

Marco Paparella
Dr. med.

Immunphänotypisierung mononukleärer Zellen des menschlichen Dickdarms unter homöostatischen und entzündlichen Bedingungen

Fach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Meuer

Der menschliche Dickdarm wird Schätzungen zufolge von 10^{14} Bakterien bevölkert. Dieser gewaltigen Antigenlast im Darmlumen stehen Milliarden residenter Immunzellen der *Lamina propria* gegenüber, die eine doppelte Funktion wahrnehmen. Einerseits vermitteln sie die Akzeptanz der physiologischen Darmflora und der nutritiven Antigene, andererseits leisten sie, wenn erforderlich, eine protektive Immunantwort gegen pathogene Keime. Eine Fehlregulation dieser sensiblen Balance kann zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa führen. Die molekularen Mechanismen, die bei der entzündlichen Aktivierung mononukleärer Zellen der *Lamina propria* (*Lamina Propria Mononuclear Cells*, LPMCs) eine Rolle spielen, sind noch weitestgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit soll zu deren Aufklärung durch Charakterisierung des Immunphänotyps aktivierter *versus* ruhender LPMCs beitragen, um neue Zielstrukturen auf aktivierten Zellen zu identifizieren, die diagnostisch oder therapeutisch von Nutzen sein können.

Zur Erreichung dieses Ziels wurden zunächst aktivierte und ruhende LPMCs der menschlichen Dickdarmschleimhaut isoliert. Die Schleimhaut stammte aus gesunden Abschnitten des Darmgewebes von Patienten, die sich einer tumorbedingten Darmoperation unterziehen lassen mussten. Ein Teil der Darmschleimhaut wurde mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) behandelt. Durch EDTA kommt es zur Ablösung der Epithelzellschicht, was einen Entzündungsreiz hervorruft. In einer sich anschließenden 12-stündigen Inkubation der Schleimhaut kam es zur Auswanderung (*Walk-Out*, WO) aktivierter LPMCs (WO-LPMCs) in das Kulturmedium. Der andere Teil der Schleimhaut wurde unmittelbar nach Erhalt des Präparats enzymatisch verdaut. Auf diese Weise konnten ruhende LPMCs isoliert werden. Als weitere Vergleichsgruppe wurden autologe mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) der Patienten über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Die isolierten Zellen wurden anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und mittels polychromatischer Durchflusszytometrie immunphänotypisiert. Hierbei wurden lymphozytäre und myeloide Zellpopulationen charakterisiert und die Expression verschiedener Funktionsmoleküle auf der Oberfläche myeloider Zellpopulationen bestimmt. Für die Färbung und Immunphänotypisierung der Zellen wurden standardisierte Antikörperpanels des *Human Immunophenotyping Consortium* (HIP-C) verwendet. Das Panel zur Charakterisierung myeloider Zellen wurde für diese Studie modifiziert und um eine Reihe spezifischer Fluorochrome gegen intestinale myeloide Zellmarker ergänzt.

Die Immunphänotypisierung entzündlich-aktivierter WO-LPMCs und deren Vergleich mit ruhenden LPMCs und autologen PBMCs wies differentiell exprimierte Antigene in diesen Zellen nach. Auf intestinalen Makrophagen wurden die innatent Antwort-Rezeptoren CD11b, CD14 und CD16 signifikant schwächer exprimiert oder waren nicht nachweisbar. Alle anderen untersuchten Oberflächenmoleküle wurden dagegen in der *Lamina propria* tendenziell stärker exprimiert. Kein anderes untersuchtes Oberflächenmolekül wurde auf aktivierten myeloiden Zellen so stark exprimiert wie der *Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor* (TSLPR), der Rezeptor des Interleukin-7-ähnlichen Zytokins TSLP, dessen Expression insbesondere auf aktivierten Makrophagen und CD33+ mDCs sehr stark zunahm. Auf aktivierten CD33+ und CD33- mDCs wurde der dendritische Zellmarker CD83 stark hochreguliert, zu-

dem zeigten intestinale mDCs eine geringe, aber signifikant erhöhte Expression des Integrins CD103. Auf der Oberfläche aktivierter Makrophagen und dendritischer Zellen kam es zur Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und CD274. Als stabil exprimierter Differenzierungsmarker zur Unterscheidung von Makrophagen und mDCs erwies sich CD64. Des Weiteren konnten in myeloiden Zellen der *Lamina propria* und des peripheren Blutes Lin⁻ CD33⁺ CD123⁺ HLA-DR⁻ Zellen gefunden werden, deren Immunphänotyp dem von myeloiden Suppressorzellen (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*, MDSCs) entspricht. Die häufigsten Zellen in WO-LPMCs waren CD4⁺ T-Zellen, darunter machten CD4⁺ Effektor-T-Gedächtniszellen (*T Effector Memory Cells*, TEM) den größten Anteil aus. In ruhenden LPMCs lag die Zahl an B-Zellen signifikant höher, sie bestanden vorwiegend aus Plasmablasten.

In dieser Studie fand sich eine starke Hochregulation von TSLPR und CD83 auf myeloiden Zellpopulationen aus dem LEL-Modell, das die *in vivo* Entzündungsinitiation widerspiegelt. Eine Assoziation zwischen einer Dysbalance der TSLP-Isoformen und entzündlichen Erkrankungen wie den CED ist vorbeschrieben. Hier zeigt sich nun erstmals eine starke Expression des TSLP-Rezeptors in der akuten intestinalen Entzündung *in vitro*. Ferner sind CD83⁺ reife DCs an der Pathogenese der CED beteiligt und Hinweisen zufolge vermittelt die homotypische Bindung von löslichem CD83 an membranständiges CD83 einen entzündungshemmenden Effekt. Daher erweisen sich sowohl die TSLP-TSLPR-Achse als auch CD83 als aussichtsreiche Zielstrukturen, die in funktionellen Untersuchungen genauer beleuchtet werden müssen. Darüber hinaus wurden hier erstmals MDSCs in der homöostatischen *Lamina propria* nachgewiesen, die sich *in vitro* aktiv am akuten Entzündungsvorgang beteiligen. MDSCs sind mit verschiedenen Tumorerkrankungen assoziiert, während über ihre physiologische Rolle im Darm wenig bekannt ist. Somit liefert diese Arbeit eine Reihe klinisch relevanter Forschungsansätze, denen nachgegangen werden sollte.