Entnahme des Darmgewebes wurden zunächst bei den Dünndärmen die Peyer-Plaques aufgesucht und heraus geschnitten. Sowohl aus dem Dün- als auch aus dem Dickdarm wurde der Kot vorsichtig entfernt und die Därme mit einer Schere longitudinal aufgeschnitten. Mit einer Feinwaage wurde das Gewicht der Dickdärme gemessen. Alle Darmsegmente wurden in 50 ml-Röhrchen mit 25 ml kaltem, mit Antibiotika versetztem PBS (PBS/PS) gegeben, um durch Schütteln Kot- und Schleimreste zu entfernen. Dieser Vorgang wurde zwei bis dreimal wiederholt, bis die PBS-Lösung nach dem Schütteln klar blieb.

Das Darmgewebe wurde zusammen mit der EDTA-haltigen Zelldissoziationslösung (HBSS, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PS); pro Colon 10ml, pro Dünndarm 20ml) in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur horizontal mit 100 Umdrehungen pro Minute (rpm) im Inkubator geschüttelt, um die Ablösung der Epithelschicht zu erreichen. Durch 15 Sekunden intensiven Schüttelns mittels Vortex erfolgte die mechanische Dissoziation der Epithelschicht. Der epithelzellhaltige Überstand wurde für weitere molekularbiologische Analysen (z.B. Reg3 γ , s. 2.3.4.) gesammelt. Das Gewebe wurde erneut mit 20 ml Zelldissoziationslösung versetzt und nachfolgend bei Raumtemperatur im Inkubator für weitere 20 Minuten geschüttelt. Nach nochmaligem intensivem Schütteln mittels Vortex für 15 Sekunden und Entfernung des Überstandes wurde das Darmgewebe zweimal mit 20-30 ml kaltem PBS/PS für einige Minuten inkubiert, um das EDTA der Zelldissoziationslösung aus dem Gewebe auszuwaschen. Dieser Schritt ist essenziell, da EDTA die Aktivität der zum Gewebeverdau eingesetzten Metalloproteasen inhibiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Darmgewebe in einer Petrischale mit einer Schere und einem Skalpell in etwa 1-2 mm große Stückchen zerkleinert, um den Enzymen zum Gewebeverdau den Zugang in das Gewebe zu erleichtern. Die Gewebestückchen wurden in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen gegeben und 5 ml Protease- und DNase-haltiger Verdau-Mix (RPMI 1640, 4% FCS, 0,25 mg/ml Collagenase D, 0,2 mg/ml Dispase II, 0,25 mg/ml DNase I) zu den Colongewebsstückchen bzw. 10 ml Verdau-Mix zu den Dünndarmgewebestückchen hinzugegeben. Die Gewebestückchen wurden 15 Minuten bei 37°C horizontal mit 100 rpm geschüttelt und anschließend 15 Sekunden mit Hilfe des Vortex weiter mechanisch aufgeschlossen. Durch ein 100 µm-Zellsieb wurden die noch nicht

vollständig aufgeschlossenen Gewebeteile vom LPL-haltigen Überstand separiert. Anschließend wurde die gewonnene LPL-haltige Zellsuspension durch ein 40 µm-Zellsieb in ein neues Zentrifugationsröhrchen gegeben und auf Eis gestellt. Diese Schritte zum Gewebeverdaulich wurden zwei- bis dreimal bis zum erfolgreichen Aufschluss des Gewebes wiederholt. Alle Filtrate wurden auf Eis gesammelt und anschließend 10 Minuten bei 800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3,3 ml Medium mit 1,7 ml Easycoll resuspendiert. Ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen wurde mit 3 ml 80%igem Easycoll befüllt. Darauf wurden 5 ml einer 44%igen Easycoll Lösung geschichtet. Anschließend wurde das gelöste Zellpellet vorsichtig auf den diskontinuierlichen Easycoll-Gradienten geschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 600 x g ohne Beschleunigung und ohne Bremse für 20 Minuten. Es resultierten zwei Schichten sowie eine Interphase. Die oberste Schicht enthielt Fett, Schleim sowie Epithelzellreste und wurde verworfen. Zwischen dem 80%- und 44%-igem Easycoll befand sich die Interphase mit den Lamina-propria-Leukozyten. Diese wurde vorsichtig aufgenommen und in ein neues 15 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben. Auf die Zellsuspension wurde 12 ml eisgekühltes PBS gegeben und sie wurde 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in 1 ml RPMI mit 10% FCS resuspendiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (s. 2.2.5). Als Richtwerte für eine erfolgreiche LPL-Isolation gelten etwa 0,5 bis 1 Millionen Zellen pro Colon sowie etwa 2-10 Millionen Zellen pro Dünndarm.

2.2.4. Präparation von Leukozyten aus der Milz

Die Präparation bis zur Peritonealhöhle erfolgte in gleicher Weise wie die Präparation des Dün- und Dickdarms. Die Milz befindet sich im linken oberen Abdomen, liegt intraperitoneal und konnte leicht durch Abtrennen des Milzhilus herauspräpariert werden. Das Organ wurde in ein Röhrchen mit 2 ml kaltem PBS-EDTA gegeben. Anschließend wurde das Organ mit Hilfe eines Spritzenbolzens durch ein Metallsieb in einer Petrischale vorsichtig mechanisch aufgeschlossen. Zur vollständigen Gewinnung der Splenozyten erfolgte die Spülung des Spritzenbolzens sowie des Siebes mit 3 ml PBS-EDTA. Verbliebene makroskopisch sichtbare Zellaggregate wurden durch mehrmaliges Aufziehen und wieder Ausstoßen durch eine Kanüle vereinzelt. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und auch die Petrischale mit 5 ml PBS-EDTA gespült. Auch diese leukozytenhaltige Spüllösung wurde in das Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml hypoosmolaren ACK-Lysepuffer zur Lyse der Erythrozyten exakt 90 Sekunden resuspendiert und inkubiert. Durch Zugabe von 7 ml RPMI mit 10%ige FCS wurde wieder ein isotoner Zustand hergestellt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 400 x g und 4°C für 5

min. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellett in 1 ml RPMI resuspendiert und auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen und die Analysen.

2.2.5. Zellzählung

Zur Zellzählung wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Auf die Zählkammer wurde ein spezielles Deckgläschen gesetzt. Bei korrekter Platzierung sind Newton'sche Ringe zu sehen. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension 1:2 mit dem polyanionischem Azofarbstoff Trypanblau (Konzentration von 0,5%) versetzt. Dieser Farbstoff wird nur von abgestorbenen und perforierten Zellen aufgenommen und bindet dort an Proteine. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden unter das Deckgläschen pipettiert. Die Lebendzellzahl wurde durch zeitnahe Zählung der nicht gefärbten Zellen in jeweils vier Quadranten bestehend aus je 16 Kästchen ermittelt und der Mittelwert aus den vier Zählungen gebildet. Das Produkt des Mittelwerts mit dem Verdünnungsfaktor und mit dem Faktor der Zählkammer (10.000) ergab die Zellzahl pro ml Lösung.

2.2.6. Analyse der Leukozytensubpopulationen

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Leukozytensuspensionen wurden monoklonale Antikörper gegen bestimmte Zellantigene eingesetzt, die eine eindeutige Identifikation von Leukozytensubpopulationen ermöglicht. Die Antikörper sind mit verschiedenen Fluorochromen markiert, die im Durchflusszytometer eine Unterscheidung und Quantifizierung der relativen Anteile bestimmter Immunzellsubtypen erlauben.

Um die ILCs von anderen Leukozyten zu unterscheiden, wurde eine Gemisch aus Antikörpern eingesetzt, die an typische Oberflächen-Moleküle von T- und B-Zellen sowie myeloischen Leukozyten - die sogenannten Lineage-Marker (Lin) - binden. Alle Antikörper in dieser Mischung waren mit dem gleichen Fluorochrom markiert. In Tabelle 2.1. sind diese Lineage-spezifischen Marker aufgelistet. Die Gesamtheit der ILCs war als Lineage-Marker negativ definiert.

Zur Identifikation der ILC-Subtypen wurden verschiedene Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet. In der Tab. 2.2 sind die Antigene, gegen die die Fluorochrom-markierten Antikörper gerichtet sind und ihre jeweiligen Zielzellen aufgelistet.

Tab. 2.1: Lineage-spezifische Marker zur Abgrenzung von ILCs zu anderen Immunzellpopulationen

Oberflächenmolekül	Vorkommen
CD5	T-Zellen und einige B-Zellen
CD19	B-Zellen
CD11c	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen
Gr-1	Gegen Ly6G und Ly6C auf Makrophagen und Granulozyten
CD3	T-Zellen
CD8a	Zytotoxische T-Zellen

Tab. 2.2: Antigene für die Identifikation bestimmter ILC-Subtypen.

Molekül	Vorkommen
CD45	Alle Leukozyten
NKp46	NK-Zellen, NKp46 ⁺ -ILC3, ILC1
CD4	T-Helferzellen, einige LTI
NK 1.1.	NK-Zellen, NKp46 ⁺ -ILC3, ILC1
Tbet	ILC1, NK-Zellen
ROR γ t	ILC3
CD90.2	ILC1, ILC2, ILC3
Eomes	NK-Zellen
GATA3	ILC2
EpCam (CD326)	Epithelzellen
CD127	ILC1, ILC2, ILC3
CCR6	einige ILC3, unter anderem LTI

Nach der Präparation der Lamina-propria Leukozyten bzw. der Splenozyten und der Zellzählung wurden die Zellen in kaltem FACS-Puffer resuspendiert. Der darin enthaltene, unmarkierte anti-CD16/32 Antikörper diente der Blockierung von Fc γ -Rezeptoren II und III-Molekülen auf der Zelloberfläche und damit der Verhinderung einer unspezifischen Antikörperbindung an die Zellen. Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Zellen auf Spitzboden-Multiwellplatten aufgeteilt und bei 4°C und 1600 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets mit den entsprechenden Antikörper-haltigen Lösungen resuspendiert. Als Kontrolle zur optimalen Einstellung der nachfolgenden durchflusszytometrischen Messungen wurden zusätzlich Zellen mit jeweils nur einem der

spezifischen Antikörper (Einzelfärbungen) bzw. mit einem Antikörper-Mix, der jeweils einen der Fluorochrom-markierten Antikörper nicht enthielt (FMOs = fluorescence minus one), versetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 30 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss. Um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit 150 µl PBS mit 2 mM EDTA versetzt, bei 4°C mit 1600 x g für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS-EDTA resuspendiert.

Für die intranukleäre Detektion der Transkriptionsfaktoren (Tbet, GATA3, ROR γ t) erfolgte die Resuspension in Foxp3-Fixations/Permeabilisationspuffer (kommerziell erhältliches, optimiertes Pufferset, siehe 2.1.1). Die Inkubation erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss über Nacht. Nachfolgend wurde nach Zugabe von 100 µl Foxp3-Waschpuffer bei 4°C und 1600 x g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit Fluorochrom-markierten, spezifischen Antikörpern gegen Transkriptionsfaktoren, verdünnt in Foxp3-Waschpuffer, resuspendiert und 60 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 4°C und 1600 x g für zwei Minuten erfolgte ein zweiter Waschschrift mit PBS-EDTA und schließlich die finale Resuspension in 100 µl PBS-EDTA.

Zur Identifikation anderer Leukozytensubpopulationen neben den ILCs wurden Färbungen in gleicher Weise mit anderen Antikörpern angesetzt (s. Tab. 2.3 und Tab. 2.4)

Tab. 2.3: Zusammensetzung der T-Zellfärbung

Oberflächenmolekül	Vorkommen
CD45.2	Alle Leukozyten
CD3	T-Zellen
CD4	T-Helferzellen
CD8	Zytotoxische T-Zellen
CD44	Aktivierte T-Helferzellen
CD62L	Naive T-Zellen und Zentrale Memory-T-Zellen
CD127	T-Helferzellen

Tab. 2.4: Zusammensetzung der allgemeinen Leukozytenfärbung

Oberflächenmolekül	Vorkommen
CD45.2	Alle Leukozyten
CD3	T-Zellen
CD19	B-Zellen
CD11b	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, einige dendritische Zellen
CD11c	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen
Gr-1	Gegen Ly6G und Ly6C auf Makrophagen und Granulozyten
B220	B-Zellen

2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse der ILCs

Die durchflusszytometrischen Analysen der LPL- bzw. Splenozytensubpopulationen erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers LSR Fortessa, das mit drei Lasern ausgestattet ist und die simultane Detektion von bis zu acht Fluorochromen ermöglicht. Durch die Erfassung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ist eine Unterscheidung nach Zellgröße und -granularität möglich. Da insbesondere die LPL-Populationen eine große Heterogenität bezüglich dieser Parameter aufwies, wurden die Gesamtpopulationen zunächst anhand von FSC (= Forward scatter) und SSC (= Side scatter) grob auf die Leukozyten eingegrenzt. Anschließend wurden durch den Marker CD45 die Leukozyten erfasst und innerhalb der CD45⁺-Population die ILCs durch die fehlende Expression der Lineage-Marker (Lin⁻) eingegrenzt. Innerhalb der CD45⁺Lin⁻-Population wurden die ILCs anhand weiterer, ILC-Subtyp-spezifischer Zellmarker untergliedert (siehe Ergebnisteil). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FloJo 9.7.5.

2.2.8. FACS-Analysen der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten

Nach Induktion einer akuten DSS-Colitis in NK^{Δc-Flip}- und NK^{WT}-Mäusen und der oben beschriebenen Isolation der LPL aus dem entzündetem Colongewebe wurde in gemeinsamen Experimenten mit Kollegen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Ildiko R. Dunay (ehm. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, jetzt Institut für Inflammation und Neurodegeneration, Universitätsklinikum Magdeburg) - insbesondere in Kooperation mit Frau Dr. Aindrila Biswas – eine durchflusszytometrische Analyse der Frequenz und Subpopulationszusammensetzung myeloischer Zelltypen durchgeführt. Nach einer Vorselektion auf CD45⁺/CD11b⁺-myeloische Zellen wurden zur Unterscheidung von

neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen die Marker Ly6C und Ly6G genutzt. Dabei gelten Ly6C⁺/Ly6G⁻- sowie Ly6C⁻/Ly6G⁻-Zellen als Monozyten und Ly6C⁺/Ly6G⁺-Zellen als neutrophile Granulozyten.

2.2.9. Das Modell der DSS-Colitis

Dextran-Natriumsulfat (dextrane sulfate sodium = DSS) ist ein sulfatiertes Polysaccharid (s. Abb. 2.3) und wird zur chemischen, nicht-infektiösen Induktion von Colitiden bei Mäusen verwendet^{151,152}. Die Molekularmasse des verwendeten DSS variiert und beeinflusst auch die Schwere und die Lokalisation der induzierten Colitis. In den beschriebenen Experimenten wurde DSS mit einer Molekularmasse von 36.000 bis 50.000 Da verwendet, da dieses für die Colitisinduktion besonders geeignet ist. Hohe Molekularmassen bewirken keine effektive Colitisinduktion, während zu niedrige Molekularmassen nur eine leichte Colitis auslösen¹⁵³. Die Erkrankungsstärke kann durch die eingesetzte DSS-Konzentration gesteuert werden. Die optimale DSS-Konzentration muss für jede Mauslinie unter den jeweiligen Haltungsbedingungen ermittelt werden.

Auf Grund seiner starken Hydrophilie kann DSS über das Trinkwasser verabreicht werden. Das DSS wurde in abgekochtem und danach wieder auf Raumtemperatur abgekühltem Trinkwasser gelöst und alle zwei Tage gewechselt.

Die Substanz wirkt direkt epithelzelltoxisch. Infolge der Epithelzellschäden und dem resultierenden Barrierebruch wird eine Inflammation mit massiver Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere neutrophilen Granulozyten, ausgelöst¹⁴⁸. Die Induktion der Darminflammation ist dabei nicht T- und B-Zell-abhängig; sodass dieses Modell auch für Studien unter Verwendung T- und B-Zell-defizienter Tiere eingesetzt werden kann¹⁵⁴.

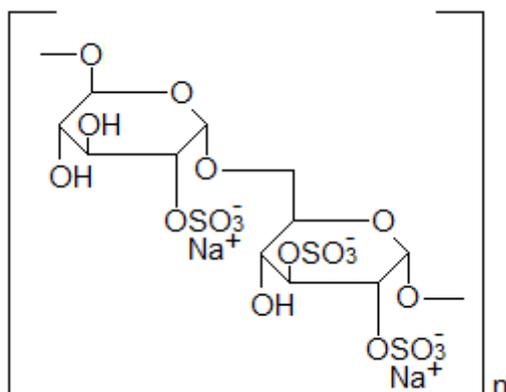


Abb. 2.3: Strukturformel des DSS.

Es handelt sich um ein mehrfach sulfatiertes Polysaccharid aus einer variablen Anzahl des gezeigten Disaccharid-Bausteins (n). Die Molekularmasse des in den Experimenten benutzten DSS betrug 36.000 bis 50.000 Da.

In erster Linie ist dabei das Colon von der Inflammation betroffen. Symptomatisch zeigen sich vorrangig schleimige bis flüssige Diarrhoen sowie Frischblutbeimengungen. Lokalisation und Symptomatik ähneln dem klinischen Erscheinungsbild einer Colitis ulcerosa. Eine regelmäßige Beurteilung der Kotkonsistenz, des relativen Gewichts sowie rektaler Blutabgänge ist daher im Rahmen des später näher beschriebenen Scorings notwendig.

Durch eine wechselnde Gabe von DSS-haltigem Wasser und DSS-freiem Trinkwasser kann eine chronische Colitis mit Schüben, vergleichbar zu der klinischen Manifestation chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Menschen, erzeugt werden. Dabei kommt es nach Beenden der DSS-Applikation zur Regeneration des Epithels und einer deutlichen Besserung der Symptomatik, wobei nicht immer der Ausgangspunkt vor der DSS-Applikation erreicht wird. Infolge des Barrierebruchs und einer zunehmenden Immunzellaktivierung durch Kontakt mit der intestinalen Mikroflora verstärkt sich erfahrungsgemäß die maximale Intensität der Colitis mit jedem DSS-Zyklus. Insgesamt stellt die DSS-induzierte Colitis ein adäquates Mausmodell zur Untersuchung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, vorrangig der Colitis ulcerosa, dar^{148,152}. Erfahrungen mit dem Modell zeigen, dass männliche Mäuse insgesamt einen höheren Schweregrad der Colitis erreichen als weibliche Mäuse. Als Ursache werden einerseits eine höhere Aufnahme des DSS-haltigen Trinkwassers durch männliche Tiere, andererseits hormonelle Einflüsse diskutiert^{155,156}. Weiterhin spielt das Mikrobiom für die Intensität der Colitis eine Rolle. Grundsätzlich werden daher alle Colitis-Experimente mit Geschwistertieren und getrennt nach Geschlechtern durchgeführt¹⁴⁸. Darüber hinaus mussten die Mäuse ein Mindestalter von sechs Wochen und ein Mindestgewicht von 18-20 Gramm aufweisen.

Zur Induktion einer akuten Colitis mittlerer Erkrankungsstärke in der oben beschriebenen konditionalen Mauslinie wurde eine 2,5%-ige DSS-Lösung hergestellt. Diese wurde den Mäusen für fünf Tage *ad libitum* über die Trinkflasche verabreicht. Anschließend erhielten die Mäuse Trinkwasser ohne DSS-Zusatz und an Tag 7 des Experiments erfolgte die Präparation der Mäuse. Während des Experiments erfolgte ein regelmäßiges Scoring der Colitis.

Zur Induktion einer chronischen Colitis wurde mit abgekochtem Wasser eine 1,6-1,8%-ige DSS-Lösung hergestellt. Diese wurde den Mäusen für fünf Tage verabreicht. Anschließend erhielten die Mäuse für einen Zeitraum von 14 Tagen Trinkwasser ohne DSS-Zusatz. Es folgte für weitere fünf Tage die Gabe der DSS-Lösung sowie eine erneute 14-tägige Gabe von Trinkwasser ohne DSS. Während im ersten Zyklus, wie auch bei der akuten Colitis, eher Zellen der angeborenen Immunabwehr und der myeloischen Entwicklungsreihe wie neutrophile Granulozyten als Auslöser für die Inflammation gelten¹⁵⁷, spielen ab dem zweiten Zyklus zunehmend auch Zellen der adaptiven Immunabwehr aus der lymphatischen Entwicklungsreihe wie T-Zellen eine Rolle¹⁵⁸. Unmittelbar nach dem dritten Zyklus von fünf

Tagen, auf dem Höhepunkt der Entzündungsreaktion, erfolgte die erste Präparation von Versuchstieren. Nach weiteren sieben Tagen mit DSS-freiem Trinkwasser wurden weitere Versuchstiere präpariert, um Daten zur Regenerationsphase zu gewinnen. Im Verlauf des chronischen Colitisexperiments erfolgte ebenfalls ein regelmäßiges Scoring der Colitis.

Zur Erfassung der Scoringparameter Gewicht, Kotkonsistenz und Blut im Kot wurden die Mäuse zunächst einzeln aus den Käfigen in etwa 20 cm hohe, blickdichte Kunststoffbecher auf eine Waage gesetzt. Die Versuchstiere blieben bis zur Abgabe einer Kotprobe in den Kunststoffbechern, die mit Zellstofftüchern ausgestattet waren. Die Kotproben wurden bezüglich Konsistenz und dem Vorhandensein makroskopisch sichtbarer Blutbeimengungen beurteilt (s. Tab. 2.5). Kotproben ohne makroskopisch sichtbare Blutbeimengungen wurden zur Analyse von okkulten Blutspuren mit Hilfe der beiliegenden Pappspatel auf die guajakbeschichteten Testfelder der Hämoccult-Testbriefchen (s. 2.1.3.) ausgestrichen. Am darauffolgenden Tag wurden etwa zwei Tropfen der zum Testkit gehörenden, kühl aufzubewahrenden, H₂O₂-haltigen Nachweislösung auf die Rückseite der Testfelder gegeben. Ist okkultes Blut im Stuhl vorhanden, dient das Hämoglobin als Katalysator um nach Zugabe von H₂O₂ die im Guajak enthaltene phenolische Guajakonsäure zu einem chinoiden, blauen Farbstoff, der als Guajakblau bezeichnet wird, zu oxidieren. Von der Zugabe der Nachweislösung bis zur Beurteilung mussten mindestens 60 Sekunden abgewartet werden.

Tab. 2.5: Scoreparameter der Colitisexperimente.

Parameter	Ausprägung	Punktwert
Kotkonsistenz	Fest, geformt	0
	Erweicht, geformt	1
	Pastös, geformt	2
	Pastös, ungeformt	3
	Flüssig	4
Blut im Kot	Kein Blut	0
	Schwach positiver Hämoccult-Test	1
	Stark positiver Hämoccult-Test	2
	Makroskopisch sichtbares Blut	3
	Überwiegend Blut	4
Relatives Gewicht	100-95%	0
	<95-90%	1
	<90-85%	2
	<85-80%	3
	<80%	4

An Tag 0, also vor Verabreichung von DSS-haltigem Trinkwasser, wurde das Ausgangsgewicht gemessen und als 100% gesetzt. Vom Ausgangsgewicht ausgehend wurde täglich ein relatives Gewicht berechnet.

Im Zusammenhang mit dem Scoring wurden auch weitere Auffälligkeiten erfasst. Diese dienten vorrangig als Kriterien für einen tierschutzrechtlich gebotenen Abbruch des Experiments bei möglicherweise auftretenden erheblichen Leiden. Hierzu gehörten ein mehr als 20%iger Gewichtsverlust über mehrere Tage, eine ausgeprägte Apathie der Mäuse, Krampfanfälle oder eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustands. In diesen Fällen wurde das betroffene Tier aus dem Experiment genommen und wie oben beschrieben euthanasiert.

2.2.10. Histologie des Colongewebes

Nach Induktion einer DSS-Colitis und der oben beschriebenen Präparation des Colons (s. Abb. 2.2) wurde je ein Drittel der drei Colonabschnitte in 4% Formalin fixiert. Nach einer Woche wurde die Formalinlösung entfernt und gegen PBS getauscht, um eine Überfixation zu vermeiden. Die Lagerung des fixierten Gewebes erfolgte bei 4°C.

Durch die Kooperationspartnerin PD Dr. rer. nat. Anja Kühl (Institut für Pathologie, Charité Berlin) erfolgte die weitere Aufarbeitung des Gewebes inklusive Einbettung, Schneiden und Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung sowie die anschließende histologische Beurteilung mit Scoring.

Zum histologischen Scoring wurde sich eines etablierten zweiteiligen Punktesystems für Colitiden bedient, die durch exogene Chemikalien ausgelöst werden. Jeder der zwei Teile umfasst separat drei und somit insgesamt sechs Punkte. Berücksichtigt wurden der Grad und die Lokalisation der Infiltration von Immunzellen in das Colongewebe (Score 1) sowie Grad und Ausweitung entzündungsbedingter Veränderungen der Gewebearchitektur (Score 2). Erosionen sind dabei Epithelschäden, die entweder fokal oder ausgebreitet vorliegen können; Ulcerationen reichen mindestens in die Submukosa. Weiterhin kann eine Inflammation zur Ausbildung von Pseudopolypen oder Granulationsgewebe führen (s. Tab. 2.6)¹⁵⁹.

Tab. 2.6: Punkteverteilung in den Histologien der Dickdärme.

Punkte	Score 1: Zellinfiltrat		Score 2: Architektur	
	Schwere	Ausbreitung	Epithel	Mukosaarchitektur
1	Mild	Mukosa	Nur fokale Erosionen	---
2	Moderat	Submukosa	Erosionen	Fokale Ulcerationen
3	Deutlich	Transmural	---	Granulationsgewebe, Pseudopolypen oder sehr große Ulcerationen
Gesamtscore: 0-6				

2.2.11. Zytokin-/Chemokinmessungen

Nach der Präparation von Colongewebe wurden diese wie in Abb. 2.2 gezeigt abschnittsweise geteilt. Jeweils ein Drittel aus den drei Colonabschnitten (ca. 1 cm Länge) wurde longitudinal eröffnet, gesäubert und das Gewebegewicht auf einer Feinwaage bestimmt. Anschließend erfolgte die Inkubation in 500 µl RPMI 1640 mit 2% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden. Die Überstände wurden entnommen und bei 10000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um Partikel wie Gewebefragmente und Bakterien zu entfernen und einen klaren Zellkulturüberstand mit den sezernierten Zytokinen zu erhalten. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Überstände bei -80°C asserviert.

Die Bestimmung der Zytokin-/ChemokinKonzentration erfolgte mit dem Multiplex-Kit „Legendplex Mouse Inflammation panel“ von BioLegend und zusätzlich dazu mit einem ELISA (=Enzyme linked immunosorbant assay) für IL-22.

Bei dem „Legendplex Mouse Inflammation panel“-Kit handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Bead-basierten Assay von der Firma Biolegend, der die simultane Quantifizierung von zwölf entzündungsrelevanten Zytokinen (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-23, IL-27, IFN- β , IL-17A, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF) sowie des Chemokins MCP-1 ermöglicht. Die entsprechenden Proben werden mit einer Mixtur von unterschiedlich großen, Fluorochromgekoppelten und mit Maus-spezifischen anti-Zytokinantikörpern beschichteten Beads inkubiert. Die gebundenen Zytokine wurden nachfolgend mit anderen Zytokin-spezifischen, biotinylierten Antikörpern sowie Streptavidin-PE nachgewiesen. Die Höhe des am Durchflusszytometer gemessenen PE-Signals korrespondiert mit der Konzentration des jeweiligen Zytokins bzw. des Chemokins. Die Kalkulation der Zytokin-/ChemokinKonzentrationen erfolgte anhand bereitgestellter Standards.

Die Zytokin-/Chmokinbestimmung mit diesem Kit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, und mit Hilfe der Legendplex-Software ausgewertet.

Zur Bestimmung von IL-22-Konzentrationen in biologischen Proben aus den Mausexperimenten wurde ein kommerzieller Sandwich-ELISA von der Firma e-Biosciences verwendet. Hier wurde in biologischen Proben vorhandenes IL-22 durch einen Festphasengebundenen (an den Boden einer Mikrottestplatte gebunden) Maus-IL-22-spezifischen Fänger-Antikörper gebunden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines zweiten IL-22-spezifischen Antikörpers, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase (horse redish peroxidase HRP) gekoppelt ist. Durch Zugabe des HRP-Substrates Tetramethyl-Benzidin und Abstoppen der Reaktion durch 1M H₂SO₄ erfolgte die kolorimetrische Quantifikation bei 450nm (570nm Referenzwellenlänge). Die Intensität des gemessenen Signals war direkt proportional zur Konzentration des IL-22 in den Proben und den zur Auswertung mitgeführten IL-22-Standards.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolation von DNA aus dem Mäuseschwanzgewebe

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden nach Tötung des jeweiligen Versuchstieres die Schwanzspitze abgetrennt und in 600 µl Biopsie-Lyse-Puffer mit 20 mg/ml Proteinase K für mindestens 4 Stunden bei 56 °C und 350 rpm im Thermomixer lysiert. Das resultierende Lysat wurde bei 13800 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe von 600 µl -20 °C kaltem Isopropanol zehn Minuten lang ausgefällt. Anschließend wurde erneut bei 13800 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstands wurde das DNA-haltige Pellet in 600 µl -20 °C kaltem 100%-igem Ethanol resuspendiert und erneut bei 13800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das DNA-haltige Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Abhängig von der Größe des Pellets wurde die isolierte DNA in 50-300 µl TE-Puffer bei 68 °C unter horizontalem Schütteln mit 350 rpm eine Stunde lang gelöst.

2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR werden begrenzte Abschnitte der DNA vervielfältigt, um diese anschließend analysieren zu können. Es werden spezifische DNA-Primer eingesetzt, die einen ausgewählten Abschnitt auf der DNA begrenzen. Die Synthese der DNA-Kopien wird durch die hitzebeständige Taq-Polymerase (Taq-PM, Taq aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) katalysiert.

Die PCR läuft in drei Phasen ab, die sich zyklisch wiederholen und so zu einer exponentiellen Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes führen. Die für diesen Prozess notwendigen zyklischen Temperaturänderungen werden mit Hilfe eines Thermocyclers realisiert.

Zunächst wurde die DNA bei über 90°C denaturiert. Anschließend lagerten sich die Primer bei Abkühlung auf 50-70°C an die DNA an (Annealing). Bei 65-75°C erfolgte die Synthese der DNA-Kopien. Dieser Zyklus wurde etwa 30-40-mal wiederholt. Die gewählten Temperaturen sind für den jeweiligen zu amplifizierenden DNA-Abschnitt optimiert. In der vorliegenden Dissertation wurde die PCR zur Genotypisierung der transgenen Mäuse genutzt. Die Mengen der eingesetzten Reagenzien und die gewählten Einstellungen sind in den Tab. 2.7 und 2.8 zusammengefasst.

Tab. 2.7: Reagenzien für die c-Flip-fl-, die NKp46Cre Knock-in- und die NKp46wt-Genotypisierungs PCR

c-Flip-fl		NKp46Cre KI		NKp46wt	
Reagenz	Volumen (µl)	Reagenz	Volumen (µl)	Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	16,2	H ₂ O	12,9	H ₂ O	12,9
10x-Puffer	2	10x-Puffer	5	10x-Puffer	5
MgCl ₂ (1,5 mM)	1	MgCl ₂ (25 mM)	2	MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (2,5 mM)	1,6	dNTPs (2,5 mM)	2	dNTPs (2,5 mM)	2
Primer Flip-fl F (10 µM)	1	NKp46ex7-Forward (10 µM)	1	NKp46ex7-Forward (10 µM)	1
Primer Flip-fl Rev1 (10 µM)	1	NKp46-IRES-Reverse (10 µM)	1	-	-
Rediload	1	-	-	NKp46ex7-Reverse (10 µM)	1
Platinum Taq	0,1	Platinum Taq	0,1	Platinum Taq	0,1
DNA	1	DNA	1	DNA	1

Tab. 2.8: Ablauf der Genotypisierungs-PCRs

Schritt	c-Flip-fl			NKp46Cre KI und wt		
	T (°C)	t (s)	Zyklen	T (°C)	t (s)	Zyklen
PM-Aktivierung	94	60	1	95	120	1
DNA-Denaturierung	94	30	40	95	30	34
Annealing	68	30	40	56,2	30	34
Elongation	72	60	40	72	40	34
Letzte Elongation	72	300	1	72	300	1
Stopp der PCR	10	-	-	10	-	-

2.3.3. Agarosegelelektrophorese zur Erfassung der Größe der PCR-Produkte

Zur Auftrennung und Identifikation amplifizierter DNA-Abschnitte wird die Agarose-Gelelektrophorese als Standardverfahren eingesetzt. Unter elektrischer Spannung wandern negativ geladene DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode durch die Poren des Agarosegels hindurch. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Größe des jeweiligen DNA-Fragmentes.

1,5 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer bis zur vollständigen Auflösung erhitzt, in eine Form gegossen und ein Kamm für die Herstellung von Probetaschen eingesteckt. Das abgekühlte und ausgehärtete Gel wurde in eine Gelkammer mit 1x TAE überführt, an die elektrische Spannung angelegt werden kann. In die Probetaschen wurden die amplifizierten DNA-Proben gegeben. Anschließend wurde eine Spannung von 140 V angelegt und die Proben für 40 Minuten aufgetrennt. Um die Größe der Fragmente beurteilen zu können, wurde ein Größenstandard (DNA Ladder „Easy Ladder“) mitgeführt. Die Gele wurden anschließend für 20 Minuten in einem Ethidiumbromid-haltigen Färbebad (1 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer) eingelegt und nachfolgend die entstandenen DNA-Banden durch Anlagerung des Ethidiumbromids an die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht (s. Abb. 2.4).

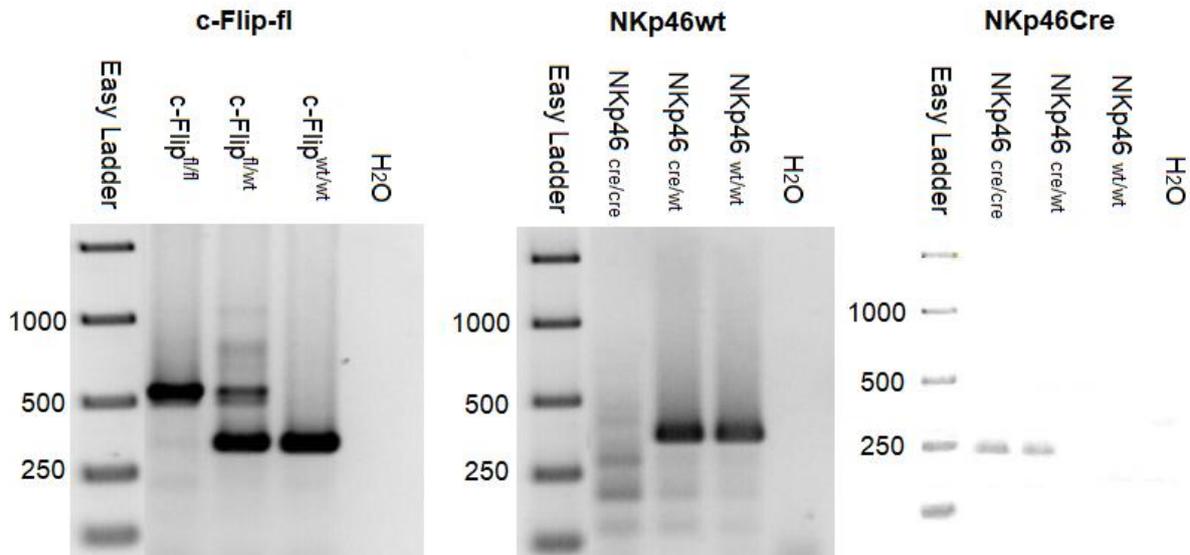


Abb. 2.4: Agarosegelelektrophorese zur Genotypisierung von c-Flip-fl- und NKp46Cre-Mäusen. Der mit loxp-Seiten flankierte *CFLAR*-Genabschnitt in der benutzten PCR ist länger (520 bp) als der Wildtyp-Genabschnitt (335 bp). In der NKp46Cre-PCR sind die amplifizierten Genabschnitte der NKp46^{cre}-Allele kürzer (247 bp) als die NKp46^{wt}-Allele (300 bp).

2.3.4. mRNA-Isolation, Umschreibung zur cDNA und qPCR auf Reg3 γ aus Epithelzellen

Die abgeschüttelten Epithelzellen der Dick- und Dünndärme (s. 2.2.3) wurden als Zellpellet bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen in 1 ml TRIzol-Reagenz suspendiert. Nach 5 min Inkubation wurde 0,2 ml Chloroform hinzugefügt und die Proben 15 s lang per Hand geschüttelt. Nach weiteren 2 bis 3 min Inkubation wurde für 15 Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Dabei entstanden drei Phasen, wobei sich die mRNA in der oberen, wässrigen Phase befand. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation wurden 0,5 ml 100%-iges Isopropanol hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation bei 12000 x g bei 4°C für 10 Minuten. Im Pellet befand sich die mRNA. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Mischen via Vortex wurde bei 7500 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das nun gewaschene mRNA-Pellet luftgetrocknet. Die Resuspension erfolgte in 100 μ l PCR-Wasser. Die Reinheit sowie die Konzentration der isolierten mRNA wurde mit Hilfe des NanoDrop durch Messung der Extinktion bei 260 und 280nm Wellenlänge bestimmt. Die weitere Verdünnung erfolgte mittels DEPC (Diethylprocarbonat)-Wasser. Jeweils 1 μ g mRNA wurde für die Umschreibung in cDNA weiterverwendet.

Die Umschreibung in cDNA wurde mit Hilfe des „Advantage RT-for-PCR“-Kits durchgeführt. Nach Auftauen des Kits wurden 1 μ g der mRNA in ein auf Eis positioniertes 50 μ l Reaktionsgefäß überführt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 12,5 μ l ergänzt.

Anschließend wurden 1 µl des Random Hexamer-Primers aus dem Kit hinzugefügt. Pro Probe wurde weiterhin hinzugefügt: 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 0,5 µl Rekombinanter RNase Inhibitor und 1 µl MMVL (Moloney Murines Leukämie Virus) Reverse Transkriptase. Die Bestandteile wurden gemischt und für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion bei 94°C für 5 Minuten gestoppt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Für die qPCR wurden 1 µl der cDNA-Proben benutzt. Ein Ansatz für das HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)-Gen als Referenzgen sowie ein Ansatz für das Reg3γ wurden gemacht (s. Tab. 2.9).

Tab 2.9: Ansatz für die qPCR auf Reg3γ sowie HPRT als Referenzen.

Reg3γ		HPRT	
Bestandteil	Volumen (µl)	Bestandteil	Volumen (µl)
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	10	TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	10
DNase- und RNase freies Wasser	8	DNase- und RNase freies Wasser	8
Reg3γ-Primer	1	HPRT-Primer	1

Die Ansätze wurden für die qPCR in den Thermocycler gestellt (Prinzip der PCR s. 2.3.2). Für die Bedingungen s. Tab. 2.10.

Tab. 2.10. Einstellungen für die qPCR.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Anzahl Zyklen
UNG-Inkubation	50	120	1
PM-Aktivierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	45
Annealing/Elongation	60	60	45

UNG = Uracil-DNA-Glykosidase

Die Expression des Reg3γ wurde mit der des Referenzgens HPRT verglichen. Anhand des enthaltenen fluoreszierenden Bestandteils des TagMan Universal PCR MasterMix ROX wurde ein ct-Wert (cycle threshold) ermittelt und davon ausgehend die Auswertung vorgenommen.

Dazu wurde der ct-Wert des HPRT von dem ct-Wert des Reg3γ subtrahiert und aus der Differenz eine normierte Kopienzahl nach folgender Formel bestimmt (3.6):

$$\text{Normierte Kopienzahlen} = 2^{-(ct_{\text{Reg3}\gamma} - ct_{\text{HPRT}})}$$

2.4 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 und 6 durchgeführt. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz genutzt wurden der zweiseitige t-Test für unabhängige Variablen oder der zweiseitige Mann-Whitney U Test (s. jeweilige Abbildungen). Die in den Grafiken verwendeten Markierungen für die statistischen Signifikanzen sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. NKp46⁺ ILC-Subtypen im Darmgewebe von NK^{Δc-Flip}-Mäusen

Wie in der Einleitung (siehe 1.6.) beschrieben, wurde in Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe bereits eine starke Reduktion von NKp46⁺ ILC-Subpopulationen in Milz, Leber, dem peripheren Blut sowie im Knochenmark von NK^{Δc-Flip} Mäusen nachgewiesen. Da ILCs zu einem relevanten Teil gewebständig und insbesondere im mukosalen Immunsystem des Gastrointestinaltrakts lokalisiert sind, war eines der Ziele der vorliegenden Dissertation, die Auswirkung der konditionalen Inaktivierung der c-Flip-Expression auf die Zusammensetzung der ILC-Subtypen im Darm zu analysieren. Um die Frequenzen und absoluten Zellzahlen der ILC-Subpopulationen im Darmgewebe im Vergleich zu genetisch intakten Kontrolltieren zu analysieren, wurden Milz, Dünndarm und das Colon von NK^{Δc-Flip}- sowie NK^{WT}-Mäusen wie oben beschrieben präpariert. Aus diesen Geweben wurden Leukozyten isoliert und die einzelnen ILC-Subtypen mit Hilfe von verschiedenen, Fluorochrom-markierten Antikörpern durchflusszytometrisch identifiziert (Abb. 3.1).

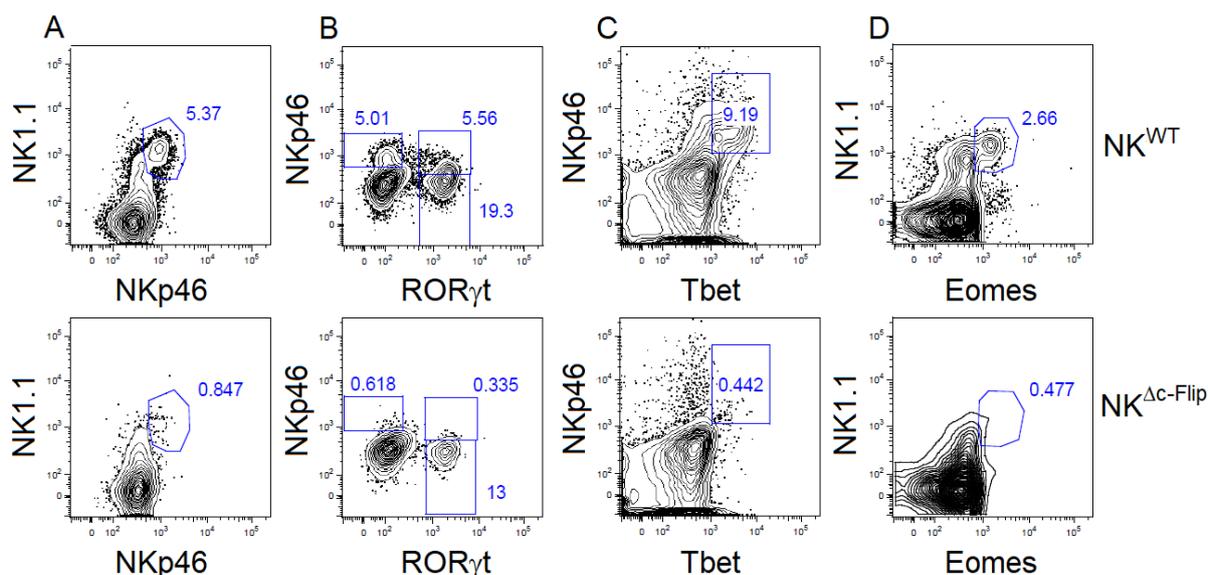


Abb. 3.1: Durchflusszytometrische Analysen verschiedener ILC-Populationen in LPL aus Dünndarmgewebe.

Lamina propria-Leukozyten wurden aus Dünndarmgewebe isoliert und die relativen Anteile bestimmter Zellpopulationen mit Hilfe Fluorochrom-markierter Antikörper durchflusszytometrisch quantifiziert. Gezeigt sind repräsentative Kontur-Diagramme verschiedener ILC-Subpopulationen von NK^{WT}-Mäusen (obere Reihe) und NK^{Δc-Flip}-Mäusen (untere Reihe). Zur Identifikation der einzelnen ILC-Subtypen wurde zunächst eine Vorauswahl auf CD45⁺ Lin⁻ Lymphozyten getroffen und diese Populationen anhand weiterer Subtyp-spezifischer Marker analysiert. Die Zahlen in den Kontur-Diagrammen stellen jeweils den relativen Anteil der ausgewählten Population in der Fraktion der CD45⁺ Lin⁻-Zellen beispielhaft dar. (A) Auftragung von NK1.1 gegen NKp46: doppelt positive Zellen entsprechen den NK-Zellen und den ILC1 (B) Auftragung von NKp46 gegen ROR γ t: Hier entsprechen die doppelt positiven Zellen den NKp46⁺-ILC3. Die NKp46⁻ aber ROR γ t⁺ Zellen entsprechen den NCR⁻-ILC3. (C) Auftragung von NKp46 gegen Tbet: Diese Zellen entsprechen im Wesentlichen den ILC1. (D) Auftragung von NK1.1 gegen Eomes: Diese Zellen entsprechen den NK-Zellen.

Analysiert wurden die ILC1 (NKp46/Ncr1⁺NK1.1⁺ bzw. NKp46/Ncr1⁺Tbet⁺), die ROR γ ⁺ ILC3 (NKp46/Ncr1⁺ als NKp46⁺-ILC3, NKp46⁻ als NCR⁻ ILC3) sowie die konventionellen NK-Zellen (cNKs, NK1.1⁺ und Eomes⁺) (Abb. 3.1).

Darüber hinaus wurde auch das Vorkommen NKp46⁻-ILC-Subpopulationen untersucht (s. Abb. 3.2). NKp46⁻ ILC2s sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 definiert. NCR⁻-ILC3 werden in eine CD4⁺- (darunter die LTi) und eine CD4⁻-Subpopulation unterteilt.

Anhand der relativen Zellzahlen und der Gesamtzellzahl aus den jeweiligen Organen wurden die absoluten Zellzahlen für die verschiedenen ILC-Subtypen ermittelt (Abb. 3.2). Dabei zeigte sich eine deutliche Verminderung der Absolutzahlen aller NKp46⁺-ILC-Subtypen im Darmgewebe von NK ^{Δ cFlip}- im Vergleich zu NK^{WT}-Mäusen (Abb. 3.2) bei weitgehend fehlender Veränderung der NKp46⁻ ILC-Subtypen.

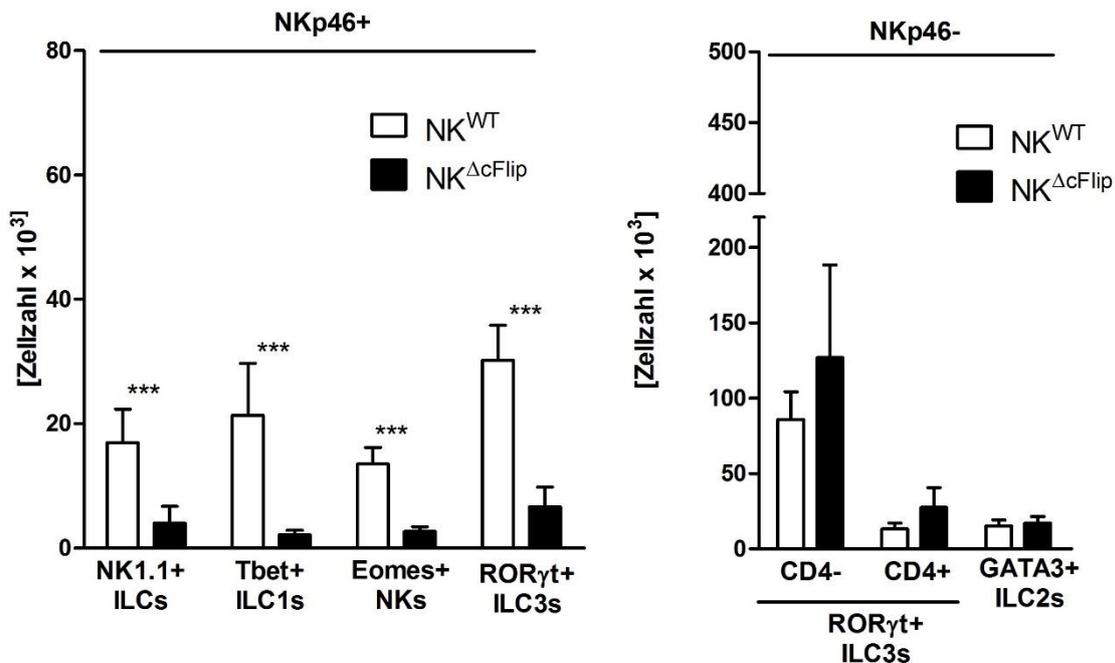


Abb. 3.2: Absolute Zahlen der NKp46⁺-ILCs und NKp46⁻-ILCs in NK ^{Δ cFlip}- und NK^{WT}-Mäusen. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen bestimmter ILC-Subtypen isoliert aus der Lamina propria der Dünndärme von NK^{WT}- und NK ^{Δ cFlip}-Mäusen. Bei den NCR⁻-ROR γ ⁺ ILC3 wurde zwischen CD4⁺- (darunter die LTi) und CD4⁻-Zellen differenziert. Ebenfalls NCR⁻ ILC2s sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 gekennzeichnet. In die Auswertung wurden Datensätze aus 3-5 Experimenten einbezogen. Es wurden nur Daten verwendet, bei denen auf Grund einer ausreichenden Zellzahl in den angegebenen Subpopulationen eine gesicherte Analyse möglich war. Pro Genotyp gingen in die Analysen folgende Anzahl an Mäusen ein: Für die NKp46⁺ ILCs: 10-11, ILC1s: 7, NKs: 7-8 und ILC3s: 10-11; für die NKp46⁻: CD4⁻ ILC3s: 8-9, CD4⁺ ILC3s 8-9; ILC2s: 7. ***p \leq 0,001, (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test)

Auch in der Milz und im Colon von $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen waren die relativen und absoluten Zahlen $NKp46^+$ ILCs reduziert, während dies für NCR^- -ILC3, $CD4^+$ LTi und ILC2 nicht galt (s. Abb. 3.3 und 3.4).

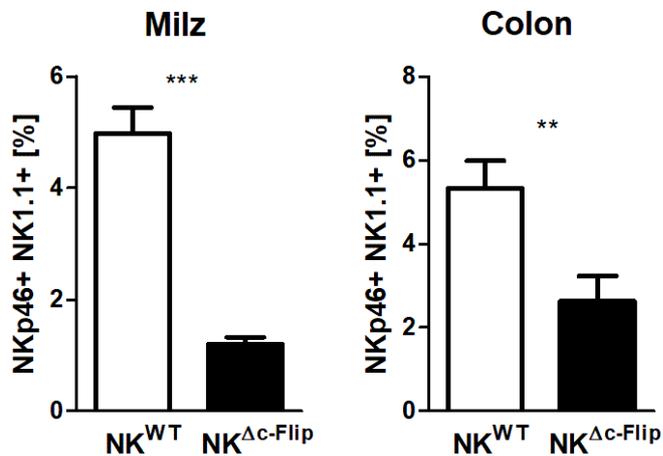


Abb. 3.3: $NKp46^+$ -ILCs in der Milz und im Colon von $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen. Innerhalb der $CD45^+$ und Lin^- ILC-Gesamtpopulation sind die relativen Zahlen der $NKp46^+$ -ILCs sowohl in der Milz als auch im Colon dargestellt. Dargestellt sind die Daten aus vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt 10-16 Versuchsmäusen pro Gruppe. Die Auswertung erfolgte mittels t-Test für unabhängige Variablen. $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$.

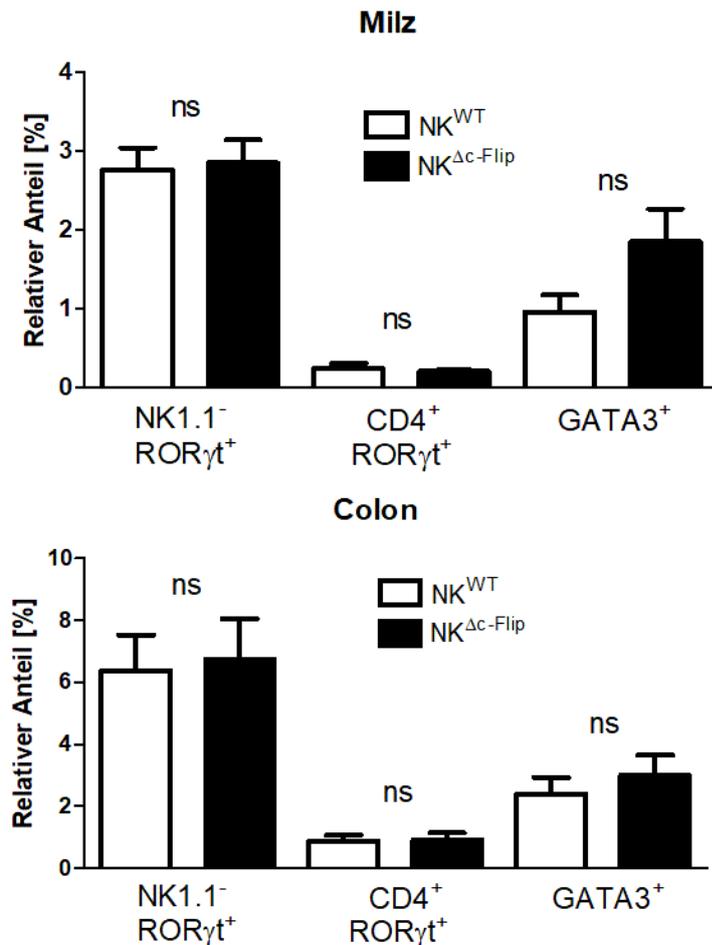


Abb. 3.4 Die relativen Anteile von NCR⁻ILC3, LTi und ILC2 in Colon und Milz von NK^{Δc-Flip}-Mäusen. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen von Lamina-propria Leukozyten aus dem Dickdarm sowie von Splenozyten als relativer Anteil der CD45⁺ und Lin⁻ negativen Leukozyten. Die NK1.1⁻ und RORγt⁺ Zellen entsprechen den NCR⁻ILC3, die CD4⁺ RORγt⁺ den LTi und die GATA3⁺ den ILC2. Zwischen den Genotypen zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Dargestellt sind die Daten aus vier unabhängigen Experimenten und 10-16 Mäusen pro Gruppe. Die Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Variablen. ns= nicht signifikant.

3.2. T- und B-Zellen sowie myeloide Zellen in NK^{Δc-Flip}-Mäusen

Neben den ILCs wurden auch die Kompositionen des T- und B-Lymphozytenpools sowie verschiedener Zelltypen aus der myeloiden Reihe im Darmgewebe per Durchflusszytometrie analysiert, um mögliche Veränderungen des NKp46-abhängigen Knockouts von c-Flip auch in diesen Populationen zu untersuchen. Ziel dieser Untersuchungen war es zum einen, die Selektivität des konditionalen Knockouts zu überprüfen. Zum anderen wurde analysiert, ob die Reduktion der NKp46⁺-ILCs Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mukosalen Immunzellen unter physiologischen Bedingungen hat.

Innerhalb der Gruppe der CD45⁺-Leukozyten wurden B-Lymphozyten mit Hilfe des Oberflächenmarkers B220 und T-Zellen anhand der Expression von CD3 identifiziert. Im Colon

waren die relativen Anteile sowohl der B- als auch der T-Zellen nicht signifikant verändert. Es bestand lediglich ein leichter Trend zu höheren Anteilen in $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen (s. Abb. 3.5).

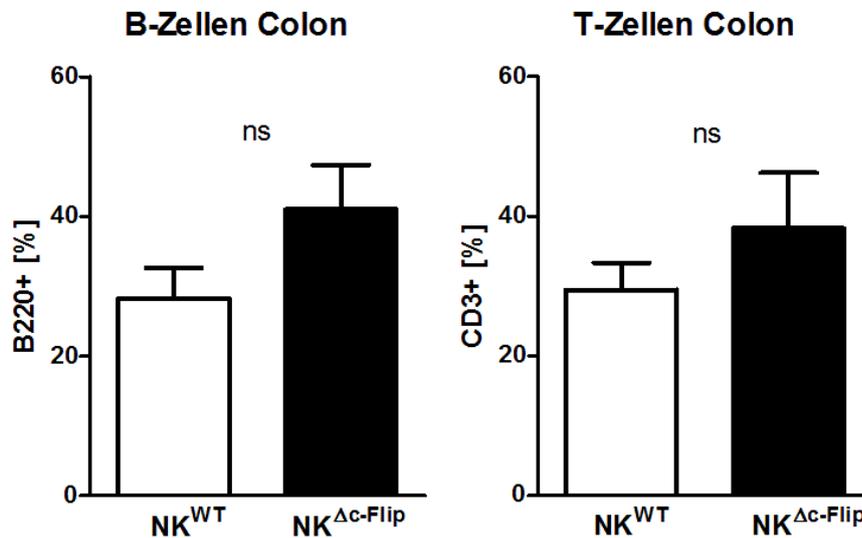
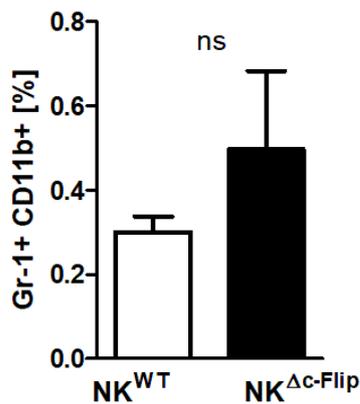


Abb. 3.5: Der relative Anteil von T – und B-Zellen im Colon bei $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Daten durchflusszytometrischer Analysen von Lamina-propria-Leukozyten aus präparierten Dickdärmen von gesunden NK^{WT} - und $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen. Es erfolgte zunächst eine Selektion auf $CD45^+$ Leukozyten. Innerhalb dieser Population wurden die relativen Anteile der $B220^+$ B-Lymphozyten sowie der $CD3^+$ T-Zellen bestimmt. Es wurden Daten aus vier unabhängigen Experimenten mit 6 bis 10 Tieren pro Gruppe zusammengefasst. ns = nicht signifikant (t-Test für unabhängige Variablen).

Um verschiedene Subtypen von Zellen aus der myeloiden Reihe zu erfassen, wurden Fluorochrom-markierte Antikörper gegen Gr-1, CD11b und CD11c verwendet und die Lamina-propria Leukozyten des Colons per Durchflusszytometrie analysiert. $Gr-1^+/CD11b^+$ -Leukozyten stellen Makrophagen und Granulozyten dar, wohingegen dendritische Zellen CD11c exprimieren und sich in eine $CD11b^+$ - und $CD11b^-$ -Gruppe unterteilen lassen. Wie in Abb. 3.6 gezeigt, sind auch die Leukozyten der myeloiden Reihe in den $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen verglichen zu den NK^{WT} -Mäusen nicht signifikant verändert. Somit hat die selektive Reduktion der $NKp46^+$ -ILCs im Darmgewebe keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung des restlichen zellulären Immunsystems in der Lamina propria unter physiologischen Bedingungen.

Makrophagen/Granulozyten



Dendritische Zellen

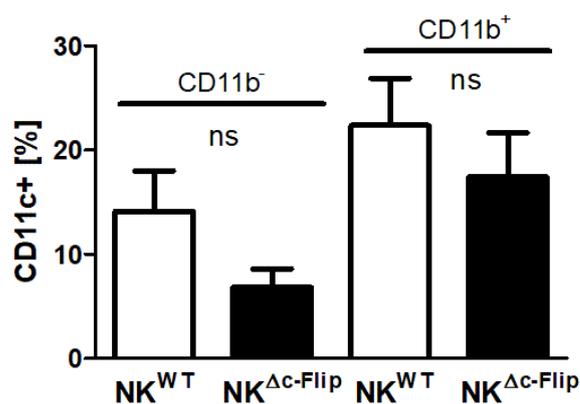


Abb. 3.6: Zellen der myeloiden Reihe bei NK^{Δc-Flip}-Mäusen. Gezeigt sind die Daten durchflusszytometrischer Analysen von Lamina-propria-Leukozyten aus Dickdarmgewebe. Innerhalb der Fraktion der CD45⁺ Leukozyten wurden Makrophagen und die Granulozyten anhand ihrer differentiellen Expression von Gr-1 und CD11b identifiziert. Dendritische Zellen wurden durch ihre Expression von CD11c erfasst, und weiter in CD11b⁻ und CD11b⁺ Subtypen untergliedert. Es sind die zusammengefassten Daten aus vier unabhängigen Experimenten mit 6 bis 10 Tieren pro Gruppe dargestellt. ns = nicht signifikant (t-Test für unabhängige Variablen).

3.3. Der Verlauf einer akuten DSS-induzierten Colitis bei NK^{Δc-Flip}-Mäusen

Nachdem gezeigt wurde, dass in der Lamina propria des Dünndarms und Colons von NK^{Δc-Flip}-Mäusen eine signifikante Reduktion aller NKp46⁺-ILC-Subpopulation vorliegt, war von Interesse, ob und wie sich dies unter pathologischen Bedingungen auswirkt. Dazu wurde das Mausmodell der DSS-induzierten Colitis eingesetzt, das aufgrund des histologischen Erscheinungsbildes und der Symptomatik der Colitis ulcerosa beim Menschen ähnelt (s. 2.2.9.).

Durch die Gabe von 2,5%-igem DSS *ad libitum* über das Trinkwasser für fünf Tage wurde in NK^{WT}- sowie NK^{Δc-Flip}-Mäusen eine akute Colitis induziert. (s. 2.2.9.). Dabei wurden beide Genotypen, soweit möglich als Wurfgeschwister, gemeinsam in Gruppen von zwei bis vier Mäusen getrennt nach Geschlechtern pro Käfig gehalten. Aufgrund geschlechtsspezifischer Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber DSS, wurden die Experimente ausschließlich mit weiblichen Tieren durchgeführt. Aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten wurden pro Genotyp die Daten von 15-16 Weibchen zusammengefasst. Das Alter betrug acht bis 16 Wochen. Zur Bewertung der Krankheitsaktivität wurden bei den Mäusen regelmäßig die Scoring-Parameter Gewicht, Kotkonsistenz sowie Blut im Stuhl erfasst (s. 2.2.9.) und als Colitis-Score ausgewertet (s. Abb. 3.7). Hierbei zeigte sich bei den NK^{Δc-Flip}-Mäusen verglichen zu den NK^{WT}-Mäusen ein schneller einsetzender und auch stärkerer Gewichtsverlust sowie ausgeprägtere rektale Blutabgänge.

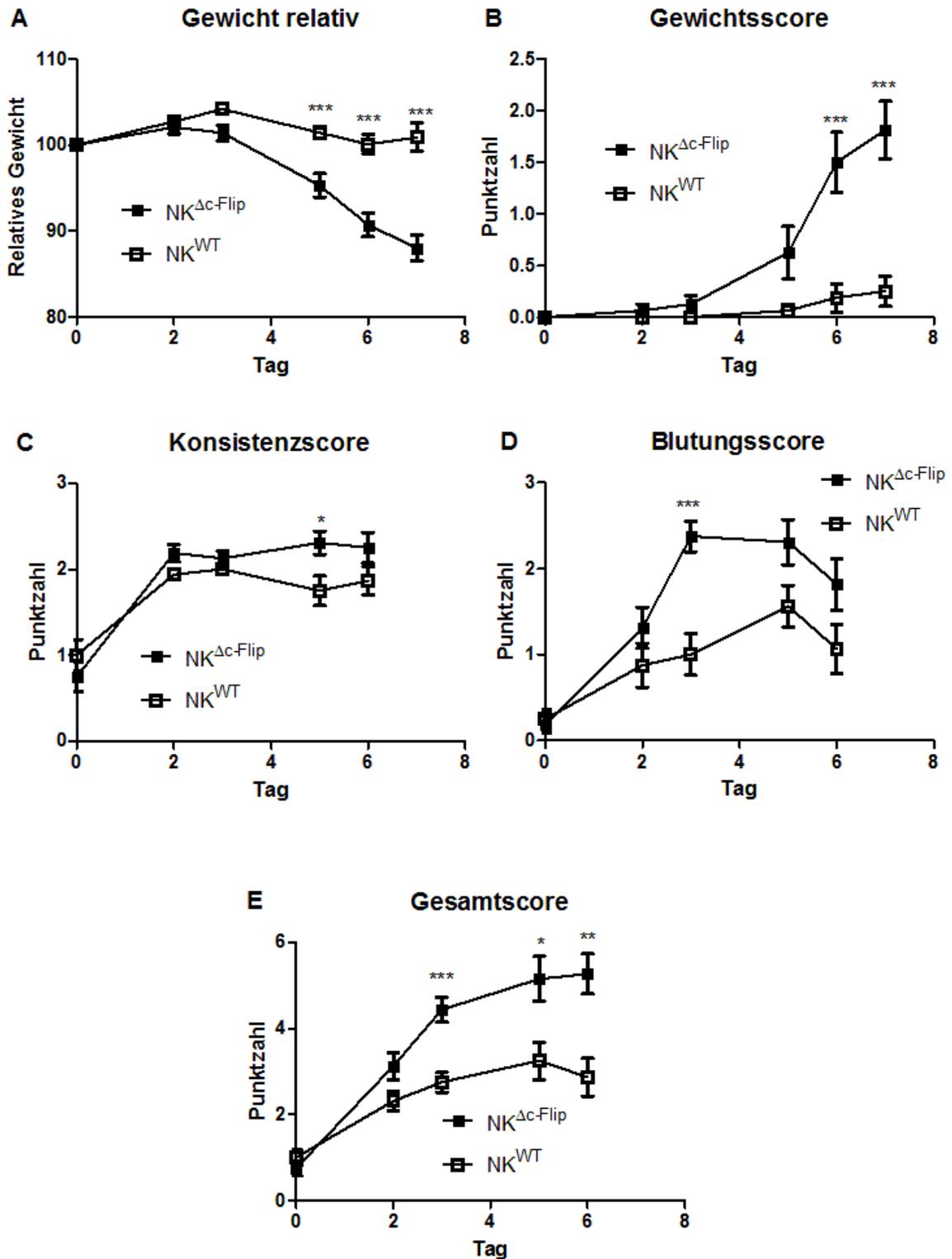


Abb. 3.7: Verlauf einer akuten DSS-Colitis bei NK^{Δc-Flip}- und NK^{WT}-Mäusen. Zur Induktion einer akuten Colitis wurde den Mäusen (n=15-16 pro Genotyp aus drei unabhängigen Experimenten) für fünf Tage 2,5%-iges DSS über das Trinkwasser verabreicht, gefolgt von zwei Tagen Trinkwasser ohne DSS-Zusatz. Die Bewertung der Krankheitsaktivität beinhaltet die Erfassung von Gewicht, Kotkonsistenz und der Intensität gastrointestinaler Blutabgänge (Scoresystem s. Tab. 2.5). Diese Parameter sind hier einzeln dargestellt. (A) Relatives Gewicht der Mäuse bezogen auf das Ausgangsgewicht bei Start des Experiments. (B) Score des relativen Gewichtsverlusts. (C) Kotkonsistenzscore. (D) Blutungsscore. (E) Gesamtscore. *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test)

Bezüglich der Kotkonsistenz wurde kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet. Insgesamt entwickelten die $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäuse eine ausgeprägtere Symptomatik der Colitis.

Nach sieben Tagen wurde das Experiment während der aktiven mukosalen Entzündungsreaktion beendet. Milz, Dünndarm und Colon der Tiere wurden analysiert. Längen und Gewichte der Dickdärme wurden nach vorsichtiger Entfernung des Kots erfasst. Als Folge der Entzündung nimmt das Gewicht des Colons zu. Dies basiert u.a. auf der Infiltration von Leukozyten und der Bildung von Ödemen. Das relative Gewicht in mg pro cm Darmlänge wurde daher als Maß für die Ausprägung der Entzündung bestimmt. Wie der Abbildung 3.8 zu entnehmen ist, waren die Colons von DSS-behandelten $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen im Vergleich zu den Colons von DSS-behandelten NK^{WT} -Mäusen verkürzt. Das Gewicht unterschied sich hingegen nicht, weshalb das relative Gewicht der Colons von $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen nach der DSS-Behandlung verglichen mit NK^{WT} -Mäusen höher ist.

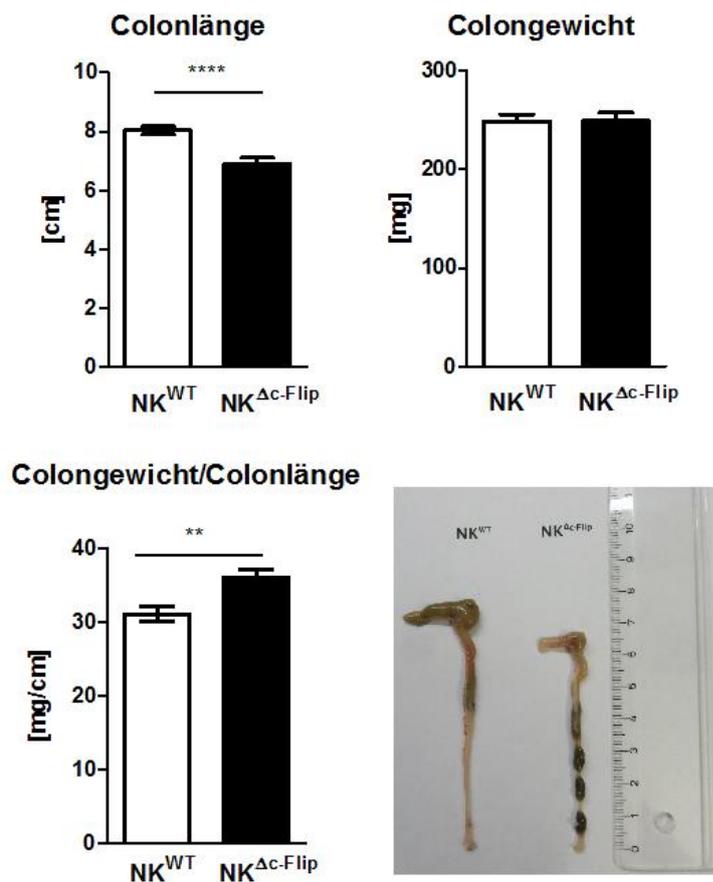


Abb. 3.8: Colonlänge und Colongewicht nach einer akuten DSS-Colitis. Nach der akuten DSS-Colitis wurden die Dickdärme der Mäuse präpariert, der restliche Kot vorsichtig entfernt und anschließend die Länge und das Gewicht der Dickdärme gemessen. Der Quotient aus Colongewicht/Colonlänge wurde als relatives Gewicht gebildet. Abgebildet sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten (n=16 je Genotyp) **p ≤ 0,01; ****p ≤ 0,0001 (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test)

Anschließend wurden Leukozyten aus der Lamina propria des Colons und der Milz isoliert und die Zusammensetzung der Zellpopulationen per Durchflusszytometrie bestimmt. Wie unter 3.1 beschrieben wurden die Zellen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern markiert und die relativen und absoluten Zellzahlen bestimmter Zellpopulationen erfasst. Die ILC-Untergruppen wurden wie unter 3.1 beschrieben analysiert.

Im entzündeten Colon DSS-behandelter $NK^{\Delta c-Flip}$ Mäuse waren die $NKp46^+$ -hILCs und cNK-Zellen ähnlich stark reduziert wie in unbehandelten Tieren derselben Linie. Die lokale Entzündungsreaktion kann den c-Flip-abhängigen Verlust von $NKp46^+$ -ILCs nicht kompensieren. Die relativen und absoluten Zellzahlen von $NKp46^-$ -ILC-Subpopulationen wie ILC2, LTi und NCR-ILC3 unterschieden sich nicht signifikant zwischen beiden untersuchten Genotypen (Abb. 3.9, Abb. 3.10).

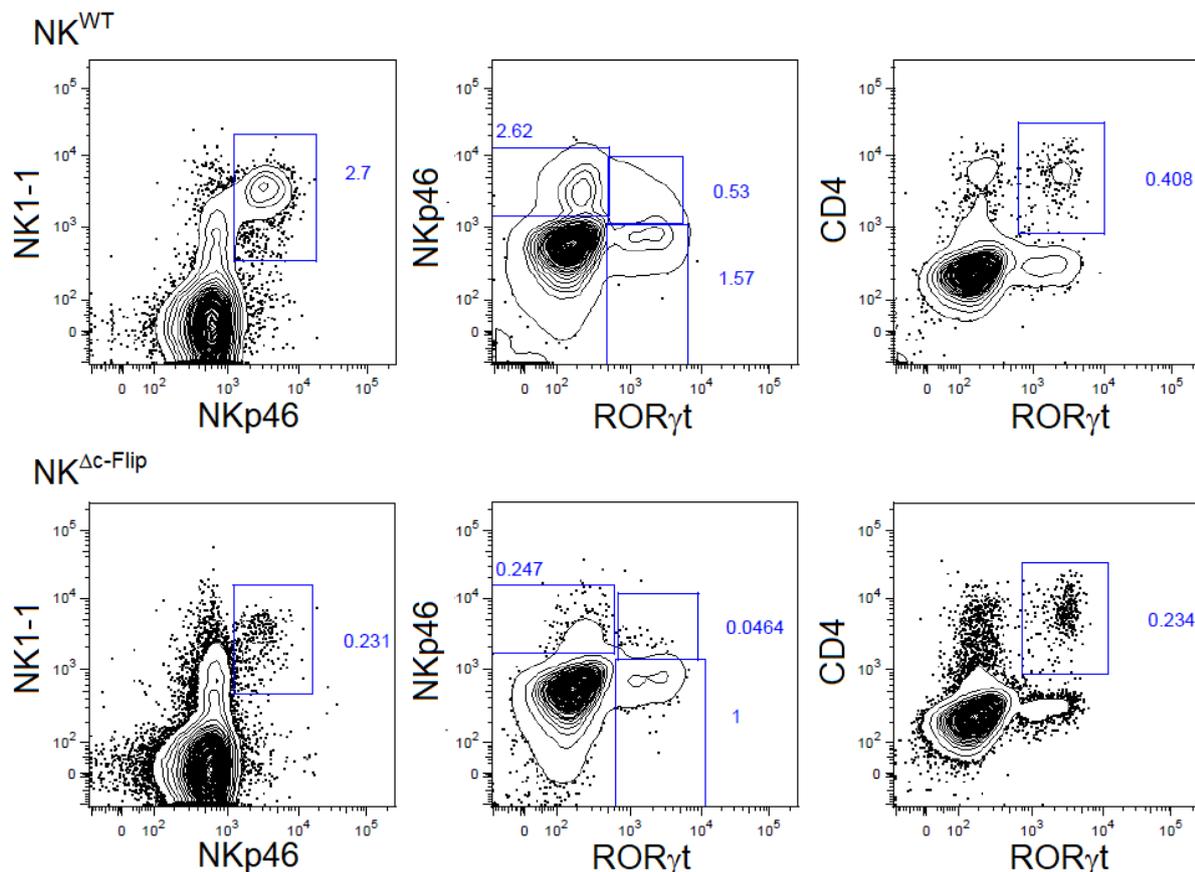


Abb. 3.9: Frequenzen verschiedener ILC-Populationen im Colon auf dem Höhepunkt einer akuten DSS-Colitis.

Dargestellt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen von Lamina-propria-Leukozyten aus präparierten Dünndärmen von NK^{WT} -Mäusen (obere Reihe) und $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen (untere Reihe) als Kontur-Diagramme auf dem Höhepunkt der akuten DSS-Colitis. Zur Identifikation der einzelnen ILC-Subtypen wurden innerhalb der Fraktion der $CD45^+$ Lin $^-$ -Lymphozyten diverse ILC-Subpopulationen anhand weiterer Subtyp-spezifischer Marker analysiert.

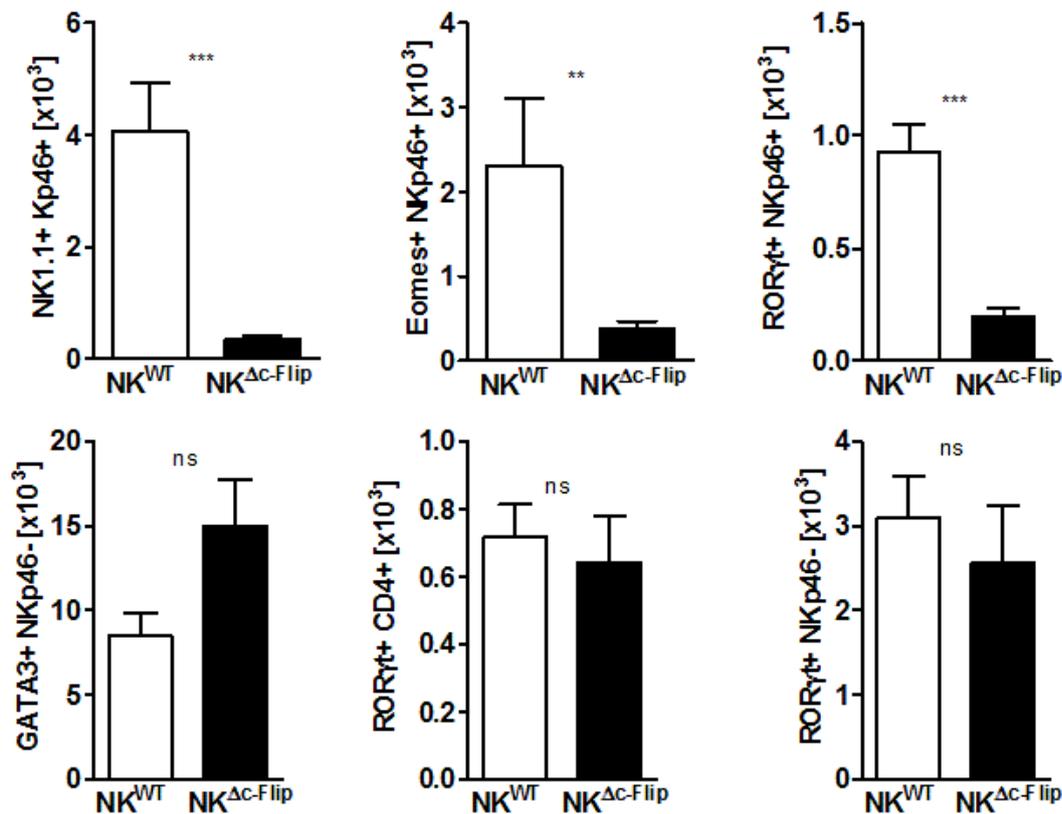


Abb. 3.10: Zusammensetzung der ILC-Populationen im Colon nach einer akuten DSS-Colitis. Gezeigt sind die absoluten Zellzahlen einzelner ILC-Subpopulationen in der Lamina-propria von Dickdärmen auf dem Höhepunkt einer akuten DSS-Colitis. Die durchflusszytometrische Analyse der ILC-Subpopulationen erfolgte wie bei Abb. 3.9 beschrieben. Es sind die ILC1 (NK1.1.+NKp46⁺), die cNK-Zellen (Eomes+NKp46⁺) sowie die NKp46⁺-ILC3 (RORγt+NKp46⁺) in der oberen Reihe dargestellt. In der unteren Reihe sind NKp46⁻-ILC-Subtypen wie ILC2 (GATA3+NKp46⁻), die LTi (RORγt+CD4⁺) sowie die NCR-ILC3 (RORγt+NKp46⁻) gezeigt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils acht Mäusen pro Gruppe. ns = nicht signifikant, **p ≤ 0,005; ***p ≤ 0,001 (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Die als äquivalent zur humanen Colitis ulcerosa eingesetzte DSS-Colitis ist laut Literatur in der akuten Phase der Entzündung durch eine massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Makrophagen in die Colonschleimhaut charakterisiert¹⁶⁰. Daher wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Ildiko R. Dunay und insbesondere mit der Hilfe von Aindrila Biswas in den isolierten Lamina propria-Leukozyten des Colons auf dem Höhepunkt der akuten DSS-Colitis die Frequenz von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durchflusszytometrisch analysiert (s. 2.2.8). Die Differenzierung der einzelnen myeloischen Subpopulationen erfolgte in der Fraktion der CD11b⁺-Leukozyten anhand der Expression von Ly6C und Ly6G.

Zwischen beiden Genotypen wurde kein Unterschied in der Frequenz der Ly6C⁺/Ly6G⁻ sowie der Ly6C⁻/Ly6G⁻ Monozyten/Makrophagen in der Lamina propria der entzündeten Dickdärme nachgewiesen. Hingegen wurde in der Lamina-propria der NK^{ΔC-Flip}-Mäuse ein deutlich

erhöhter Anteil Ly6C⁺/Ly6G⁺ polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) verglichen zu NK^{WT}-Kontrolltieren nachgewiesen. Dies spricht für eine signifikant vermehrte Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Lamina propria im Verlauf der akuten Entzündungsreaktion in NK^{Δc-Flip}-Mäusen (s. Abb. 3.11 und 3.12).

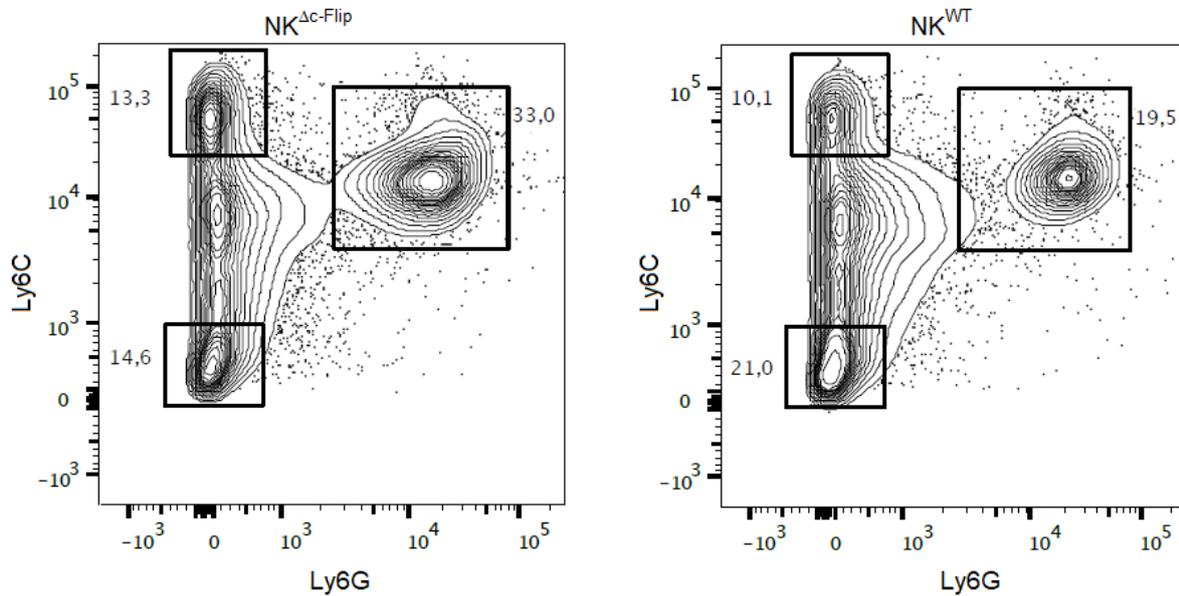


Abb. 3.11: Frequenzen von neutrophilen Granulozyten im Colon während einer akuten DSS-Colitis in NK^{Δc-Flip}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen. Zur durchflusszytometrischen Analyse der myeloischen Zellpopulationen isoliert aus der Lamina propria des Colons erfolgte zunächst innerhalb der CD45⁺ Leukozyten eine Vorselektion auf CD11b⁺-Zellen. In dieser Population wurde die Expression von Ly6C und/oder Ly6G analysiert. Ly6C⁺/Ly6G⁺ Zellen entsprechen den neutrophilen Granulozyten. Ly6C⁺/Ly6G⁻ und Ly6C⁻/Ly6G⁻ sind Zellen des monozytären Systems.

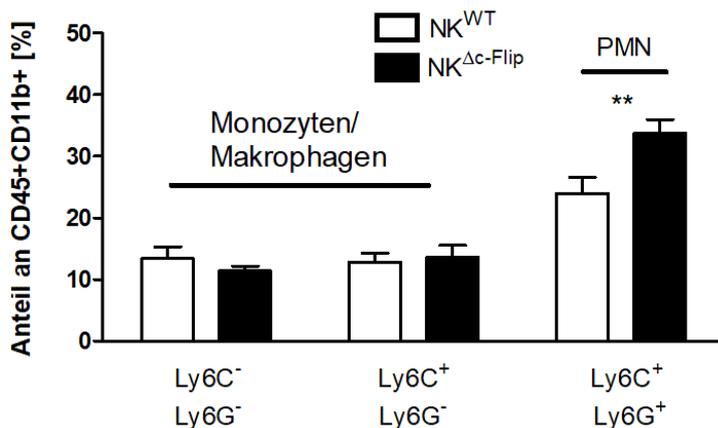


Abb. 3.12: Anteil der Monozyten/Makrophagen und der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten an den CD45⁺/CD11b⁺-Zellen in der Lamina-propria des Colons. Dargestellt ist die Quantifizierung der durchflusszytometrischen Analysen aus Abb. 3.11 auf dem Höhepunkt der akuten DSS-induzierten Colitis. Innerhalb der Gruppe der CD45⁺/CD11b⁺ myeloischen Zellen wurden Ly6C⁻/Ly6G⁻ sowie Ly6C⁺/Ly6G⁻-Zellen als Monozyten/Makrophagen identifiziert, wohingegen Ly6C⁺/Ly6G⁺-Zellen als polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) identifiziert wurden. Dargestellt sind die Daten aus 2 unabhängigen Experimenten mit 15-16 Mäusen pro Gruppe. **p ≤ 0,005 (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

3.4. Der Verlauf einer chronischen DSS-induzierten Colitis bei NK^{Δc-Flip}-Mäusen

Bei den CEDs handelt es sich um chronische Erkrankungen mit schubweise auftretenden Exazerbationen der Entzündung. Um diese Verläufe zu simulieren, wurden in zwei unabhängigen Experimenten getrennt nach Geschlechtern durch die wiederholte Gabe von DSS eine chronische Colitis mit relativ großen Versuchsgruppen (s. 2.2.9., n von 11-15) induziert. Es bestätigte sich, dass die drastische Reduktion der NKp46⁺-ILCs in NK^{Δc-Flip}-Mäuse mit einer deutlich stärkeren Entzündung des Colons einhergeht. Die Scoring-Daten beider Experimente – zum einen mit männlichen und zum zweiten mit weiblichen Tieren - sind in Abb. 3.13 und 3.14 umfassend dargestellt. Männliche Mäuse sind bei identischen Versuchsbedingungen mit einem mittleren Gesamtscore von maximal 7,5 nach dem ersten DSS-Zyklus von einem schwereren Verlauf betroffen als die Weibchen (mittlerer maximaler Gesamtscore 5,67).

Sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen NK^{Δc-Flip}-Mäusen kam es insbesondere in der ersten DSS-Phase zu einem signifikant stärkeren Gewichtsverlust als bei NK^{WT}-Kontrolltieren. Während der zweiten und der dritten DSS-Exposition wurde in diesem Experiment jedoch bei den Männchen kaum noch ein relativer Gewichtsverlust beobachtet (s. Abb. 3.13 A und B). Ursache ist eine starke Gewichtszunahme der Männchen innerhalb der ersten Erholungsphase. So kam es zwar zu absoluten Gewichtsveränderungen während der nachfolgenden DSS-Colitis Phasen, aber nicht zu einem relativen Gewichtsverlust verglichen mit dem Gewicht an Tag 0.

Zwischen den Genotypen unterschied sich insbesondere das Ausmaß der rektalen Blutabgänge signifikant. Dieser deutliche Unterschied wurde bei beiden Geschlechtern und in allen drei DSS-Phasen registriert (s. Abb. 3.13 D und 3.14 D).

Weniger deutlich ausgeprägt sind - wie bereits bei den Experimenten zur akuten DSS-Colitis beobachtet – die Unterschiede bezüglich der Kotkonsistenz in der Anfangsphase der DSS-induzierten Entzündungsschübe. Insbesondere in den Regenerationsphasen konnten jedoch bei beiden Geschlechtern signifikante Unterschiede gesehen werden (s. Abb. 3.13 C und 3.14 C). Auffällig ist, dass bei beiden Geschlechtern bei den NK^{Δc-Flip}-Tieren bereits nach der ersten DSS-Phase die Kotkonsistenz deutlich verändert blieb, was auf eine verzögerte Regeneration des Darmepithels verglichen zu NK^{WT}-Kontrolltieren hindeutet. Der Anstieg der Gesamtscore-Punktwerte nach DSS-Exposition als Maß für die Entzündungsstärke erfolgte bei den NK^{Δc-Flip}-Mäusen schneller als bei den NK^{WT}-Mäusen. Wie für das Modell der chronisch entzündlichen DSS-Colitis beschrieben, ergab sich mit jedem DSS-Zyklus bei NK^{WT}-Mäusen ein Anstieg des maximalen Gesamtscores. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen bei den weiblichen Tieren zu beobachten. Die NK^{Δc-Flip}-Mäuse erreichten in den aufeinanderfolgenden DSS-Expositionen jeweils ähnlich hohe Gesamtscorewerte.

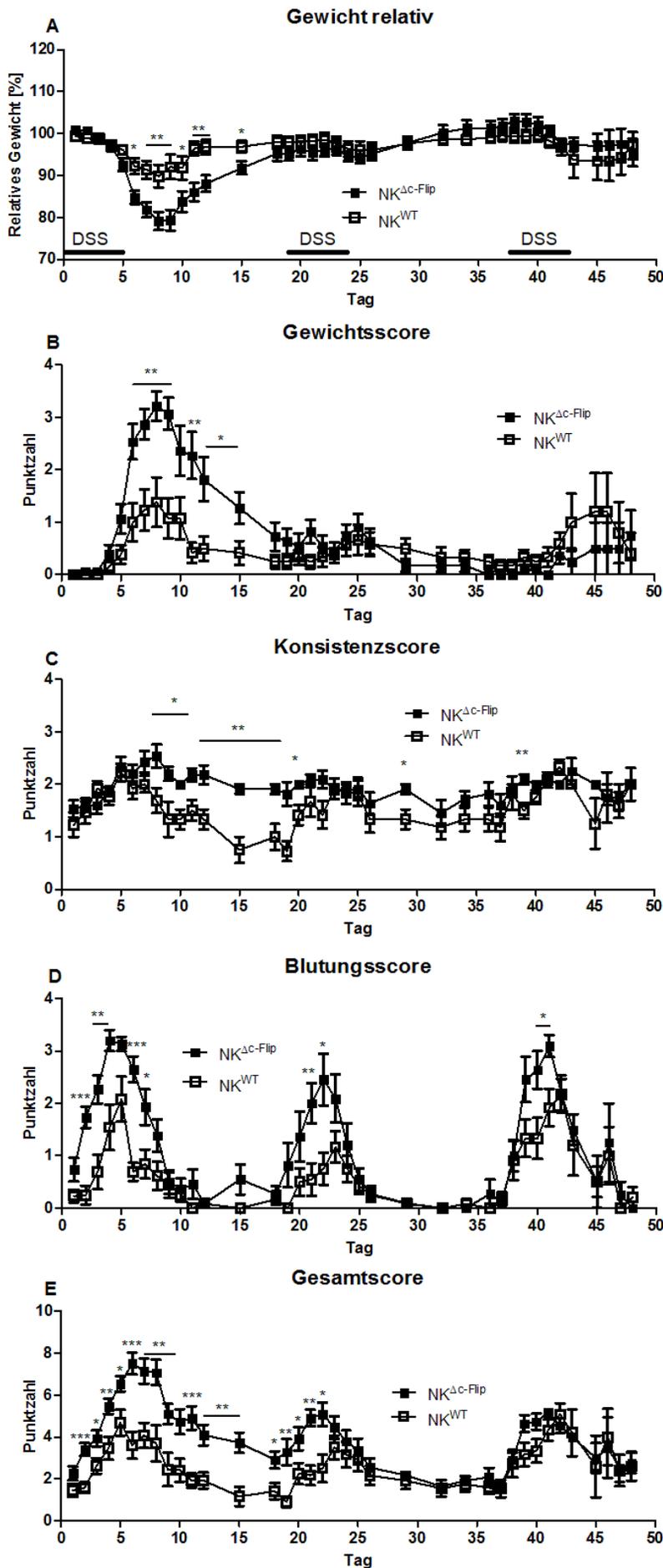


Abb. 3.13: Verlauf einer chronischen DSS-Colitis bei männlichen NK^{ΔC-Flip}- und NK^{WT}-Mäusen. Den Versuchstieren (n der NK^{WT}-Gruppe=13, n der NK^{ΔC-Flip}-Gruppe=15) wurde in drei Zyklen DSS für jeweils 5 Tage verabreicht (s. 2.2.9.) und die Mäuse an Tag 42 und Tag 49 euthanasiert. Scoresystem s.Tab. 2.5 (A) Gewichtsverlauf. (B) Score des relativen Gewichtsverlusts. (C) Kotkonsistenzscore. (D) Blutungsscore. (E) Gesamtscore. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,005; ***p ≤ 0,001 (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

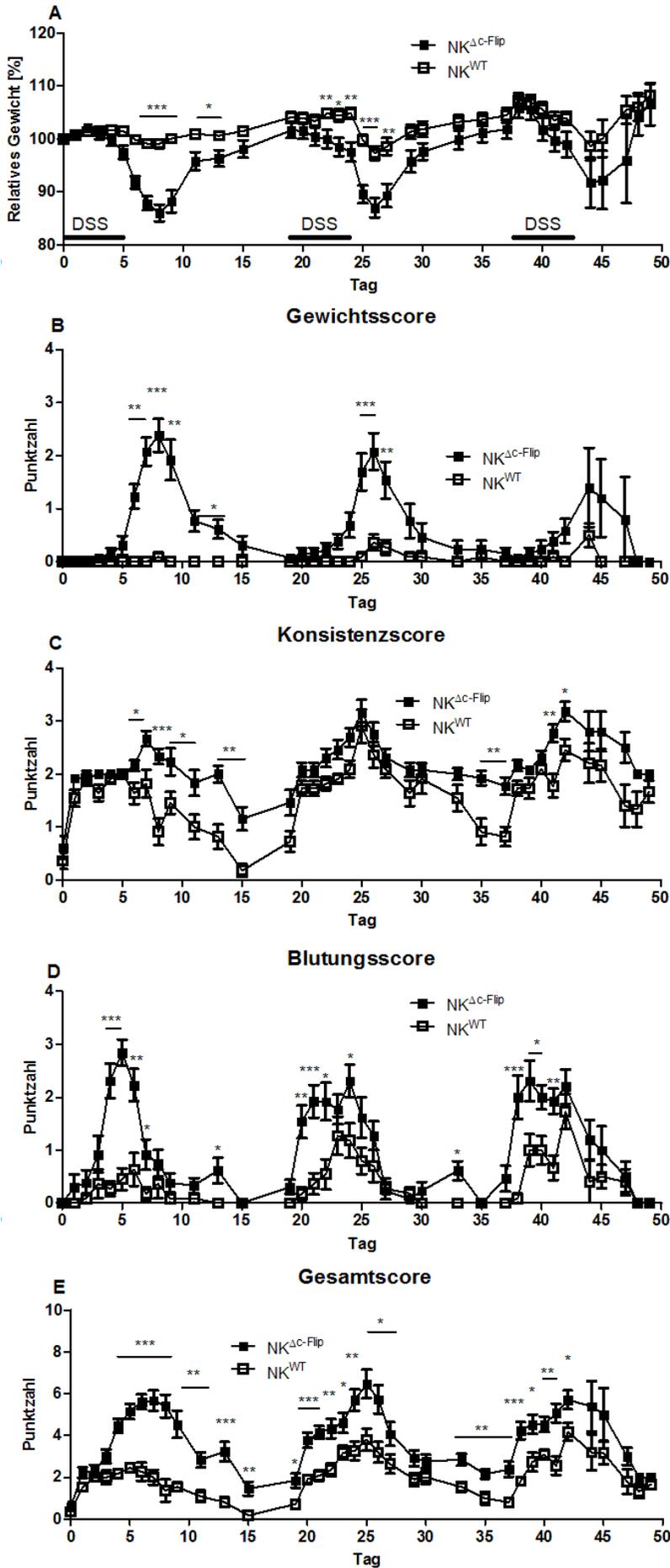


Abb. 3.14: Verlauf einer chronischen DSS-Colitis bei weiblichen $NK^{\Delta C-Flip}$ - und NK^{WT} -Mäusen.

Den Versuchstieren (n der NK^{WT} -Gruppe=11, n der $NK^{\Delta C-Flip}$ Gruppe=13) wurde in drei Zyklen DSS für jeweils 5 Tage verabreicht (s. 2.2.9.) und die Mäuse an Tag 42 und Tag 49 euthanasiert. Scoresystem s. Tab. 2.5 (A) Gewichtsverlauf. (B) Score des relativen Gewichtsverlusts. (C) Kotkonsistenzscore. (D) Blutungsscore. (E) Gesamtscore. *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,005; ***p ≤ 0,001. (Zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

Ebenfalls auffällig ist eine schlechtere Erholungsrate bei den $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen bereits nach der ersten DSS-Exposition in Form eines persistierend höheren Gesamtscores.

Nach dem dritten Zyklus der DSS-Exposition wurden die Dickdärme der Versuchstiere an Tag 42 – auf dem Höhepunkt des dritten Entzündungsschubes - oder an Tag 49 in der Erholungsphase nach der dritten DSS-Exposition entfernt und Gewicht und Länge der Dickdärme gemessen (s. Abb. 3.15).

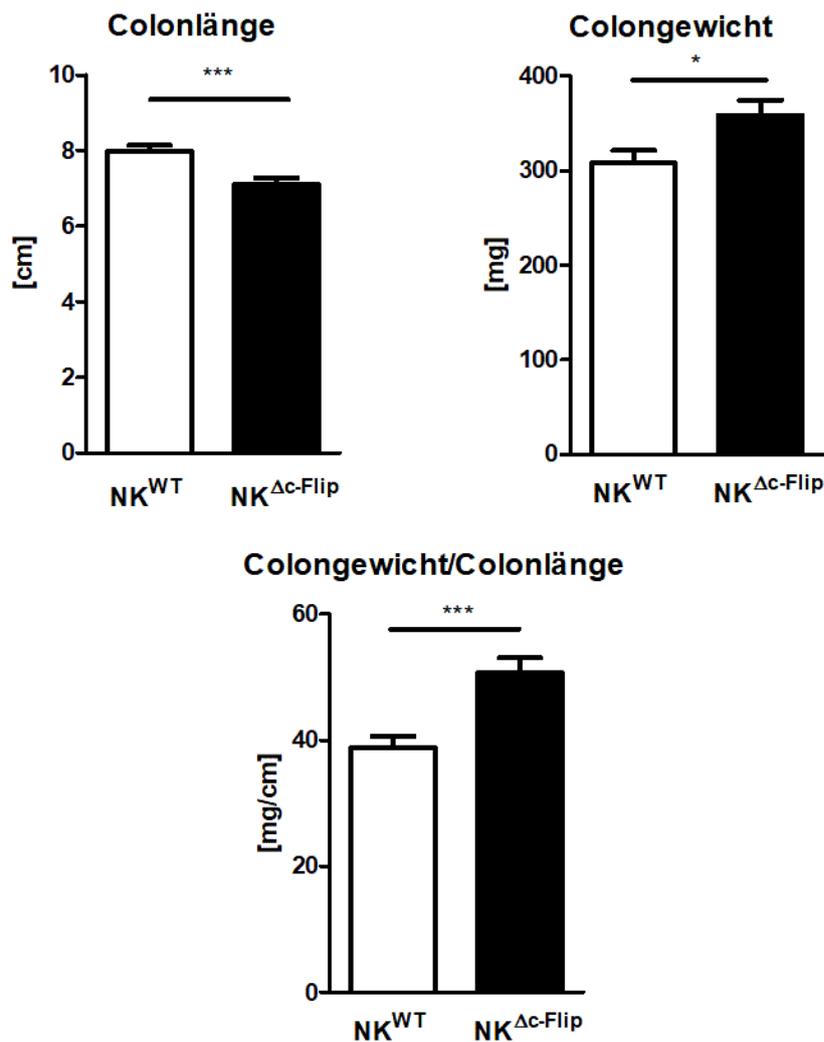


Abb. 3.15: Colonlänge und -gewicht nach einer chronischen DSS-Colitis. Nach der dritten DSS-Exposition zur Induktion einer chronischen Colitis wurden die Dickdärme der Mäuse präpariert und deren Länge sowie das Gewicht bestimmt. Das spezifische Gewicht wurde als Quotient zwischen Gewicht und Länge gebildet. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten. $n=23$ für die NK^{WT} -Gruppe und $n=19$ für die $NK^{\Delta c-Flip}$ -Gruppe. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben)

Diese Messungen ergaben, dass ähnlich wie bei der akuten Colitis die Dickdärme bei den $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen verglichen zu den NK^{WT} -Mäusen deutlich verkürzt sind und ein signifikant

höheres spezifisches Gewicht als Indikator für ein vermehrtes entzündliches Infiltrat aufweisen.

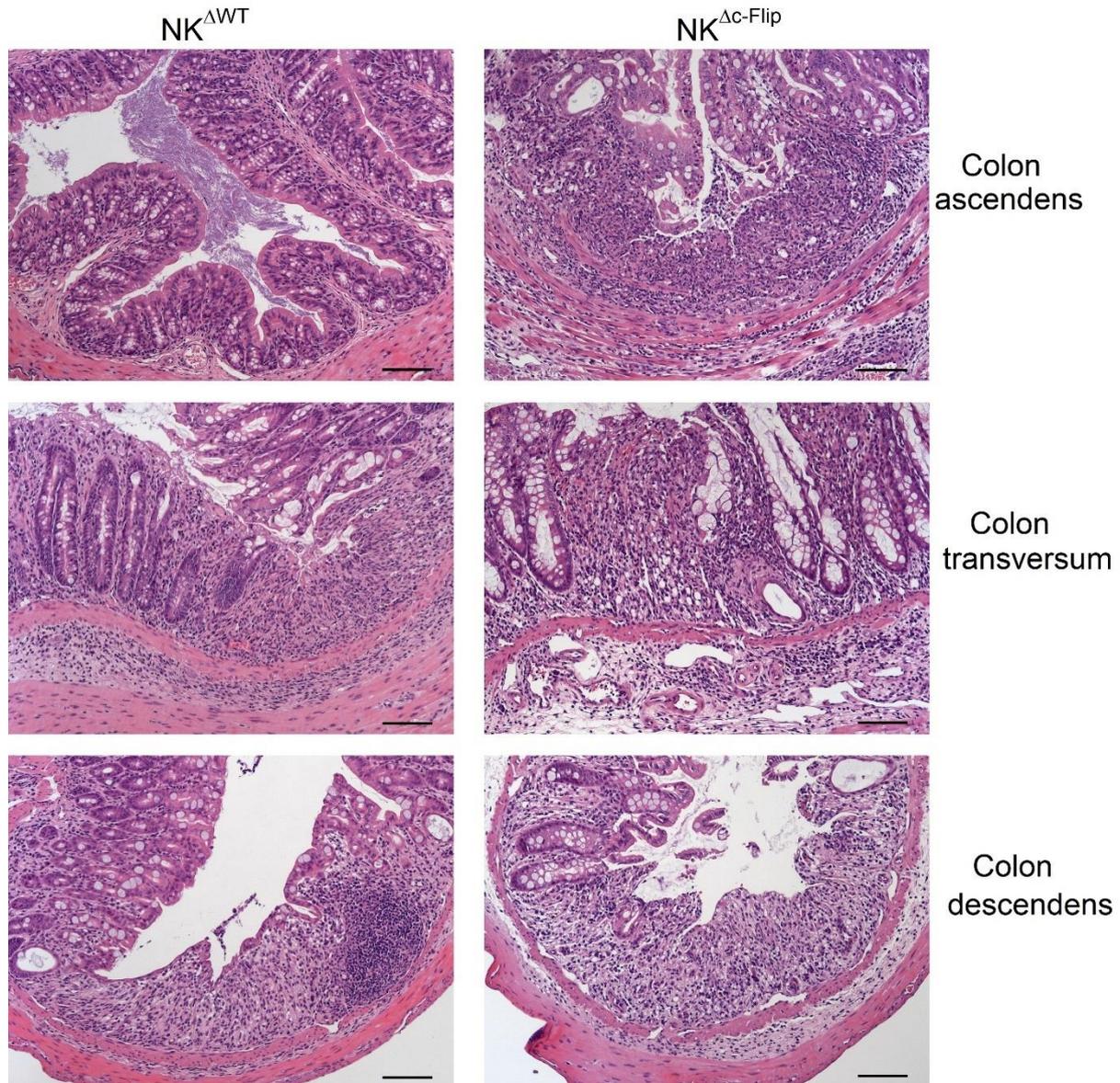


Abb. 3.16: Histologische Schnitte in einer chronischen DSS-Colitis. Gezeigt sind repräsentative mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte aus verschiedenen Colonabschnitten bei Mäusen nach einer chronischen DSS-induzierten Colitis. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels standardisiertem Scoresystem.

Colonproben von Tag 42 wurden in Kooperation mit PD Dr. rer. nat. Anja Kühn (Institut für Pathologie, Charité Berlin) histopathologisch analysiert. Zur Bewertung wurde ein für chemisch induzierte Colitiden adaptiertes Scoresystem genutzt. Zusätzlich wurden MPO (= Myeloperoxidase) exprimierende Zellen angefärbt und ausgezählt (s. Tab. 2.6, Abb. 3.16 und 3.17). $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäuse erreichten einen höheren histopathologischen Score sowie eine höhere Anzahl an MPO⁺-Zellen. Dies spricht für eine vermehrte entzündliche Infiltration, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, passend zu dem schwereren Verlauf der

chronischen Colitis. Zudem sind vermehrte und größere Erosionen und Ulcerationen mit daraus resultierender, aufgehobener Kryptenarchitektur im entzündeten Colongewebe der $\text{NK}^{\Delta\text{C-Flip}}$ -Mäuse zu beobachten. Zusammengefasst weisen diese Daten auf eine protektive Rolle der NKp46^+ -ILCs hinsichtlich einer DSS-induzierten akuten sowie chronischen Colitis hin.

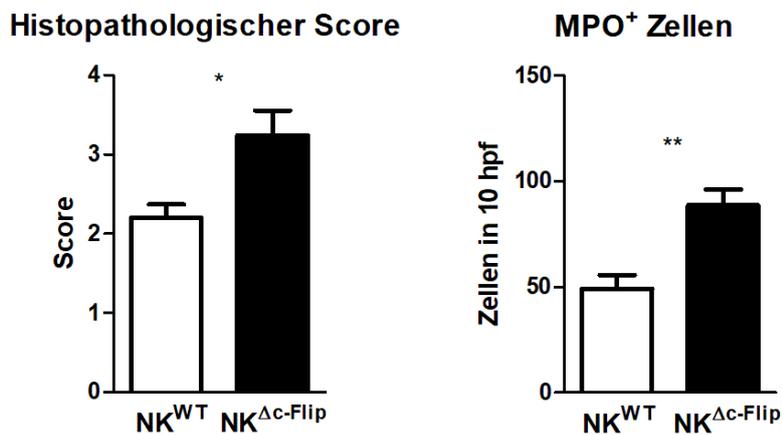


Abb. 3.17: Histopathologischer Score und Anzahl MPO⁺-Zellen in der chronischen Colitis. Zu jedem der histologischen Colon-Gewebeschnitte wurde wie in Tab. 2.6 geschildert ein Score zur Quantifizierung der histologischen Veränderungen erhoben. Weiterhin wurden MPO⁺ Zellen in 10 hpf (= high power field) in 400-facher Vergrößerung gezählt. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von 5 bis 7 Versuchstieren pro Gruppe (Mittelwert \pm SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$. (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben).

3.5. Das Zytokinmilieu in der Erholungsphase der Colitis

Als nächstes wurde die Produktion von Zytokinen in verschiedenen Abschnitten des entzündeten Colons bestimmt. Mit Hilfe von Immunassays (Bead-basierter Multiplex-Assay und ELISA) wurden die Konzentrationen von 13 entzündungsrelevanten Zytokinen und einem Chemokin in den gewonnenen Kulturüberständen bestimmt und jeweils für die drei Colonabschnitte eines Tieres zusammengefasst. Die Messwerte wurden jeweils auf das eingesetzte Gewebegewicht normiert.

Signifikant verminderte Chemokinwerte wurden für MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), und verminderte Zytokinwerte für IL-12p70 sowie GM-CSF (Granulozyten-Monozyten Colony-stimulating factor) in $\text{NK}^{\Delta\text{C-Flip}}$ -Mäusen verglichen mit den Wildtyp-Kontrolltieren ermittelt (s. Abb. 3.18).

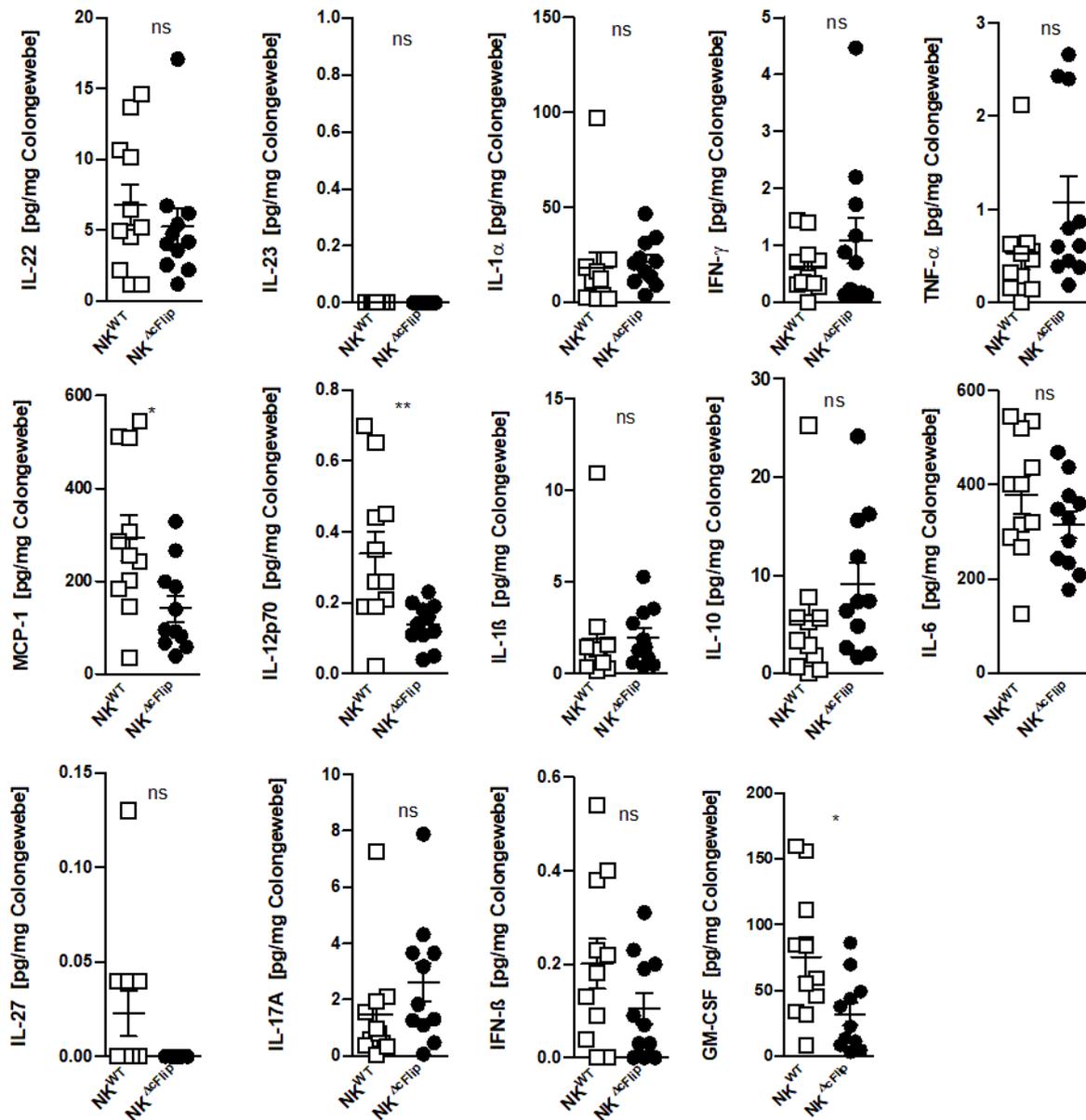


Abb. 3.18: Zytokine im Colon in der Erholungsphase nach Induktion einer DSS-Colitis. Nach Präparation der Dickdärme wurde das Gewebegewicht für jeden der nachfolgend inkubierten Gewebeabschnitte erfasst, sodass die Zytokin-/Chemokinkonzentration pro mg Colongewebe angegeben werden konnte. Dargestellt sind die Daten an Tag zehn einer DSS-induzierten Colitis aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 11 Versuchstieren pro Gruppe. In diesen Experimenten wurden nur weibliche Mäuse verwendet. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; ns = nicht signifikant (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test).

3.6 Veränderungen der Reg3 γ Produktion in NK Δ c-Flip-Mäusen

Defensine regulieren die Zusammensetzung der kommensalen Mikroflora. So wird z.B. Reg3 γ (regenerating islet-derived protein 3 γ) unter anderem von Paneth-Zellen im Darmepithel sezerniert. Die Sekretion ist von verschiedenen Stimuli wie bspw. dem Kontakt zu Bakterien abhängig^{161,162}.

Die Interaktion zwischen Mukosa, Zellen des Immunsystems, sowie der Mikrobiota spielt eine Rolle in der Expression und Funktion von $\text{Reg3}\gamma^{163}$. Da die Komposition der ILCs auch in der Mukosa in $\text{NK}^{\Delta\text{c-Flip}}$ Mäusen verändert ist, wurde die Expression von $\text{Reg3}\gamma$ analysiert. Hierzu wurde aus abgeschüttelten Darmepithelien vom Dünndarm- und Dickdarm (s. 2.2.3.) RNA extrahiert und mit Hilfe einer qPCR die Expression von $\text{REG3}\gamma$ auf mRNA-Ebene untersucht (s. 2.3.4.).

Die Analysen ergaben, dass bzgl. der Expression von $\text{Reg3}\gamma$ zwischen den NK^{WT} - und den $\text{NK}^{\Delta\text{c-Flip}}$ -Mäusen kein signifikanter Unterschied besteht (s. Abb. 3.19). Im Dünndarm zeigt sich jedoch verglichen zum Colon eine stärkere Expression.

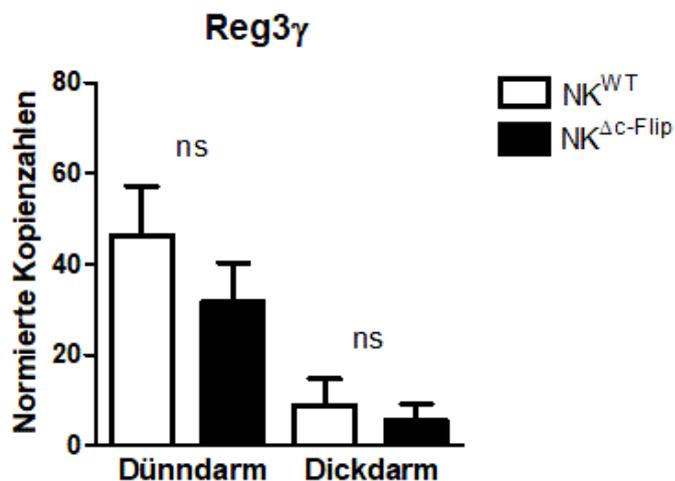


Abb. 3.19: $\text{Reg3}\gamma$ mRNA-Expression in Dünndarm- und Dickdarm. Die mRNA wurde jeweils aus abgeschütteltem Epithel extrahiert und mittels qPCR analysiert. HPRT wurde als Referenzgen zur Normierung der qPCR-Daten verwendet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt acht Tieren pro Gruppe. ns = nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1. NKp46⁺-ILCs sind c-Flip abhängig

Die ILCs setzen sich aus mehreren Subgruppen zusammen, deren immunregulatorisches Potenzial bisher kaum verstanden ist. (s. 1.3). Dies gilt insbesondere für immunkompetente Mäuse, in denen CD4⁺ T_H-Zellen die Funktion von ILCs kompensieren können^{86,145,164,165}. Das Ausmaß dieser funktionellen Redundanz ist kontextabhängig und muss deshalb in verschiedenen experimentellen Settings überprüft werden. Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der ILCs auf die Homöostase des Intestinums und in der Colitis überwiegend in T- und B-Zell-defizienten bzw. -kompromittierten Mäusen gewonnen^{108,117,166}. Auf Grund der teilweise redundanten Funktionen von T_H-Zellen und ILCs ist damit von einer beschränkten Aussagekraft der Ergebnisse auszugehen. Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es daher, den Beitrag der ILCs in T- sowie B-Zell kompetenten Mäusen zu untersuchen. Hierzu stellt die spezifische Reduktion von ILC-Untergruppen ein vielversprechendes Modell dar.

Um dieses Ziel zu erreichen, wird das Modell des konditionalen Knock-outs genutzt, der hier zur Reduktion NKp46⁺-ILCs in NK^{Δc-Flip}-Mäusen u.a. in der Milz aber auch im Dünndarm und Colon führt (s. Abb. 3.2 und 3.3). NKp46 wird von cNK-Zellen, den ILC1 sowie einer Untergruppe der ILC3 exprimiert. Während cNK-Zellen und ILC1 IFN- γ produzieren, produzieren NKp46⁺-ILC3 u.a. IL-22. NKp46⁺-ILCs sind bereits während ihrer Entwicklung von c-Flip abhängig^{167,168}. Ab diesem Zeitpunkt sind sie Apoptose-induzierenden Faktoren wie TNF- α und TRAIL ausgesetzt, die sie teilweise selbst exprimieren. Zu ihrem Schutz produzieren sie daher das anti-apoptotische Molekül c-Flip^{167,168}. Dessen Expression wird u.a. durch STAT5-abhängige Signal des IL-15 induziert¹⁶⁷. Das könnte die anti-apoptotische Wirkung des IL-15 auf cNK-Zellen und ILC1 erklären^{108,169}. Der NKp46-abhängige Knock-out von c-Flip stellt somit einen effektiven Mechanismus dar, um NKp46⁺-ILCs zu reduzieren. NKp46⁻-ILCs sowie andere Leukozyten bleiben hingegen unverändert (s. Abb. 3.4, 3.5 und 3.6).

4.2. NKp46⁺- ILC-Subgruppen wirken protektiv in einer akuten und einer chronischen Colitis

Nach Induktion einer akuten DSS-Colitis wiesen NK^{Δc-Flip}-Mäuse einen schwereren symptomatischen Verlauf mit vorrangig mehr rektalen Blutabgängen und einem höheren Gewichtsverlust auf (s. Abb. 3.7). Auch in der akuten DSS-Colitis sind die NKp46⁺-ILCs reduziert, während NKp46⁻-ILCs unverändert blieben (s. Abb. 3.9 und 3.10.). Als morphologisches Korrelat einer schwereren Entzündungsreaktion in NK^{Δc-Flip}-Mäusen konnte

für das deutlich verkürzte Colon ein erhöhtes spezifisches Gewicht nachgewiesen werden (s. Abb. 3.8). Weiterhin waren die PMN als wichtige Effektoren für akute Entzündungsreaktionen im Colon von NK^{Δc-Flip}-Mäusen deutlich vermehrt (s. 3.11. und 3.12). Dies lässt auf eine protektive und nicht redundante Funktion von NKp46⁺-ILCs in der akuten DSS-Colitis schließen.

Während einer chronischen DSS-Colitis wurden NK^{Δc-Flip}-Mäuse schneller und stärker symptomatisch. Zusätzlich erholten sie sich zwischen den aktiven Erkrankungsphasen schlechter von Gewebeschäden (s. Abb. 3.13 und 3.14). Das ist ein Indikator für eine schlechtere Regeneration des Epithels. Wie bereits erläutert, gelten insbesondere die NKp46⁺-ILC3 als wichtige Produzenten des Zytokins IL-22. Dieses Zytokin spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der intestinalen Homöostase und Regeneration von Epithelzellen^{73,118}. Auch hier stammten die zitierten Erkenntnisse initial aus Experimenten mit T- und B-Zell-defizienten Mäusen. Inwieweit T-Zellen den Mangel an IL-22 aus ILC3 kompensieren können, war nicht abschließend geklärt. Trotz der drastischen Reduktion aller NKp46⁺-ILCs in NK^{Δc-Flip}-Mäusen, wurde jedoch kein signifikantes Defizit in der IL-22 Produktion in der Erholungsphase nach einer DSS-induzierten Darmentzündung nachgewiesen (Abb. 3.17).

Es gibt Hinweise, dass die IL-22-Produktion der T-Zellen den entscheidenderen Mechanismus zumindest in der antibakteriellen Wirkung im Colon darstellt. Zindl et al. haben in dem Mausmodell der *Citrobacter rodentium* Infektion zeigen können, dass das aus T-Helferzellen stammende IL-22 notwendig für die erfolgreiche Immunantwort gegen das Bakterium ist¹⁶⁴. Das aus den ILC3 stammende IL-22 konnte nur in der Anfangsphase und für einen begrenzten Zeitraum wesentlich zur Beherrschung der Infektion beitragen. Nichtsdestotrotz könnte ein Mangel an IL-22 einen schwerwiegenderen und länger anhaltenden Epithelschaden in NK^{Δc-Flip}-Mäusen erklären. Insbesondere der Beitrag des IL-22 regulierenden IL-22 binding protein (IL-22BP), das durch Bindung von IL-22 die Signaltransduktion verhindert und überwiegend aus dendritischen Zellen stammt, ist noch nicht ausreichend geklärt¹⁷⁰. Es gibt bereits Hinweise, dass das IL-22BP als Negativregulator des IL-22 eine wichtige Rolle in der Gewebshomöostase der Darmepithelien spielt. Hierbei hat die intestinale Inflammation einen regulierenden Einfluss auf das Verhältnis von IL-22 zu IL-22BP. Dadurch wird einerseits die Heilung des Darmepithels, andererseits aber auch eine pathologische Inflammation und die Karzinogenese beeinflusst¹⁷¹. Das Inflammasom wirkt dabei auf die Expression von IL-18. IL-18 führt seinerseits zur Sekretion des IL-22BP. Insgesamt handelt es sich um ein komplexes Netzwerk mit Wechselwirkungen, die weiterer Untersuchungen bedürfen.

Neben den NKp46⁺-ILC3 sind auch die ILC1 sowie die cNK-Zellen in NK^{Δc-Flip}-Mäusen drastisch vermindert. Auf Basis der in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse wurde in weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. T. Schüler analysiert, welche

NKp46⁺-Untergruppe für die Abschwächung der Colitis am ehesten verantwortlich ist. Diese Untersuchungen sind mit den Daten dieser Dissertation in eine 2020 erschienene Publikation in Nature Communications eingeflossen¹⁶⁷.

Da hILCs im Gegensatz zu den meisten cNK-Zellen in Ihrer Entwicklung von IL-7 abhängig sind^{35,86,96}, wurden NK^{ΔIL7-R}-Mäuse basierend auf dem unter 2.2.1 beschriebenen Cre/loxp-Rekombinationssystem verwendet. In diesen Mäusen erfolgt NKp46-abhängig ein konditioneller Knock-out des IL-7-Rezeptors (IL-7R)¹⁶⁷. In diesen Mäusen sind vor allem NKp46⁺-ILC3 sowie die Helferzell-ähnlichen ILC1 reduziert. Die Anzahl an cNK-Zellen bleibt unverändert¹⁶⁷. Diese Tiere sind ebenfalls T- und B-Zell kompetent.

Im Verlauf und Schweregrad der akuten DSS-Colitis zwischen NK^{ΔIL7-R}-Mäusen und den NK^{WT}-Kontrolltieren ergaben sich keine Unterschiede. Die vorrangig IL-7-abhängigen NKp46⁺-ILC3 und die Helferzell-ähnlichen ILC1 scheinen daher keine wesentliche Rolle für die mukosale Entzündung in der DSS-induzierten Colitis zu spielen¹⁶⁷.

Zur Unterscheidung, ob cNK-Zellen den Verlauf einer DSS-Colitis beeinflussen, wurden zwei weitere verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen wurde der cNK-Zell-depletierende Antikörper Anti-Asialo-GM1^{172,173} verabreicht. Dieser führt zu einer drastischen, transienten Reduktion der NKp46⁺Eomes⁺-cNK-Zellen. Mit Anti-Asialo-GM1 behandelte Mäuse litten an einer schwereren DSS-induzierten Colitis als die mit Kontroll-IgG behandelten Mäusen¹⁶⁷. Bei diesem cNK-Depletionsmodell kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass neben cNK-Zellen auch andere Asialo-GM1-positive Immunzellen depletiert werden^{173,174}. Um unspezifische Antikörpereffekte auszuschließen, wurden mithilfe des Cre/loxp-Rekombinationssystems NK^{ΔEomes}-Mäuse erzeugt. In diesem konditionellem Knock-out-Modell wird NKp46-abhängig Eomes inaktiviert und es kommt zur selektiven Reduktion von cNK-Zellen. Andere ILC-Subtypen bleiben dabei unverändert. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen litten die Mäuse an einer schwerwiegenderen Colitis als die NK^{WT}-Mäuse¹⁶⁷.

Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Hall et al. In diesen wurde bereits durch die Antikörper-vermittelte Depletion von cNK-Zellen deren Bedeutung als lokale Hemmer für die Migration und Aktivität von neutrophilen Granulozyten in einer DSS-induzierten Colitis identifiziert¹⁷⁵. Hierbei spielt der NKG2A-Rezeptor auf cNK-Zellen eine wichtige Rolle¹⁷⁵. NKG2A nutzt MHC Klasse I als Liganden und bewirkt die Hemmung der cNK-Zellaktivität¹⁷⁵. Die Blockade des Rezeptors führt zu einer höheren Infiltration und Aktivität von neutrophilen Granulozyten in einer DSS-Colitis. Neutrophile Granulozyten gelten als die quantitativ wichtigsten zellulären Mediatoren einer akuten Entzündungsreaktion. Eine Verminderung der cNK-Zellen in NK^{Δc-Flip}-Mäusen und folglich eine Erhöhung der Aktivität von neutrophilen Granulozyten geht somit mit einer schwereren Colitis einher³⁵.

Diese weiterführenden Daten unterstreichen die wichtige Rolle der cNK-Zellen in der Abschwächung der DSS-induzierten Colitis. Dies deckt sich mit der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass trotz ebenfalls reduzierter Zahlen von NKp46⁺-ILC3 der Spiegel des als protektiv geltende IL-22 zwischen den Genotypen NK^{Δc-Flip} und NK^{WT} nicht unterschiedlich ist (s. 3.18). Es kann also eine kompensatorische Rolle der T-Helfer Zellen hinsichtlich der Funktion der NKp46⁺-ILC3 postuliert werden, wohingegen die Funktion der cNK-Zellen nicht zu kompensieren ist¹⁶⁷. Insgesamt lindern cNK-Zellen und nicht die IL-7-abhängigen hILC1 und NKp46⁺-ILC3 den Verlauf einer DSS-induzierten Colitis.

ILCs sind ebenfalls in der Lage als entzündungsfördernd geltende Zytokine wie IL-17 und IFN- γ zu sezernieren. NKp46⁻-ILC3 sind eine wichtige Quelle des proinflammatorisch wirkenden IL-17^{35,117,118}. Die Anzahl dieser Zellen (s. Abb. 3.4) sowie die Menge des IL-17 (s. Abb. 3.18) im Colon DSS behandelter NK^{Δc-Flip}-Mäuse blieb unverändert. Dies legt die Vermutung nahe, dass NKp46⁻-ILC3 keine entscheidende Rolle in der Pathogenese der DSS-induzierten Colitis spielen.

Die Rolle des IFN- γ im Verlauf einer Colitis ist bisher ebenfalls nicht völlig geklärt^{176–179}. Während einerseits Effekte auf die Epithelzellen gezeigt werden konnten, die den Verlauf einer DSS-induzierten Colitis abschwächen^{178,180}, sind andererseits auch colitogene Effekte nachgewiesen. Hierbei scheint insbesondere die Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps in Makrophagen sowie eine Abschwächung der intestinalen Barrierefunktion durch IFN- γ von Bedeutung zu sein^{176,181}. Da wie in Abb. 3.18 gezeigt, in der Regenerationsphase nach akuter Colitis kein signifikanter Unterschied zwischen den IFN- γ -Spiegeln im Colongewebe von NK^{Δc-Flip}- Mäusen und NK^{WT}-Kontrolltieren besteht, ist auch hier die kompensatorische Rolle der vorhandenen T-Zellen nicht auszuschließen.

Es konnte aber eine Reduktion der Zytokine IL-12p70, GM-CSF sowie des Chemokins MCP-1 in NK^{Δc-Flip}-Mäusen nach einer DSS-induzierten Colitis ermittelt werden (s. Abb. 3.18). MCP-1 spielt als Chemokin eine wichtige Rolle für die Einwanderung von Monozyten/Makrophagen ins Gewebe¹⁸². GM-CSF fördert die Bildung und Reifung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. IL-12p70 stellt das aktive Heterodimer von IL-12 dar. Es wird von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert und begünstigt unter anderem die Entstehung von T_{H1}-Zellen (s. 1.2), aber auch die Aktivität von cNK-Zellen¹⁸³. Monozyten/Makrophagen spielen eine Rolle in der mukosalen Wundheilung und der Auflösung entzündlicher Reaktionen, unter anderem im Modell der DSS-Colitis¹⁸⁴. Eine Verminderung der GM-CSF- und MCP-1-Mengen ist daher als eine Ursache der schlechteren Regeneration DSS-behandelter NK^{Δc-Flip}-Mäuse denkbar. Es existieren Daten, die eine direkte Rolle des GM-CSF in der mukosalen Wundheilung in einer DSS-induzierten Colitis nachgewiesen haben¹⁸⁵. Aufgrund der erhöhten Frequenz von neutrophilen Granulozyten in NK^{Δc-Flip}-Mäusen während

der akuten DSS-Colitis ist ein erhöhter Verbrauch eine mögliche Ursache des erniedrigten GM-CSF Spiegels. Bei chronischer DSS-Colitis korreliert die Reduktion des GM-CSF-Spiegels in NK^{ΔC-Flip}-Mäusen mit einer verringerten Regenerationsfähigkeit des Colongewebes. Auf Grund der Reduktion der Makrophagen-stimulierenden Zytokine ist eine konsekutive Reduktion des von Makrophagen produzierten Il-12p70 naheliegend. Wie in Abb. 3.12 dargestellt, sind die relativen Zahlen der Makrophagen jedoch zwischen beiden Genotypen nicht unterschiedlich. Weitere, differenziertere Untersuchungen sind daher notwendig.

Insgesamt ist auf Basis der im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten zu schlussfolgern, dass die NKp46⁺-ILCs einen protektiven Effekt in der nicht-infektiösen Colitis haben. Der zugrunde liegende Mechanismus ist aktuell noch nicht abschließend bekannt.

4.3. Die Regulation der NKp46⁺-ILCs auf die Mikrobiota spielt während einer Colitis ebenfalls eine Rolle

Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems tragen ILCs auch zu den Wechselwirkungen zwischen dem Wirt und der Mikrobiota bei. Um einen möglichen Einfluss von NKp46⁺-ILCs auf die Zusammensetzung der kommensalen Mikroflora beurteilen zu können, wurden Kotproben von NK^{ΔC-Flip}- und NK^{AWT}-Mäusen jeweils am Beginn und am Ende chronischer Colitisexperimente analysiert. Aus diesen wurde die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota durch die kooperierende Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Till Strowig vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durch Genamplifikation und Sequenzierung (Deep sequencing) der bakteriellen 16S rRNA analysiert. In den Proben, die vor Induktion einer chronischen DSS-induzierten Colitis gewonnen wurden, wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen, die die Varianzen zwischen Individuen und Käfigen überstiegen. Diese Daten lassen vermuten, dass eine Reduktion der NKp46⁺-ILCs die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota unter physiologischen Bedingungen nicht signifikant zu verändert scheint¹⁶⁷. Im Gegensatz dazu wurde nach der chronischen DSS-induzierten Colitis eine abweichende Zusammensetzung der Mikroflora bei NK^{ΔC-Flip}-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Mikrobiom auch im Rahmen der stärkeren Entzündungsreaktion in NK^{ΔC-Flip}-Mäusen verändern hat. In den NK^{ΔC-Flip}-Mäusen reicherten sich insbesondere Gattungen an, die bevorzugt bei Inflammation im Colon nachzuweisen sind. Dazu zählen *Bacteroides*^{186,187} sowie *Turicibacter*¹⁸⁷. In den NK^{WT}-Mäusen hingegen wurde ein höherer Anteil u.a. an *Prevotella* nachgewiesen. Die Gattung *Prevotella* findet sich bevorzugt im nicht-entzündeten Colon¹⁸⁸ und gilt als Schleimhaut protektiv. Ob die stärkere Entzündungsreaktion in NK^{ΔC-Flip}-Mäusen die Zusammensetzung des Mikrobioms verändert oder ob die veränderte Zusammensetzung zu einer stärkeren Entzündung führt, kann aktuell nicht abschließend beantwortet werden. Es

scheint allerdings so, dass im Rahmen der DSS-induzierten Colitis die NKp46⁺-ILC-Untergruppen die Zusammensetzung des Mikrobioms der Mäuse beeinflussen.

Die Interaktion zwischen dem angeborenen Immunsystem und insbesondere der NKp46⁺-ILCs mit dem Mikrobiom stellt somit einen weiteren Einfluss auf die Schwere einer Colitis dar. Inwiefern die ILCs die Mikrobiota beeinflussen und dadurch Auswirkungen auf den Verlauf einer akuten oder chronischen Colitis haben, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.4. Implikationen für die Klinik

Die in dieser Dissertation erhobenen Daten basieren auf einem Mausmodell. Die Übertragbarkeit auf die humane Situation bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist daher zu diskutieren. Eine Arbeit von Forkel et al. zeigte, dass in Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ein Unterschied in der Verteilung der ILCs zwischen entzündeten und nicht entzündeten Abschnitten vorliegt¹⁸⁹. Zwischen gesunden Probanden und den jeweils nicht entzündeten Abschnitten bei den Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten hingegen wenig Unterschiede detektiert werden. Insbesondere bei Colitis ulcerosa Patienten wurde in entzündeten Gewebeabschnitten eine Verminderung der NK-Zellen sowie der NCR2(NKp44)⁺-ILC3 nachgewiesen, wohingegen NCR⁻-ILC3 und ILC1 erhöht waren. Dieser Befund ist bezogen auf die in dieser Dissertation erhobenen Daten sehr interessant. Die zu Grunde liegenden Mechanismen für die Veränderungen der ILC-Komposition im entzündeten Gewebe sind allerdings weiterhin nicht im Detail verstanden.

Eine stärkere Inflammation des Colons sowie eingeschränkte Regeneration können neben der schwereren Symptomatik auch zu Komplikationen führen. Hierzu zählt unter anderem die maligne Entartung mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen. Aber auch die Entwicklung von Stenosen oder Fisteln spielen für den Krankheitsverlauf und die weitere Therapie eine große Rolle. Bis heute ist nicht vollends geklärt, welche Faktoren die Ausbreitung der Entzündung oder die Entwicklung von Komplikationen beeinflussen. Dies gilt ebenso für das heterogene Ansprechen auf die immer mannigfaltigere Auswahl an Therapeutika.

Weiterführende Untersuchungen, vorrangig in der humanen Situation, können in Zukunft wichtige pathophysiologische Einblicke in die Genese und den Verlauf von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bieten. So können neue therapeutische Ziele identifiziert und eine personalisierte Therapie ermöglicht werden. In Zukunft sollte auch ein Augenmerk auf die Rolle der ILCs gelegt werden.

5. Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie die Colitis Ulcerosa und der Morbus Crohn stellen eine erhebliche Ursache für Morbidität und Mortalität dar. Das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge ist für eine zielgerichtete Therapie dieser Erkrankungen von größter Notwendigkeit. Mausmodelle wie das Modell der DSS-Colitis sind hierfür wichtige Instrumente, um die Erkrankungen zu simulieren und die Krankheitsentstehung zu untersuchen. Das Immunsystem stellt auf Grund seiner besonderen Rolle an mukosalen Epithelien wie im Magen-Darm-Trakt eine wichtige Komponente in der Pathogenese von Colitiden dar. Zuvor publizierte Daten weisen auf eine besondere Rolle des angeborenen Immunsystems in der Homöostase der Mukosa hin. Dabei ist die Gruppe der ILCs eine relativ neu beschriebene und vielfältige Gruppe von Zellen des angeborenen Immunsystems mit funktionellen Ähnlichkeiten zu T-Zellen. Die Rolle der ILCs in der Homöostase ist noch unzureichend bekannt. Neben den zytotoxischen NK-Zellen gehören zu den ILCs die T-Helferzell-ähnlichen Subpopulationen. Diese werden in die Gruppen der ILC1, 2 und 3 unterteilt. Einige der ILC-Subpopulationen sind durch die Expression von natural cytotoxicity receptors (NCR) wie NKp46 (NCR1) gekennzeichnet. Diese Subpopulation besteht aus NK-Zellen, ILC1 sowie den NCR⁺-ILC3. Zur Untersuchung der Funktion von NKp46⁺-ILCs wurden konditionale Knock-out-Mäuse generiert. Durch die NKp46-abhängige Expression von iCre und dem resultierenden konditionellen Knock-out von c-Flip sind diese Gruppen in allen analysierten Geweben, auch in Dünn- sowie Dickdarm, deutlich vermindert. Die anderen Untergruppen der ILCs, die T- und B-Zellen sowie Zellen der myeloiden Reihe sind weitestgehend unbeeinflusst. Es steht somit ein Mausmodell zur Verfügung, in dem speziell NKp46⁺-ILCs stark reduziert sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NKp46⁺ und c-Flip abhängige Untergruppen der ILCs eine akute und eine chronische Colitis positiv beeinflussen. Die Reduktion der NKp46⁺-ILCs führt zu einer schwereren Colitis mit verzögerter und unvollständiger Regeneration zwischen den Colitisschüben. Dies spiegelt sich sowohl in der Symptomatik als auch durch einen vermehrten Influx von proinflammatorischen Zellen in die Mukosa wider. NKp46⁺-, c-Flip-abhängige ILCs scheinen somit einen protektiven Einfluss auf die Pathogenese der DSS-induzierten Colitis zu haben, der durch andere Immunzellen nicht kompensiert wird. Im Zytokinmilieu konnten Erniedrigungen im Spiegel von MCP1, GM-CSF und IL12p70 zumindest in der Erholungsphase nach einer DSS-induzierten Colitis gesehen werden. Dennoch sind weiterführende Untersuchungen des Mechanismus für den Einfluss der NKp46⁺-ILCs auf die intestinale Homöostase notwendig. Insgesamt stellen die ILCs somit in Zukunft ein mögliches therapeutisches Ziel für chronisch entzündliche Darmerkrankungen dar.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, Bokemeyer B, Esters P, Herrlinger K, Kannengießer K, Kienle P, Langhorst J, Lügering A, Schreiber S, Stallmach A, Stein J, Sturm A, Teich N, Siegmund B. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2019; 57: 1321–1405.
- 2 Preiß JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignaß A, Häuser W, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC. Aktualisierte S3-Leitlinie--"Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn" 2014. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2014; 52: 1431–1484.
- 3 *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage, in Zusammenarbeit mit der Charité ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2016.
- 4 Allescher H-D, Lohse AW, Schramm C. Referenz Gastroenterologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2019.
- 5 Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29: 990–996.
- 6 Whorwell PJ, Holdstock G, Whorwell GM, Wright R. Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease. *British medical journal* 1979; 1: 382.
- 7 Asakura H, Suzuki K, Kitahara T, Morizane T. Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis? *Journal of gastroenterology and hepatology* 2008; 23: 1794–1801.
- 8 Owczarek D, Rodacki T, Domagała-Rodacka R, Cibor D, Mach T. Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology* 2016; 22: 895–905.
- 9 Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *The American journal of clinical nutrition* 1996; 63: 741–745.
- 10 Card T, Logan RFA, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 246–250.
- 11 Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52: 79–83.
- 12 Schaubeck M, Clavel T, Calasan J, Lagkouvardos I, Haange SB, Jehmlich N, Basic M, Dupont A, Hornef M, Bergen M von, Bleich A, Haller D. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* 2016; 65: 225–237.
- 13 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 13780–13785.
- 14 Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical journal of gastroenterology* 2018; 11: 1–10.
- 15 Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2020; 145: 16–27.
- 16 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB,

- Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603–606.
- 17 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJS, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *The Lancet* 2001; 357: 1925–1928.
 - 18 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599–603.
 - 19 Pauleau A-L, Murray PJ. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Molecular and cellular biology* 2003; 23: 7531–7539.
 - 20 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, La Vega FM de, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics* 2007; 39: 207–211.
 - 21 Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nature reviews. Genetics* 2005; 6: 376–388.
 - 22 Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, Waldhoer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *The Lancet* 1993; 341: 1437–1439.
 - 23 Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000; 119: 1740–1744.
 - 24 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, zum Meyer Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and experimental immunology* 1995; 102: 448–455.
 - 25 Wen Z, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis? *Clinical & developmental immunology* 2004; 11: 195–204.
 - 26 Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2018; 53: 379–389.
 - 27 Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, Michelassi F, Hanauer S. Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *The New England journal of medicine* 1994; 330: 1841–1845.
 - 28 Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johanns J, Gao L-L, Miao Y, Adedokun OJ, Sands BE, Hanauer SB, Vermeire S, Targan S, Ghosh S, Villiers WJ de, Colombel J-F, Tulassay Z, Seidler U, Salzberg BA, Desreumaux P, Lee SD, Loftus EV, Dieleman LA, Katz S, Rutgeerts P. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *The New England journal of medicine* 2016; 375: 1946–1960.
 - 29 Sands BE, Sandborn WJ, Panaccione R, O'Brien CD, Zhang H, Johanns J, Adedokun OJ, Li K, Peyrin-Biroulet L, van Assche G, Danese S, Targan S, Abreu MT, Hisamatsu T, Szapary P, Marano C. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *The New England journal of medicine* 2019; 381: 1201–1214.
 - 30 Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, van Assche G, Axler J, Kim H-J, Danese S, Fox I, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 699–710.

- 31 Pugliese D, Felice C, Papa A, Gasbarrini A, Rapaccini GL, Guidi L, Armuzzi A. Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future. *Expert review of clinical immunology* 2017; 13: 223–233.
- 32 Adegbola SO, Sahnun K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *International journal of molecular sciences* 2018; 19.
- 33 Loftus EV, Panés J, Lacerda AP, Peyrin-Biroulet L, D'Haens G, Panaccione R, Reinisch W, Louis E, Chen M, Nakase H, Begun J, Boland BS, Phillips C, Mohamed M-EF, Liu J, Geng Z, Feng T, Dubcenco E, Colombel J-F. Upadacitinib Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *The New England journal of medicine* 2023; 388: 1966–1980.
- 34 Danese S, Vermeire S, Zhou W, Pangan AL, Siffledeen J, Greenbloom S, Hébuterne X, D'Haens G, Nakase H, Panés J, Higgins PDR, Juillerat P, Lindsay JO, Loftus EV, Sandborn WJ, Reinisch W, Chen M-H, Sanchez Gonzalez Y, Huang B, Xie W, Liu J, Weinreich MA, Panaccione R. Upadacitinib as induction and maintenance therapy for moderately to severely active ulcerative colitis: results from three phase 3, multicentre, double-blind, randomised trials. *Lancet (London, England)* 2022; 399: 2113–2128.
- 35 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. Ninth edition 2018.
- 36 Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th edition GS Garland Science Taylor & Francis Group, New York, London 2017.
- 37 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1999; 162: 3749–3752.
- 38 Richards CM, McRae SA, Ranger AL, Klegeris A. Extracellular histones as damage-associated molecular patterns in neuroinflammatory responses. *Reviews in the neurosciences* 2023; 34: 533–558.
- 39 Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell death & disease* 2017; 8: e2812.
- 40 Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine* 2009; 15: 1318–1321.
- 41 Noll F, Behnke J, Leiting S, Troidl K, Alves GT, Müller-Redetzky H, Preissner KT, Fischer S. Self-extracellular RNA acts in synergy with exogenous danger signals to promote inflammation. *PloS one* 2017; 12: e0190002.
- 42 Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation* 1973; 52: 741–744.
- 43 Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CGM, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 2002; 416: 291–297.
- 44 Styrt B, Klemperer MS. Internal pH of human neutrophil lysosomes. *FEBS letters* 1982; 149: 113–116.
- 45 Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* 2019; 9.
- 46 Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, Koenderman L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends in immunology* 2019; 40: 584–597.
- 47 Buxadé M, Huerga Encabo H, Riera-Borrull M, Quintana-Gallardo L, López-Cotarelo P, Tellechea M, Martínez-Martínez S, Redondo JM, Martín-Caballero J, Flores JM, Bosch E, Rodríguez-Fernández JL, Aramburu J, López-Rodríguez C. Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *The Journal of experimental medicine* 2018; 215: 2901–2918.

- 48 Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 1999; 17: 593–623.
- 49 Berger M, Norvell TM, Tosi MF, Emancipator SN, Konstan MW, Schreiber JR. Tissue-specific Fc gamma and complement receptor expression by alveolar macrophages determines relative importance of IgG and complement in promoting phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatric research* 1994; 35: 68–77.
- 50 Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, Akira S, Iwamatsu A, Koga H, Murakami M, Hirano T. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *The EMBO journal* 2006; 25: 4108–4119.
- 51 Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature reviews. Immunology* 2005; 5: 617–628.
- 52 Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell host & microbe* 2019; 25: 13–26.
- 53 Davodeau F, Peyrat MA, Gaschet J, Hallet MM, Triebel F, Vié H, Kabelitz D, Bonneville M. Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 1994; 180: 1685–1691.
- 54 Kisielow P, Teh HS, Blüthmann H, Boehmer H von. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988; 335: 730–733.
- 55 Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2001; 356: 609–616.
- 56 Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 2017; 17: 30–48.
- 57 Inaba K, Steinman RM. Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 1985; 229: 475–479.
- 58 Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cellular immunology* 2005; 238: 67–75.
- 59 Wucherpfennig KW, Gagnon E, Call MJ, Huseby ES, Call ME. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010; 2: a005140.
- 60 Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *The Journal of investigative dermatology* 2006; 126: 32–41.
- 61 Moss PA, Rosenberg WM, Bell JL. The human T cell receptor in health and disease. *Annual review of immunology* 1992; 10: 71–96.
- 62 Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2018; 10.
- 63 Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001; 14: 205–215.
- 64 Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology* 1995; 13: 251–276.
- 65 Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 1998; 187: 2103–2108.
- 66 Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji N, Hoshino K, Adachi O, Adachi K, Futatsugi S, Kuida K, Takeuchi O, Okamura H, Fujimoto J, Akira S, Nakanishi K. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid

- differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2001; 166: 2651–2657.
- 67 Fang D, Cui K, Cao Y, Zheng M, Kawabe T, Hu G, Killian JS, Li D, Zhong C, Jankovic D, Sher A, Zhao K, Zhu J. Differential regulation of transcription factor T-bet induction during NK cell development and T helper-1 cell differentiation. *Immunity* 2022; 55: 639-655.e7.
 - 68 Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* (New York, N.Y.) 1987; 236: 944–947.
 - 69 Schwartz C, Oeser K, Da Prazeres Costa C, Layland LE, Voehringer D. T cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2014; 193: 3590–3599.
 - 70 Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996; 380: 630–633.
 - 71 Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 2000; 19: 5662–5679.
 - 72 Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, O'Connor MH, Dudakov JA, Jenq RR, Velardi E, Young LF, Smith OM, Lawrence G, Ivanov JA, Fu Y-Y, Takashima S, Hua G, Martin ML, O'Rourke KP, Lo Y-H, Mokry M, Romera-Hernandez M, Cupedo T, Dow L, Nieuwenhuis EE, Shroyer NF, Liu C, Kolesnick R, van den Brink MRM, Hanash AM. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 2015; 528: 560–564.
 - 73 Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, West ML, Jenq RR, Holland AM, Kappel LW, Ghosh A, Tsai JJ, Rao UK, Yim NL, Smith OM, Velardi E, Hawryluk EB, Murphy GF, Liu C, Fouser LA, Kolesnick R, Blazar BR, van den Brink MRM. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 2012; 37: 339–350.
 - 74 Keir M, Yi T, Lu T, Ghilardi N. The role of IL-22 in intestinal health and disease. *The Journal of experimental medicine* 2020; 217: e20192195.
 - 75 Jiang Q, Yang G, Xiao F, Xie J, Wang S, Lu L, Cui D. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 688066.
 - 76 Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 2009; 10: 857–863.
 - 77 Basu R, Hatton RD, Weaver CT. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunological reviews* 2013; 252: 89–103.
 - 78 Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626–635.
 - 79 Herppich S, Toker A, Pietzsch B, Kitagawa Y, Ohkura N, Miyao T, Floess S, Hori S, Sakaguchi S, Huehn J. Dynamic Imprinting of the Treg Cell-Specific Epigenetic Signature in Developing Thymic Regulatory T Cells. *Frontiers in immunology* 2019; 10: 2382.
 - 80 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 2003; 4: 330–336.
 - 81 Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *The Journal of experimental medicine* 1986; 163: 1037–1050.
 - 82 Wan YY, Flavell RA. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2007; 4: 271–276.

- 83 Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2008; 180: 5771–5777.
- 84 Cheng G, Yu A, Dee MJ, Malek TR. IL-2R signaling is essential for functional maturation of regulatory T cells during thymic development. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2013; 190: 1567–1575.
- 85 Kolar P, Knieke K, Hegel JKE, Quandt D, Burmester G-R, Hoff H, Brunner-Weinzierl MC. CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. *Arthritis and rheumatism* 2009; 60: 123–132.
- 86 Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nature immunology* 2011; 12: 21–27.
- 87 Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature reviews. Immunology* 2007; 7: 703–714.
- 88 Kimura MY, Nakayama T. Differentiation of NK1 and NK2 cells. *Critical reviews in immunology* 2005; 25: 361–374.
- 89 Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 2014; 41: 354–365.
- 90 Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, Fabiunke C, Pfeifer D, Sexl V, Fonseca-Pereira D, Domingues RG, Veiga-Fernandes H, Arnold SJ, Buslinger M, Dunay IR, Tanriver Y, Diefenbach A. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 2014; 157: 340–356.
- 91 Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology* 2005; 42: 501–510.
- 92 Ljunggren HG, Kärre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *The Journal of experimental medicine* 1985; 162: 1745–1759.
- 93 Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang Z-E, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *The Journal of experimental medicine* 2003; 198: 1069–1076.
- 94 Yagi R, Zhong C, Northrup DL, Yu F, Bouladoux N, Spencer S, Hu G, Barron L, Sharma S, Nakayama T, Belkaid Y, Zhao K, Zhu J. The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R α -expressing innate lymphoid cells. *Immunity* 2014; 40: 378–388.
- 95 Pikovskaya O, Chaix J, Rothman NJ, Collins A, Chen Y-H, Scipioni AM, Vivier E, Reiner SL. Cutting Edge: Eomesodermin Is Sufficient To Direct Type 1 Innate Lymphocyte Development into the Conventional NK Lineage. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2016; 196: 1449–1454.
- 96 Vosshenrich CAJ, García-Ojeda ME, Samson-Villéger SI, Pasqualetto V, Enault L, Richard-Le Goff O, Corcuff E, Guy-Grand D, Rocha B, Cumano A, Rogge L, Ezine S, Di Santo JP. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nature immunology* 2006; 7: 1217–1224.
- 97 Vargas CL, Poursine-Laurent J, Yang L, Yokoyama WM. Development of thymic NK cells from double negative 1 thymocyte precursors. *Blood* 2011; 118: 3570–3578.
- 98 Satoh-Takayama N, Lesjean-Pottier S, Vieira P, Sawa S, Eberl G, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP. IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. *The Journal of experimental medicine* 2010; 207: 273–280.
- 99 Isaksen DE, Baumann H, Trobridge PA, Farr AG, Levin SD, Ziegler SF. Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 1999; 163: 5971–5977.

- 100 Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman LC, Irvine DJ, Lauffenburger DA, Chen J. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cellular & molecular immunology* 2008; 5: 79–89.
- 101 Pandiyan P, Yang X-P, Saravanamuthu SS, Zheng L, Ishihara S, O'Shea JJ, Lenardo MJ. The role of IL-15 in activating STAT5 and fine-tuning IL-17A production in CD4 T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2012; 189: 4237–4246.
- 102 Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92: 8705–8709.
- 103 Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AY. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 350: 981–985.
- 104 Constantinides MG, McDonald BD, Verhoef PA, Bendelac A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 2014; 508: 397–401.
- 105 Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Frontiers in immunology* 2017; 8: 1296.
- 106 Spits H, Artis D, Colonna M, Dieffenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology* 2013; 13: 145–149.
- 107 Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, Hreggvidsdottir HS, Heinsbroek SE, Legrand N, Buskens CJ, Bemelman WA, Mjösberg JM, Spits H. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature immunology* 2013; 14: 221–229.
- 108 Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, Cella M, Colonna M. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 2013; 38: 769–781.
- 109 Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, Lindsten T, Reiner SL. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 2012; 36: 55–67.
- 110 Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TKA, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie ANJ. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010; 464: 1367–1370.
- 111 Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, McIlgorm A, Jolin HE, McKenzie ANJ. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203: 1105–1116.
- 112 Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. *Immunity* 2001; 15: 985–995.
- 113 Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. Developing Lymph Nodes Collect CD4 + CD3 – LT β + Cells That Can Differentiate to APC, NK Cells, and Follicular Cells but Not T or B Cells. *Immunity* 1997; 7: 493–504.
- 114 Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, Di Santo JP, Eberl G. Lineage relationship analysis of ROR γ mat+ innate lymphoid cells. *Science (New York, N.Y.)* 2010; 330: 665–669.
- 115 Narni-Mancinelli E, Chaix J, Fenis A, Kerdiles YM, Yessaad N, Reynders A, Gregoire C, Luche H, Ugolini S, Tomasello E, Walzer T, Vivier E. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 18324–18329.

- 116 Björklund ÅK, Forkel M, Picelli S, Konya V, Theorell J, Friberg D, Sandberg R, Mjösberg J. The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature immunology* 2016; 17: 451–460.
- 117 Satoh-Takayama N, Vosshenrich CAJ, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention J-J, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, Eberl G, Di Santo JP. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008; 29: 958–970.
- 118 Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Bérard M, Kleinschek M, Cua D, Di Santo JP, Eberl G. ROR γ t+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature immunology* 2011; 12: 320–326.
- 119 Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, Hernandez PP, Kiss EA, Hoyler T, Flach M, Bengsch B, Thimme R, Hölscher C, Hönig M, Pannicke U, Schwarz K, Ware CF, Finke D, Diefenbach A. Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t(+) innate lymphocytes. *Immunity* 2010; 33: 736–751.
- 120 Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 10961–10966.
- 121 Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, Jong E de, Gronke K, Kofoed-Nielsen M, Munneke JM, Hazenberg MD, Villaudy J, Buskens CJ, Bemelman WA, Diefenbach A, Blom B, Spits H. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* 2015; 43: 146–160.
- 122 Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015; 517: 293–301.
- 123 Fanghänel J., Pera F., Anderhuber F., Nitsch R. (Hrsg. 2002). *Waldeyer - Anatomie des Menschen*. 18 De Gruyter, 2002.
- 124 Murphy K, Weaver C. Das mukosale Immunsystem. In: Murphy K, Weaver C (Hrsg.). *Janeway Immunologie* 641–691. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018.
- 125 Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996; 86: 345–348.
- 126 Dillon A, Lo DD. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Frontiers in immunology* 2019; 10: 1499.
- 127 Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schlüter D, Stenzel W, Gruber AD, Krieg T, Rajewsky K, Müller W. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *The Journal of experimental medicine* 2004; 200: 1289–1297.
- 128 Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 2009; 31: 389–400.
- 129 Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian journal of immunology* 2009; 70: 505–515.
- 130 Zeitz M, Schieferdecker HL, Ullrich R, Jahn HU, James SP, Riecken EO. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunologic research* 1991; 10: 199–206.
- 131 Belkaid Y, Bouladoux N, Hand TW. Effector and memory T cell responses to commensal bacteria. *Trends in immunology* 2013; 34: 299–306.
- 132 Hand TW, Dos Santos LM, Bouladoux N, Molloy MJ, Pagán AJ, Pepper M, Maynard CL, Elson CO, Belkaid Y. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science (New York, N.Y.)* 2012; 337: 1553–1556.
- 133 Friedrich C, Taggenbrock RLRE, Doucet-Ladevèze R, Golda G, Moenius R, Arampatzi P, Kragten NAM, Kreymborg K, Gomez de Agüero M, Kastenmüller W, Saliba A-E, Grün D, van Gisbergen KPJM, Gasteiger G. Effector differentiation downstream of lineage

- commitment in ILC1s is driven by Hobit across tissues. *Nature immunology* 2021; 22: 1256–1267.
- 134 Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009; 31: 401–411.
- 135 Akdis CA, Arkwright PD, Brügger M-C, Busse W, Gadina M, Guttman-Yassky E, Kabashima K, Mitamura Y, Vian L, Wu J, Palomares O. Type 2 immunity in the skin and lungs. *Allergy* 2020; 75: 1582–1605.
- 136 Zeng B, Shi S, Ashworth G, Dong C, Liu J, Xing F. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell death & disease* 2019; 10: 315.
- 137 Eken A, Singh AK, Treuting PM, Oukka M. IL-23R+ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal immunology* 2014; 7: 143–154.
- 138 Safa AR. c-FLIP, A MASTER ANTI-APOPTOTIC REGULATOR. *Experimental oncology* 2012; 34: 176–184.
- 139 Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *Journal of cell science* 2005; 118: 265–267.
- 140 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274: 1541–1548.
- 141 Zhang N, He Y-W. An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 2005; 202: 395–404.
- 142 Schattenberg JM, Zimmermann T, Wörns M, Sprinzl MF, Kreft A, Kohl T, Nagel M, Siebler J, Schulze Bergkamen H, He Y-W, Galle PR, Schuchmann M. Ablation of c-FLIP in hepatocytes enhances death-receptor mediated apoptosis and toxic liver injury in vivo. *Journal of hepatology* 2011; 55: 1272–1280.
- 143 Zhang H, Rosenberg S, Coffey FJ, He Y-W, Manser T, Hardy RR, Zhang J. A role for cFLIP in B cell proliferation and stress MAPK regulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2009; 182: 207–215.
- 144 Labrenz R. Die Wirkung von c-Flip auf „Innate Lymphoid Cells“. *Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg* 2020.
- 145 Vély F, Barlogis V, Vallentin B, Neven B, Piperoglou C, Ebbo M, Perchet T, Petit M, Yessaad N, Touzot F, Bruneau J, Mahlaoui N, Zucchini N, Farnarier C, Michel G, Moshous D, Blanche S, Dujardin A, Spits H, Distler JHW, Ramming A, Picard C, Golub R, Fischer A, Vivier E. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nature immunology* 2016; 17: 1291–1299.
- 146 Fischer A, Rausell A. Primary immunodeficiencies suggest redundancy within the human immune system. *Science immunology* 2016; 1.
- 147 Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews* 2007; 59: 1073–1083.
- 148 Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology* 2014; 104: 15.25.1-15.25.14.
- 149 Kim H, Kim M, Im S-K, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory animal research* 2018; 34: 147–159.
- 150 Shimshek DR, Kim J, Hübner MR, Spergel DJ, Buchholz F, Casanova E, Stewart AF, Seeburg PH, Sprengel R. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 2002; 32: 19–26.
- 151 Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98: 694–702.
- 152 Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; 2012: 718617.

- 153 Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Experimental animals* 2000; 49: 9–15.
- 154 Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994; 107: 1643–1652.
- 155 Song C-H, Kim N, Nam RH, Choi S in, Yu JE, Nho H, Shin E, Lee H-N, Surh Y-J. Testosterone strongly enhances azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colorectal cancer development in C57BL/6 mice. *American Journal of Cancer Research* 2021; 11: 3145–3162.
- 156 Kim S, Lee J-Y, Shin SG, Kim JK, Silwal P, Kim YJ, Shin N-R, Kim PS, Won M, Lee S-H, Kim SY, Sasai M, Yamamoto M, Kim J-M, Bae J-W, Jo E-K. ESRRA (estrogen related receptor alpha) is a critical regulator of intestinal homeostasis through activation of autophagic flux via gut microbiota. *Autophagy* 2021; 17: 2856–2875.
- 157 Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2012.
- 158 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clinical and experimental immunology* 1998; 114: 385–391.
- 159 Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, Zeitz M, Siegmund B, Kühl AA. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014; 7: 4557–4576.
- 160 Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PloS one* 2009; 4: e6073.
- 161 Loonen LMP, Stolte EH, Jaklofsky MTJ, Meijerink M, Dekker J, van Baarlen P, Wells JM. REG3 γ -deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal immunology* 2014; 7: 939–947.
- 162 Ogawa H, Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Unno M, Takahashi K, Kitayama T, Matsuno S, Ohtani H, Takasawa S, Okamoto H, Sasaki I. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflammatory bowel diseases* 2003; 9: 162–170.
- 163 Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science (New York, N.Y.)* 2011; 334: 255–258.
- 164 Zindl CL, Witte SJ, Laufer VA, Gao M, Yue Z, Janowski KM, Cai B, Frey BF, Silberger DJ, Harbour SN, Singer JR, Turner H, Lund FE, Vallance BA, Rosenberg AF, Schoeb TR, Chen JY, Hatton RD, Weaver CT. A nonredundant role for T cell-derived interleukin 22 in antibacterial defense of colonic crypts. *Immunity* 2022; 55: 494-511.e11.
- 165 Rankin LC, Girard-Madoux MJH, Seillet C, Mielke LA, Kerdiles Y, Fenis A, Wieduwild E, Putoczki T, Mondot S, Lantz O, Demon D, Papenfuss AT, Smyth GK, Lamkanfi M, Carotta S, Renaud J-C, Shi W, Carpentier S, Soos T, Arendt C, Ugolini S, Huntington ND, Belz GT, Vivier E. Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. *Nature immunology* 2016; 17: 179–186.
- 166 Sanos SL, Bui VL, Mortha A, Oberle K, Heners C, Johner C, Diefenbach A. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nature immunology* 2009; 10: 83–91.
- 167 Bank U, Deiser K, Plaza-Sirvent C, Osbelt L, Witte A, Knop L, Labrenz R, Jänsch R, Richter F, Biswas A, Zenclussen AC, Vivier E, Romagnani C, Kühl AA, Dunay IR,

- Strowig T, Schmitz I, Schüler T. c-FLIP is crucial for IL-7/IL-15-dependent NKp46+ ILC development and protection from intestinal inflammation in mice. *Nature communications* 2020; 11: 1056.
- 168 Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L, Zauli G, Secchiero P, Manzoli FA, Vitale M. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 2004; 104: 2418–2424.
- 169 Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 2000; 191: 771–780.
- 170 Zenewicz LA. IL-22 Binding Protein (IL-22BP) in the Regulation of IL-22 Biology. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 766586.
- 171 Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, Hedl M, Zhang W, O'Connor W, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Booth CJ, Cho JH, Ouyang W, Abraham C, Flavell RA. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012; 491: 259–263.
- 172 Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K, Tada T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *European journal of immunology* 1980; 10: 175–180.
- 173 Kimura T, Ohta S, Murayama H. Establishment of anti-asialo-GM1 rabbit monoclonal antibodies capable of reducing natural killer cell activity in mice. *PloS one* 2023; 18: e0292514.
- 174 Yang H, Yogeewaran G, Bukowski JF, Welsh RM. Expression of asialo GM1 and other antigens and glycolipids on natural killer cells and spleen leukocytes in virus-infected mice. *Natural immunity and cell growth regulation* 1985; 4: 21–39.
- 175 Hall LJ, Murphy CT, Quinlan A, Hurley G, Shanahan F, Nally K, Melgar S. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal immunology* 2013; 6: 1016–1026.
- 176 Langer V, Vivi E, Regensburger D, Winkler TH, Waldner MJ, Rath T, Schmid B, Skottke L, Lee S, Jeon NL, Wohlfahrt T, Kramer V, Tripal P, Schumann M, Kersting S, Handtrack C, Geppert CI, Suchowski K, Adams RH, Becker C, Ramming A, Naschberger E, Britzen-Laurent N, Stürzl M. IFN- γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. *The Journal of clinical investigation* 2019; 129: 4691–4707.
- 177 Malik A, Sharma D, Aguirre-Gamboa R, McGrath S, Zabala S, Weber C, Jabri B. Epithelial IFN γ signalling and compartmentalized antigen presentation orchestrate gut immunity. *Nature* 2023; 623: 1044–1052.
- 178 Thelemann C, Eren RO, Coutaz M, Bresseit J, Bouzourene H, Rosa M, Duval A, Lavanchy C, Mack V, Mueller C, Reith W, Acha-Orbea H. Interferon- γ induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis. *PloS one* 2014; 9: e86844.
- 179 Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity* 2010; 32: 392–402.
- 180 Muzaki ARBM, Tetlak P, Sheng J, Loh SC, Setiagani YA, Poidinger M, Zolezzi F, Karjalainen K, Ruedl C. Intestinal CD103(+)CD11b(-) dendritic cells restrain colitis via IFN- γ -induced anti-inflammatory response in epithelial cells. *Mucosal immunology* 2016; 9: 336–351.
- 181 Nakanishi Y, Sato T, Takahashi K, Ohteki T. IFN- γ -dependent epigenetic regulation instructs colitogenic monocyte/macrophage lineage differentiation in vivo. *Mucosal immunology* 2018; 11: 871–880.

- 182 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2009; 29: 313–326.
- 183 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* 2003; 3: 133–146.
- 184 Martin-Rodriguez O, Gauthier T, Bonnefoy F, Couturier M, Daoui A, Chagué C, Valmary-Degano S, Gay C, Saas P, Perruche S. Pro-Resolving Factors Released by Macrophages After Efferocytosis Promote Mucosal Wound Healing in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in immunology* 2021; 12: 754475.
- 185 Egea L, McAllister CS, Lakhdari O, Minev I, Shenouda S, Kagnoff MF. GM-CSF produced by nonhematopoietic cells is required for early epithelial cell proliferation and repair of injured colonic mucosa. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 190: 1702–1713.
- 186 Rabizadeh S, Rhee K-J, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, Wu X, Zhang M, Sears CL. Enterotoxigenic bacteroides fragilis: a potential instigator of colitis. *Inflammatory bowel diseases* 2007; 13: 1475–1483.
- 187 Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, Ghia J-E. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *Journal of basic microbiology* 2016; 56: 986–998.
- 188 Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, Schloss PD. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio* 2013; 4: e00692-13.
- 189 Forkel M, van Tol S, Höög C, Michaëlsson J, Almer S, Mjösberg J. Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's & colitis* 2019; 13: 67–78.

Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Rolle c-Flip-abhängiger NKp46-positiver Zellen in der intestinalen Homöostase

im Institut für molekulare und klinische Immunologie

mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Thomas Schüler

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.