

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**REGULATION VON PROTEINEN DES
PROTEASOMS/IMMUNPROTEASOMS BEI DER DIFFERENZIERUNG
VON INTESTINALEN MAKROPHAGEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Monika Christine Seidl

2009

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. JÜRGEN SCHÖLMERICH
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**REGULATION VON PROTEINEN DES
PROTEASOMS/IMMUNPROTEASOMS BEI DER DIFFERENZIERUNG
VON INTESTINALEN MAKROPHAGEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Monika Christine Seidl

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. med. Esther Endlicher

2. Berichterstatter:

PD Dr. med. Stefan Farkas

Tag der mündlichen Prüfung:

08.12.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	I
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem - ein Überblick.....	1
1.2. Die angeborene Immunität als älteste Form des Immunsystems.....	1
1.2.1. Monozyten und Makrophagen.....	2
1.2.1.1. Entstehung von Makrophagen	2
1.2.1.2. Funktionen von Makrophagen	3
1.2.2. Differenzierung intestinaler Makrophagen.....	5
1.3. Das adaptive Immunsystem.....	7
1.3.1. T-Lymphozyten	7
1.3.2. B-Lymphozyten	9
1.4. Die Antigen-Prozessierung	10
1.4.1. Die MHC-Moleküle.....	10
1.4.2. Der MHC Klasse I Antigen-Prozessierungsweg	11
1.5. Das Proteasom	13
1.5.1. Entdeckung des Proteasoms	13
1.5.2. Die Quartärstruktur des eukaryontischen 20S Proteasoms.....	13
1.5.3. Die katalytische Aktivität des Proteasoms	15
1.5.4. Das Zusammenfügen der proteasomalen Untereinheiten.....	16
1.5.5. Spaltung von Proteinsubstraten des Proteasoms	18
1.5.6. Die regulatorischen Komplexe des Proteasoms	19
1.5.7. Das Ubiquitin-Proteasom-System	20
1.5.8. Die Rolle des Proteasoms bei der B- und T-Zell Aktivierung.....	21
1.6. Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen	23
1.6.1. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.....	23
1.6.2. Störung des Gleichgewichts des intestinalen Immunsystems bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	26
1.6.3. Intestinale Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	28
2. Arbeitsziele	30

3. Material	32
3.1. Herkunft von Material und Geräten	32
3.1.1. Chemikalien und Enzyme.....	32
3.1.2. Verbrauchsmaterial.....	33
3.1.3. Geräte.....	33
3.2. Fertigkombinationen von Biochemikalien	34
3.3. Oligonukleotide.....	35
3.3.1. Oligonukleotide für qualitative PCR	35
3.3.2. Oligonukleotide für Real-time PCR	36
3.4. Antikörper.....	36
3.5. Rekombinante Proteine.....	38
3.6. Puffer	38
3.6.1. Lösungen für die Makrophagenisolation	38
3.6.2. Lösung zur Proteingewinnung für den Western Blot	39
3.6.3. Lösungen für den Western Blot.....	39
3.7. DNA-Größenstandard.....	40
3.8. RNA-Größenstandard.....	40
3.9. Protein-Größenstandard für den Western Blot.....	41
4. Methoden	42
4.1. Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen.....	42
4.1.1. Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Resektaten	44
4.1.2. Isolation humaner Monozyten aus peripherem Blut.....	46
4.1.3. Magnetische Zellsortierung	46
4.1.4. Gewinnung und Kultivierung von Monozyten zur Herstellung <i>in vitro</i> - differenzierter Makrophagen.....	48
4.1.5. <i>in vitro</i> Generierung von Makrophagen	49
4.2. Durchflusszytometrie	49
4.3. RNA-Isolation	51
4.4. RNA 6000 Pico Assay	53
4.5. RT-PCR.....	53
4.6. Gene Checker™ Kit	54

4.7. Real-Time-PCR (Taqman®)	55
4.8. Immunhistochemische Färbemethode	58
4.9. Quantitative Messung von Protein	60
4.9.1. Probengewinnung	60
4.9.2. Proteingehaltbestimmung (BCA-Test nach Pierce).....	61
4.9.3. Western Blot	62
4.10. Proteasom-Funktionstest	64
5. Ergebnisse	65
5.1. Aufreinigung von intestinalen humanen Makrophagen	65
5.2. RNA 6000 Pico Assay	67
5.3. Gelelektrophorese mit Gene Checker™ Kit	68
5.4. Quantifizierung der mRNA Expression	69
5.4.1. Quantitative Analyse der mRNA Expression von ATPase 2	72
5.4.2. Quantitative Analyse der mRNA Expression von Subunit beta type 2	75
5.4.3. Quantitative Analyse der mRNA Expression von Subunit beta type 5 ...	78
5.4.4. Quantitative Analyse der mRNA Expression von MECL-1.....	81
5.4.5. Quantitative Analyse der mRNA Expression von LMP7.....	84
5.4.6. Vergleich der beta 2 - und der MECL-1 - Expression.....	87
5.4.7. Vergleich der beta 5 - und der LMP7 - Expression	90
5.5. Quantifizierung der Proteinexpression	94
5.5.1. Nachweis der Proteasomen - Untereinheiten β 2 und MECL-1 (β 2i)	94
5.5.1.1. β 2/MECL-1 - Expression in Kontrollschnitten (A-C)	97
5.5.1.2. β 2/MECL-1 - Expression bei Morbus Crohn (D-F)	97
5.5.1.3. β 2/MECL-1 - Expression bei Colitis ulcerosa (G-I).....	97
5.5.1.4. β 2/MECL-1 - Expression bei Sigmadivertikulitis (J-L)	98
5.5.2. Nachweis der Proteasomen-Untereinheit LMP7 (β 5i)	98
5.5.2.1. LMP7 - Expression in Kontrollschnitten (A-C)	101
5.5.2.2. LMP7 - Expression bei Morbus Crohn (D-F).....	101
5.5.2.3. LMP7 - Expression bei Colitis ulcerosa (G-I).....	101
5.5.2.4. LMP7 - Expression bei Sigmadivertikulitis (J-L).....	102
5.6. Western Blot	102
5.6.1. Expression von ATPase 2	102

5.6.2. Expression von MECL-1	103
5.6.3. Expression von LMP7	105
5.7. Proteasomen - Funktionstest	107
6. Diskussion	109
6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Arbeit.....	109
6.2. Das Proteasom und seine Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen.....	111
6.3. Die physiologische und pathologische Suppression des Proteasoms	112
6.4. Ergebnisse und Konzepte zu CED	113
6.4.1. Ergebnisse der Arbeit im Vergleich mit Konzepten zu Morbus Crohn..	113
6.4.2. Ergebnisse der Arbeit im Vergleich zu Konzepten zu Colitis ulcerosa..	114
6.4.3. Konstitutive vs. INF- γ induzierbare proteasomale Untereinheiten	116
6.5. Die neuen Erkenntnisse.....	116
7. Literaturverzeichnis.....	120
8. Lebenslauf.....	133
9. Danksagung.....	135

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody dependent–cell–mediated cytotoxicity</i> (Antikörper–abhängige Zytotoxizität)
AK	Antikörper
aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinder Serum Albumin)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2´-Desoxy–Nukleosid–5´-Triphosphat
ds	Doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HANK´S, HBBS	<i>Balanced salt solution</i> nach Hank
IL	Interleukin
IMAC	Intestinale Makrophagen
LPMNC	Lamina propria mononuclear cells
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (messenger Ribonukleinsäure)
nt	Nukleotide
PBS	<i>Phosphate buffered salt solution</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE	R-Phycoerythrin
PGN	Peptidoglycan
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
ss	<i>Single strand</i> (Einzelstrang)
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem - ein Überblick

Die Evolution benötigte über 400 Millionen Jahre, um unser Immunsystem als hochdifferenzierten und anpassungsfähigen Abwehrapparat zu entwickeln, das unseren Organismus vor Infektionserregern wie Bakterien, Pilzen, Viren, Parasiten sowie entarteten eigenen Zellen zu schützen versucht.

Ende des 19. Jahrhunderts war es Robert Koch, der mit der Entdeckung des Milzbrand-Erregers, *Bacillus anthracis*, 1876 und des *Mycobacterium tuberculosis* 1882, beweisen konnte, dass bestimmte Krankheiten durch Mikroorganismen ausgelöst werden können.

Das Immunsystem wird in zwei große Teilbereiche gegliedert: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Die angeborene Immunität ist phylogenetisch älter als die erworbene und bildet eine erste Barriere gegen eindringende Pathogene. Zu diesem System gehören neben einer intakten Epidermis mit ihrem Säureschutzmantel und einer intakten Darmmukosa auch verschiedene zelluläre molekulare Mechanismen. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen (natürliche Killer-Zellen) - wobei letztere auch bei der adaptiven Immunität eine Rolle spielen. Zu den Schutzfunktionen auf molekularer Ebene zählen das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie Interleukine und Interferone.

1.2. Die angeborene Immunität als älteste Form des Immunsystems

Das System der angeborenen Immunität wurde zunächst als unspezifisch bezeichnet, weil es so schien, als ob es unabhängig von der Art des Erregers direkt aktiv wird, ohne dass ein vorheriger Kontakt mit ihm vonnöten gewesen wäre. Auf diese Weise ist ein möglichst schneller Wirkungseintritt gewährleistet.

Mittlerweile ist bekannt, dass das unspezifische Immunsystem weit differenzierter arbeitet, als ursprünglich vermutet. Vor allem ist es in der Lage zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ zu unterscheiden. Zudem erkennt es bestimmte Schlüssel-moleküle auf der Oberfläche

von Pathogenen, so genannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns), wie z. B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Mannane sowie Glykane mit Hilfe von invariablen Rezeptoren, den pattern recognition Rezeptoren (PRRs)¹. Ein solcher PRR ist z. B. der Mannose-Rezeptor auf Makrophagen. Er bindet an konservierte Mannose-reiche Kohlehydrate auf Bakterien, wodurch es zur Phagozytose des Pathogens durch den Makrophagen kommt^{2, 3}.

Namensgebend für die Makrophagen (wörtlich „große Fresser“) ist deren Fähigkeit, körperfremdes Material (Bakterien, Pilze) und verändertes körpereigenes Material (Zelltrümmer) zu erkennen und dieses mit Hilfe von Pseudopodien einzuschließen. Einen ähnlichen Selbstverteidigungsmechanismus findet man schon bei den einfachsten höheren Lebensformen. Bei Einzellern erfolgen Gasaustausch, Verdauung und Selbstverteidigung zumindest teilweise durch Phagozytose, die kaum anders als bei den Makrophagen des menschlichen Körpers verläuft.

1.2.1. Monozyten und Makrophagen

1.2.1.1. Entstehung von Makrophagen

Aus pluripotenten Stammzellen des menschlichen Knochenmarks entwickeln sich durch Stimulierung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die unterschiedlichen Blutzellen einschließlich der Monozyten (Hämatopoese, Abb. 1.1). Die Monozyten gelangen nach etwa einem Tag aus dem Knochenmark in die Blutbahn und zirkulieren dort mit einer Halbwertszeit von acht bis siebenzig Stunden. Nach dieser Zwischenstufe des zirkulierenden Blutmonozyten adhären sie an das Endothel der Blutgefäße und können durch Gefäßspalten in das Gewebe einwandern (Diapedese). Im Gewebe differenzieren die Monozyten abhängig vom jeweiligen Mikromilieu zu verschiedenen Makrophagentypen (z.B. gewebetypische intestinale Makrophagen, Alveolarmakrophagen, Osteoklasten in den Knochen, Kupffersche Sternzellen in der Leber, Mikrogliazellen im Gehirn und Makrophagen im gastrointestinal-assoziierten lymphatischen Gewebe, den Peyerschen Plaques). Die Faktoren des Mikromilieus, die zur Vielfalt der Makrophagentypen bzw. zu einer gewebespezifischen Differenzierung führen, sind weitgehend unbekannt⁴. Ausdifferenzierte Makrophagen verbleiben zum Teil mehrere Jahre

lang im Gewebe und sind meist nicht mehr replikationsfähig. Eine Ausnahme sind dabei die Kupffer-Zellen, die ihre Fähigkeit zur Proliferation auch nach ihrer Ausdifferenzierung beibehalten.

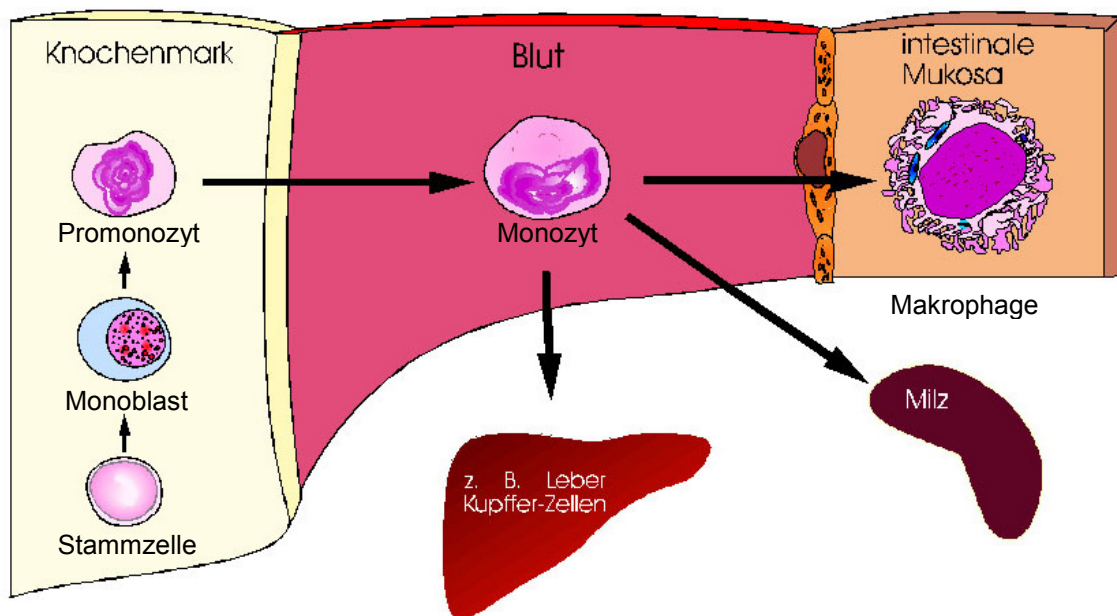


Abb. 1.1: Die Entwicklung der Makrophagen: Aus den Stammzellen im Knochenmark (links) entstehen, über die Zwischenstufe des Monoblasten, die Monozyten. Diese gelangen über die Blutbahn (Mitte) in verschiedene Gewebe. Dort reifen die Monozyten, abhängig vom jeweiligen Mikromilieu, zu verschiedenen Makrophagentypen wie den intestinalen Makrophagen (rechts), den Kupffer-Zellen der Leber (unten) oder den Milzmakrophagen heran.

1.2.1.2. Funktionen von Makrophagen

Makrophagen spielen eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunantwort und der Induktion der spezifischen, adaptiven Immunantwort. Kennzeichen dieser Zellen ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose, Antigenpräsentation, Zytokinsekretion und ihr zytotoxisches Potential (Abb. 1.2).

Bei der Phagozytose schließen Makrophagen körperfremdes Material mit Hilfe von Pseudopodien als Phagosomen in die Zelle ein. Die Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen

zu Phagolysosomen, in denen das körperfremde Material enzymatisch, durch Cathepsine, reaktive Sauerstoffmetaboliten und Stickoxide in kleinere Fragmente zerlegt wird. Die Phagozytose wird durch sogenannte Opsonine, wie Immunglobuline und dem Komplementfaktor C3b, erleichtert. Diese markieren die Oberfläche des körperfremden Materials. Opsonine werden wiederum von Immunglobulin- und C3b-Rezeptoren der Monozyten und Makrophagen erkannt¹.

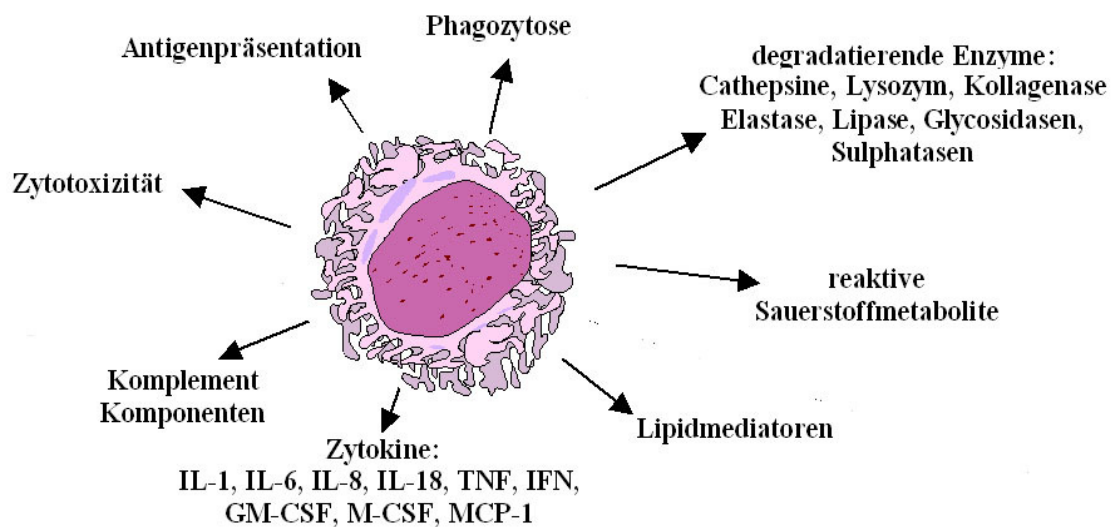


Abb. 1.2: Die Funktionen und Mediatoren von Makrophagen: Aufgeführt sind charakteristische Funktionen von Makrophagen (links), Mediatoren die von Makrophagen sezerniert werden (unten) und Mediatoren die extra- oder intrazellulär degradativ wirken (rechts).

Bei der Antigenpräsentation wird das in den Phagolysosomen zerlegte körperfremde Material an die Zelloberfläche der Makrophagen transportiert. Die Fragmente werden in endosomalen Kompartimenten auf den sogenannten Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major histocompatibility complex, MHC) Klasse II geladen und auf die Oberfläche der Zelle gebracht. So präsentierte Antigene werden von T-Zell-Rezeptoren (T-cell-receptor, TCR) erkannt, was zur Auslösung der spezifischen Immunantwort führt.

Die Zytokinsekretion und die Freisetzung zahlreicher anderer Substanzen ermöglicht es den Makrophagen entscheidend in die Immunantwort einzugreifen und andere Komponenten des Immunsystems zu rekrutieren bzw. in ihrer Funktion zu modulieren. Aktivierte Makrophagen sezernieren Zytokine (z.B. den Tumornekrosefaktor TNF, das Chemokin MCP-1, die

Interleukine IL-1 α , -1 β , -6 und -18). Enzyme (z.B. Lysozym), Komplementfaktoren (C1 bis C5) und Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF). Sie können hochreaktive Sauerstoffverbindungen (z.B. Superoxidanion und Wasserstoffperoxid) bilden, sezernieren und chemotaktisch wirkende Signalproteine absondern, die weitere Phagozyten rekrutieren.

Unter Zytotoxizität versteht man das Potenzial der Makrophagen, Zielzellen abzutöten. Ist die Oberfläche von Zielzellen mit Immunglobulinen besetzt, können diese von Makrophagen mit deren Immunglobulinrezeptoren (Fc γ -Rezeptoren) erkannt werden. Das anschließende Abtöten der Zielzelle wird als Antikörperabhängige Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) bezeichnet⁵. Ein anderer Mechanismus der Zytotoxizität von Makrophagen ist die Sekretion zytotoxischer Substanzen (z.B. TNF, reaktive Sauerstoffverbindungen), deren Freisetzung zur Lyse der angegriffenen Zellen führt⁶.

1.2.2. Differenzierung intestinaler Makrophagen

Intestinale Makrophagen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose, Keimabtötung, Antigenpräsentation und Sekretion von immun- bzw. entzündungsmodulierenden Zytokinen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fremdanitgenen und Keimen des Darmlumens. Sie stellen eine erste Barriere des Immunsystems an der größten Oberfläche und gleichzeitig größten Kontaktstelle zur höchsten Antigenkonzentration des Körpers dar. Insgesamt sind ca. 10-20% der mononukleären Zellen des Darms Makrophagen (Abb. 1.3) und repräsentieren somit eine der größten Makrophagen-Populationen des menschlichen Körpers. Phänotypisch und funktionell stellen sie eine heterogene Population dar.

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist an Änderungen in der Morphologie und in der Antigenexpression der Zellen erkennbar. Makrophagen sind im Vergleich zu Monozyten um ein Vielfaches größer. Sie bilden im Gegensatz zu den relativ runden Monozyten Pseudopodien aus, die für die Fortbewegung im Gewebe entscheidend sind und die Phagozytose unterstützen. Eine Differenzierung von humanen Blutmonozyten ist auch *in vitro* bei Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen mit humanem Serum zu erreichen. *In vitro* differenzierte Makrophagen und Monozyten zeigen ein von intestinalen Makrophagen deutlich unterscheidbares Expressionsmuster der Oberflächenantigene⁷.

Monozyten exprimieren auf der Zelloberfläche ein charakteristisches Muster von Antigenen. Das klassische Monozyten-Oberflächen-Antigen, der Lipopolysaccharid (LPS)-

Rezeptor (CD14) ist aufgrund seiner spezifischen Expression für die Identifizierung von Monozyten von großer Bedeutung⁸. Zudem ist auf der Zellmembran von Monozyten der Fc γ III-Rezeptor (CD16), der Rezeptor für die Komplement-Komponente C3b (CD11b) und das zur Induktion einer T-Zellantwort bei der Immunreaktion notwendige T-Zell co-stimulierende Molekül B7.2 (CD68) nachweisbar. In vitro differenzierte Makrophagen exprimieren wie Monozyten den LPS-Rezeptor, zeigen aber eine stärkere Expression von CD16⁹.

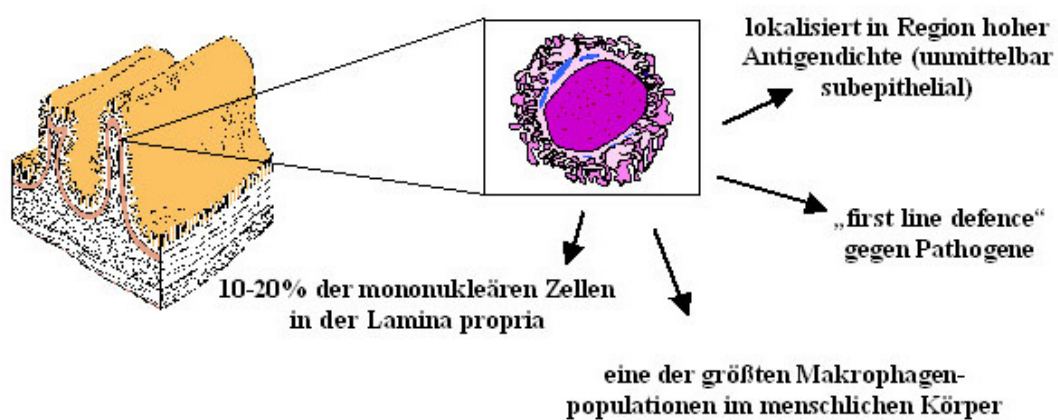


Abb.1.3: Stellung und Funktion der intestinalen Makrophagen im menschlichen Körper: Dargestellt sind einige Schleimhautfalten des Dickdarms (links) und ein Makrophage (vergrößert) aus der Lamina propria.

Im Gegensatz dazu lassen sich intestinale Makrophagen deutlich von Monozyten und in vitro-differenzierten Makrophagen unterscheiden. Intestinale Makrophagen exprimieren weder den LPS-Rezeptor¹⁰ noch den Fc γ -Rezeptor¹¹. CD11b ist auf weniger als 5% der Makrophagen aus intestinalem Gewebe nachweisbar¹². Des weiteren exprimieren intestinale Makrophagen nicht die toll-like-Rezeptoren 2 und 4, welche als PRRs ebenfalls bei der Erkennung pathogener Strukturen, wie Lipoproteine und LPS, eine Rolle spielen¹³. Auch Effektormoleküle wie Cathepsin D und die NADPH Oxidase werden von intestinalen Makrophagen nicht exprimiert^{14, 15}. Dies verdeutlicht, dass Makrophagen in Abhängigkeit vom Mikromilieu des Darms eine sehr spezifische Differenzierung durchlaufen, die bisher in vitro nur mittels des Sphäroid-Modells induziert werden konnte. Möglicherweise sind mit dieser Differenzierung spezifische Funktionen für das intestinale Immunsystem verbunden. Die Expression von

Oberflächenmolekülen wie CD14 oder den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 entscheidet z.B. darüber, wie reaktionsfähig Makrophagen sein können und in welchem Ausmaß sie eine T-Zellexpansion induzieren können.

Diese Daten deuten auf einen anergen IMAC-Typ in der normalen Mukosa hin. Die IMAC Funktionen sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden. Bessere Kenntnisse über die spezifischen immunmodulatorischen Funktionen der normalen IMAC-Population würden gezieltere Interventionen bei Entzündungen zur Wiederherstellung des normalen Phänotyps erlauben.

1.3. Das adaptive Immunsystem

Die spezifische Immunität lässt sich in eine zellulär vermittelte und eine humorale Abwehr unterteilen. Die Aktivierung beider Systeme wird durch zu den an der Zelloberfläche sitzenden Rezeptoren passende Antigene ausgelöst, wodurch es zu einer klonalen Expansion kommt. Die Aufgaben der zellulären Komponente übernehmen T-Lymphozyten, die der humoralen Komponente B-Lymphozyten.

1.3.1. T-Lymphozyten

Unreife T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus um dort auszudifferenzieren. Die T-Zell-Vorläufer entwickeln sich entweder zu einem $\alpha:\beta$ -Typ oder einem $\gamma:\delta$ -Typ, die sich in ihrem heterodimeren membranständigen T-Zell-Rezeptor unterscheiden.

Über die $\gamma:\delta$ -T-Zellen ist bis heute nur wenig bekannt. Unter anderem weiß man, dass sie in lymphoidem und interepithelialelem Gewebe zu finden sind und Liganden wie Hitzeschockproteine, fehlerhafte MHC-Moleküle, Nukleotide und Phospholipide erkennen¹⁶.

Aufgabe der $\alpha:\beta$ -T-Zellen ist es, körpereigene MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) über ihren T-Zell-Rezeptor zu erkennen und dabei tolerant gegenüber MHC-gebundenen körpereigenen Peptiden zu sein. Um dies zu erreichen werden die T-Zellen im Thymus selektioniert. Im Kortex des Thymus findet die positive Selektion statt,

d.h. nur wenn die T-Zellen körpereigene MHC-Moleküle erkennen, wandern sie weiter in die Medulla, wo die negative Selektion stattfindet. Falls die Zellen auf körpereigene Peptide reagieren, werden sie durch Apoptose (programmierter Zelltod) eliminiert, um eine autoimmunologische Reaktion im Körper zu verhindern. Falls nicht, verlassen sie als reife, naive $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen den Thymus.

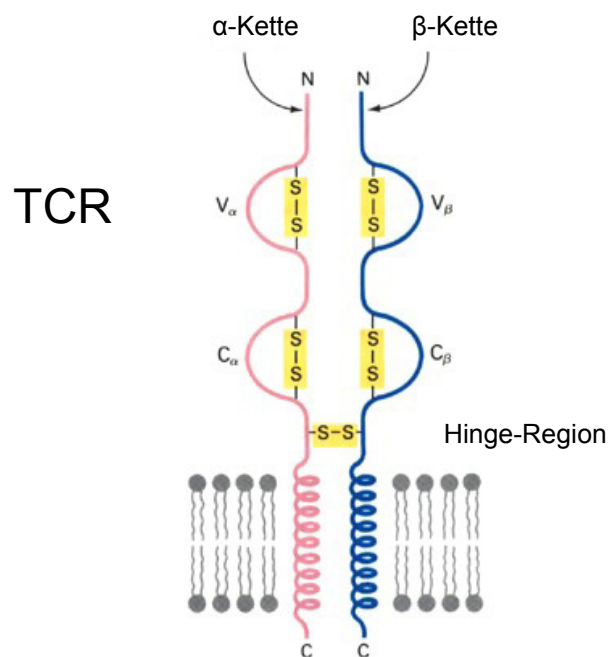


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines α : β -T-Zell-Rezeptors. Sowohl die α -Kette als auch die β -Kette besitzen eine Transmembrandomäne, die Faltung wird durch Disulfidbrücken erreicht¹⁷.

Zu den $CD4^+$ -Zellen gehören T_H1 - und T_H2 -Zellen, wobei es auf das Zytokinmilieu zum Zeitpunkt der Antigenerkennung ankommt, zu welchem Subtyp sich eine $CD4^+$ -Zelle entwickelt. $INF-\gamma$ und $IL-12$ bewirken vor allem eine Entwicklung zur T_H1 -Zelle, $IL-4$ bewirkt eine T_H2 -Differenzierung. Der Unterschied zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen beruht auf ihrem Zytokinprofil, wobei T_H1 -Zellen vor allem $INF-\gamma$ produzieren und über $CD40L$ und weitere Zytokine Makrophagen aktivieren (zelluläre Immunität). T_H2 -Zellen sind für die Aktivierung der humoralen Immunantwort durch eine Produktion von $IL-4$ und $IL-5$ verantwortlich.

$CD8^+$ -T-Zellen eliminieren als zytotoxische Zellen virusinfizierte und entartete Zellen mittels Perforinen, die Löcher in der Zellmembran der Zielzelle hervorrufen und mittels Granzymen, die als Proteasen Proteine in der Zielzelle degradieren und Apoptose induzieren.

α : β -T-Zellen zirkulieren im Blut und den peripheren lymphatischen Organen. Wird in den Lymphknoten mittels des T-Zell-Rezeptors (TCR) ein spezifisches Antigen detektiert, das von einer Antigen-präsentierenden-Zelle (APC) präsentiert wird, und ist gleichzeitig ein kostimulatorisches Signal vorhanden, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle (Priming). $CD8^+$ -T-Zellen erkennen Antigene, die an ein MHC Klasse I - Molekül gekoppelt sind, $CD4^+$ -Zellen benötigen MHC Klasse II - gekoppelte Peptide.

Für das Priming erforderlich sind zum einen die spezifische Antigenerkennung der T-Zelle über ihren TCR, zum anderen ein kostimulatorisches Signal, das nur von der jeweiligen APC gegeben werden kann. Die Kostimulation wird über eine Interaktion von CD28 auf der T-Zelle und den B7-Molekülen (B7.1 = CD80, B7.2 = CD86) auf der APC vermittelt. Eine Hochregulation der beiden Signalmoleküle CD40L (T-Zelle) und CD40 (APC) führt zu einem weiteren Anstieg der B7- und MHC-Moleküle.

Die Entwicklung bis zur Effektorzelle dauert vier bis fünf Tage. Für die Differenzierung von naiven $CD8^+$ -T-Zellen in zytotoxische T-Zellen ist zusätzlich eine indirekte Stimulation durch T_H1 -Zellen notwendig. Nur wenn diese gleichzeitig durch eine CD40/CD40L Interaktion an die APC binden, können die $CD8^+$ -T-Zellen geprimt werden. Einmal geprimt, ist keine weitere Kostimulation nötig und jedes Zusammentreffen mit einem auf MHC gebundenen Antigen führt zu einer Immunantwort.

Die Antigenerkennung einer naiven T-Zelle ohne Kostimulation führt hingegen zur T-Zell-Toleranz, d.h. die T-Zellen werden anerg. Sie produzieren kein IL-2 und es kommt nicht zur Proliferation und Differenzierung in eine Effektorzelle. Dieser Mechanismus stellt einen zusätzlichen Schutz vor einer Immunantwort gegen Selbst-Antigene dar.

1.3.2. B-Lymphozyten

Aufgabe der B-Lymphozyten ist die Produktion von Antikörpern, die nach einer spezifischen Bindung von Antigenen an membranständige Immunglobuline induziert wird. Dieser Antigen-Ig-Komplex wird in die Zelle aufgenommen, wo der Abbau in Peptidfragmente erfolgt, die dann auf MHC Klasse II - Moleküle geladen werden. Der MHC-Komplex wird dann wiederum an die Zelloberfläche transportiert, wo die Peptide den T-Helfer-Zellen präsentiert werden. Über eine Bindung des CD40-Liganden der T-Helfer-Zellen an das membranständige CD40 der B-Zelle kommt es zu einer Stimulation der T-Zelle, die daraufhin vermehrt IL-4 produziert

und so eine Proliferation und Differenzierung der B-Zelle bewirkt. Dieser Prozess wird auch Priming genannt.

Die ausdifferenzierte B-Zelle, jetzt Plasmazelle genannt, sezerniert nun spezifische lösliche Immunglobuline, welche die Aufgabe haben, den Fremdkörper zu neutralisieren und zu opsonisieren, was es den Makrophagen ermöglicht, das Antigen zu phagozytieren. Des Weiteren können Antikörper das Komplementsystem aktivieren.

1.4. Die Antigen-Prozessierung

1.4.1. Die MHC-Moleküle

MHC-Moleküle werden dazu benötigt, Antigene an der Zelloberfläche den T-Zellen zu präsentieren. Dafür ist zunächst eine Antigen-Prozessierung nötig, d. h. ein körperfremdes Protein muss zunächst in Peptid-Fragmente zerlegt werden, bevor es an ein MHC-Molekül gebunden und an der Zelloberfläche angeboten werden kann. Eine Antigen-Prozessierung findet vor allem in B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen sowie den dendritischen Zellen des Lymphgewebes statt, im Rahmen von Entzündungsreaktionen kommt es aber durchaus auch auf anderen Zellen zu einer Antigenpräsentation mittels MHC-Molekülen.

Man unterscheidet MHC Klasse I von MHC Klasse II - Molekülen. MHC Klasse II - Moleküle präsentieren hauptsächlich Antigene, die von einer der o.g. Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) aus dem Extrazellulärraum phagozytiert wurden (z.B. bakterielle Proteine, Proteine von Pilzen), MHC Klasse I - Moleküle präsentieren Antigene, die in der Zelle selbst entstanden sind, wie z.B. virale oder tumorspezifische Proteine.

Der MHC I - Komplex besteht aus zwei Polypeptidketten: der größeren α -Kette, einem Transmembranprotein, und der kleineren β 2-Mikroglobulin-Kette. Die α 3-Domäne und das β 2-Mikroglobulin stellen gemeinsam eine den Immunglobulinen ähnliche Struktur dar. Die 8 - 10 Aminosäuren langen Peptide binden in einer Tasche, die von den α 1- und α 2-Domänen gebildet wird^{18,19}.

Die MHC-Klasse II - Moleküle bestehen aus zwei Transmembran-Glycoproteinketten (α und β). Jede Kette besteht aus zwei Domänen, wobei die Domänen α 1 und β 1 den peptidbindenden Spalt bilden (Abb. 1.4). Beide MHC-Komplexe sind ohne gebundenes Peptid instabil.^{20,21,22}

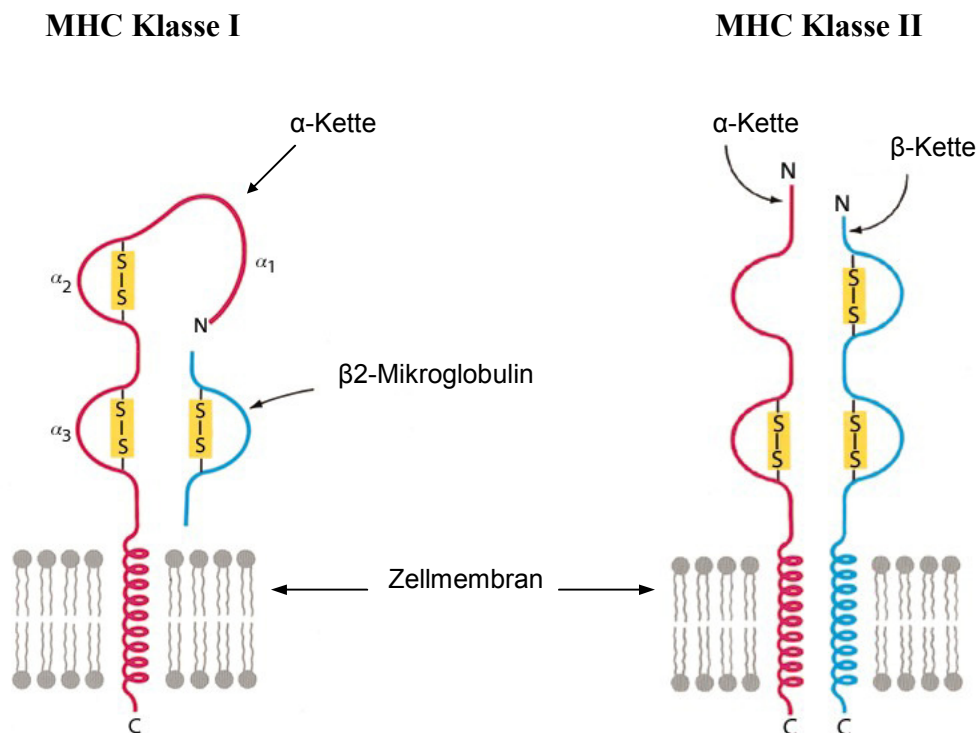


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der MHC Klasse I und II - Moleküle. Der MHC Klasse I - Komplex besteht aus einem monomeren integralen Membranprotein, der α -Kette, mit dem nicht-kovalent angelagerten β 2-Mikroglobulin, MHC Klasse II ist ein symmetrisches Heterodimer aus einer α - und β -Kette²³.

Im Folgenden soll nur auf den Antigenprozessierungsweg der MHC Klasse I - Moleküle genauer eingegangen werden, da nur hier das Proteasom zur Degradierung der Peptidfragmente zum Einsatz kommt. Die Peptide, die über die MHC Klasse II - Moleküle präsentiert werden, werden Rezeptor-vermittelt von Antigen-präsentierenden-Zellen aufgenommen und im Phagolysosom zu Peptiden fragmentiert.

1.4.2. Der MHC Klasse I Antigen-Prozessierungsweg

Peptide, die an MHC Klasse I - Moleküle gebunden werden, entstammen Proteinen, die im Zytosol zu Peptiden degradiert werden. Das Proteasom, ein multikatalytischer Enzymkomplex, dessen genaue Funktion noch beschrieben wird, ist hauptsächlich für die Spaltung der zu eliminierenden Proteine verantwortlich. Dazu zählen zum einen gealterte Proteine, zum anderen fehlerhaft neu synthetisierte Proteine.

Die im Proteasom degradierten Proteine werden mit Hilfe des TAP-Transportkomplexes ins endoplasmatische Retikulum (ER) befördert. Der TAP-Transporter ist ein Heterodimer, das ebenfalls in der MHC-Region kodiert ist. Der TAP-Transporter bindet im humanen System bevorzugt Peptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren, wobei Peptide mit basischen oder hydrophoben Aminosäure-Resten am Carboxylende bevorzugt werden²⁴. Darin spiegeln sich die Kriterien der MHC Klasse I - Peptide wieder.

Da MHC - Moleküle ohne gebundenes Peptid instabil sind, werden neusynthetisierte MHC Klasse I- α -Ketten an das Chaperon Calnexin gebunden und liegen so in einem partiell gefalteten Zustand im Endoplasmatischen Retikulum vor. Sobald das β 2-Mikroglobulin angelagert wird dissoziiert das entstandene Heterodimer vom Calnexin ab. Die MHC I - Einheit lagert sich dann an einen aus Calreticulin und Tapasin bestehenden Proteinkomplex an, bis eines der eingeschleusten Peptide bindet. Dann wird ein vollständig gefalteter, stabiler MHC I - Peptid - Komplex über ein Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche transportiert, wo es sich mit dem Sarkolemm vereinigt (Abb.1.5).

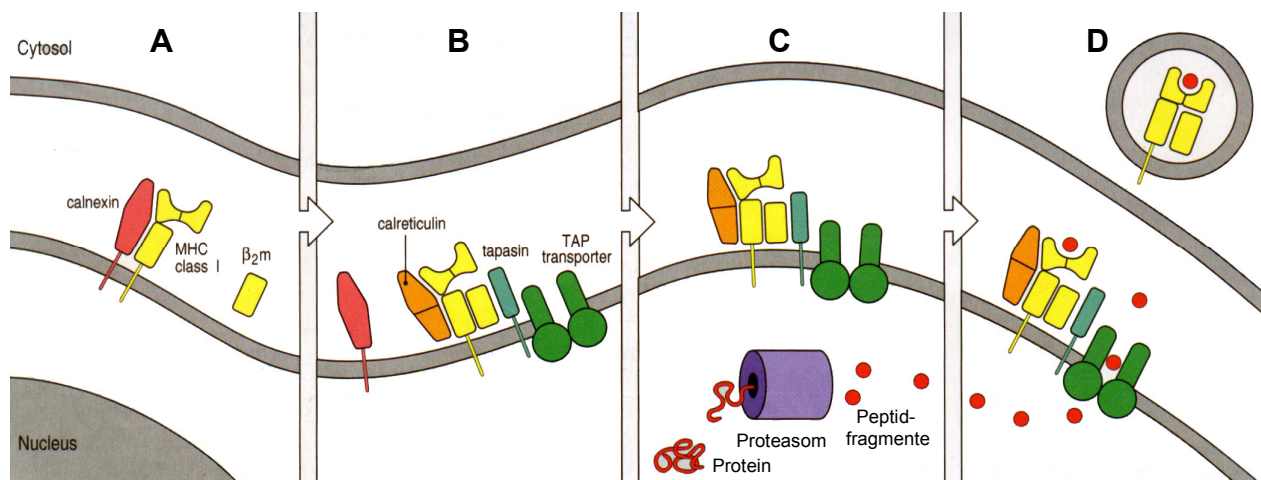


Abb. 1.5: Beladung von MHC Klasse I mit Peptiden im Endoplasmatischen Retikulum (ER): partiell gefaltete MHC I α -Ketten binden an Calnexin bis β 2-Mikroglobulin bindet (A). Der vollständige MHC I - Komplex löst sich von Calnexin, bindet einen Komplex von Chaperonproteinen (Calreticulin) und über Tapasin an TAP (B). Cytosolische Proteine werden durch das Proteasom zu Peptidfragmenten abgebaut (C). TAP schleust ein Peptid ins ER, dieses bindet an MHC I, wodurch die Faltung beendet wird. Das fertig gefaltete MHC I - Molekül löst sich vom TAP-Komplex und wird an die Zelloberfläche transportiert (D).²⁵

1.5. Das Proteasom

1.5.1. Entdeckung des Proteasoms

Das Proteasom ist der Enzymkomplex, der den Hauptanteil der Proteindegradation leistet. Es ist am Abbau von falsch transkribierten und fehlerhaft gefalteten Proteinen ebenso beteiligt wie an der Degradation oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Es greift in die Kontrolle des Zellzyklus ein, nimmt Einfluss auf die Zelldifferenzierung und den Stoffwechsel und spielt eine wichtige Rolle in der MHC Klasse I vermittelten Immunantwort.

1968 konnte Harris erstmals das Proteasom als zylinderförmige Struktur mit einer Länge von ca. 15 nm und einem Durchmesser von ca. 11 nm elektronenmikroskopisch darstellen. Der genauen Aufbau des Proteasoms mit seinen vier aufeinander gestapelten heptamerischen Ringen, die eine fassartige Struktur mit einem Hohlraum bilden, wurde jedoch erst von Groll et al. 1997 geklärt, indem er Röntgenstrukturanalysen des 20S Proteasoms aus der Hefe *Saccharomyces cerviciae* durchführte²⁶.

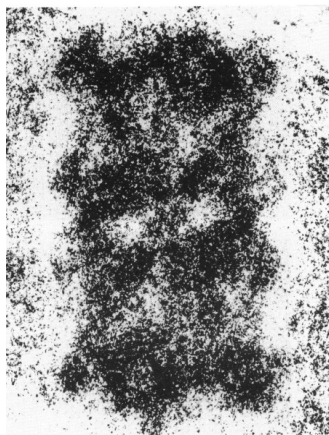


Abb. 1.6: Elektronenmikroskopisches Bild eines 20S Proteasoms aus einer Rattenleber, Vergrößerung 100 000x (nach Djaballah²⁷).

1.5.2. Die Quartärstruktur des eukaryontischen 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom ist bereits in Bakterien und Einzellern zu finden. Seine gesamte molekulare Masse beträgt insgesamt ca. 700 kDa wobei die einzelnen Untereinheiten

molekulare Massen zwischen 21 und 34 kDa aufweisen. Die proteolytische Aktivität ist im Inneren des Proteinzylinders lokalisiert, was verhindert, dass das Proteasom unspezifisch in der Zelle Proteine degradiert.

Der Proteasomen - Zylinder wird durch vier aufeinandergeschichtete Ringe gebildet, von denen jeder sieben Untereinheiten enthält. In Eukaryonten werden die äußeren Ringe durch sieben unterschiedliche alpha-Einheiten, die beiden inneren Ringe durch sieben verschiedene beta-Untereinheiten gebildet.

Die jeweilige Primärstruktur der Untereinheit entscheidet, ob sie dem alpha- oder beta-Typ zugeordnet wird. Die alpha-Untereinheiten bilden an ihrem N-Terminus als Sekundärstruktur α -Helices aus, die den durch die alpha-Ringe gebildeten Eingang ins Innere des Proteasomen-Zylinders verschliessen, und gefalteten Proteinen topologisch den Zugang zum katalytischen Zentrum verwehren, wenn der Kernpartikel in einem inaktiven, latenten Zustand vorliegt.

Die N-terminalen proteolytisch aktiven Domänen der beta-Ringe befinden sich auf deren Innenseite, die C-Termini, die nicht mit der Proteasomenstruktur selbst oder der Peptidspaltung an sich zu interferieren scheinen, befinden sich auf der Außenseite²⁸.

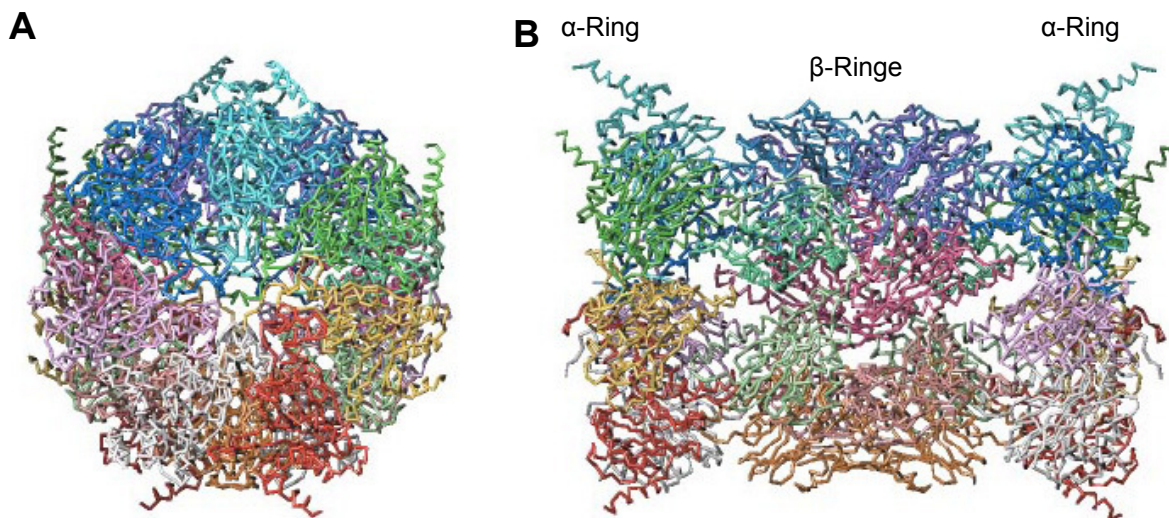


Abb 1.7: Kristallographie des 20S Proteasoms in boviner Leber in Aufsicht (A) und in Seitenansicht (B). (Institute for Protein Research, Osaka University - Laboratory of Protein Crystallography²⁹)

1.5.3. Die katalytische Aktivität des Proteasoms

Das 20S Proteasom besteht insgesamt aus 28 Untereinheiten. Die sieben Einheiten der äußeren Ringe $\alpha_1 - \alpha_7$ besitzen keine katalytische Aktivität, von den sieben Untereinheiten $\beta_1 - \beta_7$ besitzen nach heutiger Kenntnis mindestens drei katalytisches Potential: β_1 , β_2 und β_5 , die Chymotrypsin-like (ChTL), Trypsin-like (TL) und Post-glutamyl-Peptid-hydrolysierend (PGPH) genannt werden, da sie Peptide nach hydrophoben, basischen bzw. sauren Aminosäuren spalten³⁰. Durch einen bisher nicht verstandenen Mechanismus werden im Proteasom v.a. Peptidfragmente von sieben bis neun Aminosäuren erzeugt. Diese Peptide können über MHC Klasse I Moleküle als Antigen präsentiert werden.

Nach der Stimulation eukaryontischer Zellen mit $\text{INF-}\gamma$ oder $\text{TNF-}\alpha$ wird die Transkription dreier neuer enzymatisch aktiver Untereinheiten, beta1i (LMP2), beta2i (MECL-1) und beta5i (LMP7), induziert, die ihre Homologe im Proteasom ersetzen (Abb. 1.8). Dieses Proteasom wird dann Immunproteasom genannt. Es befindet sich vor allem in Nähe des endoplasmatischen Retikulums. Somit zeigt sich, dass sich die Wirkung von $\text{INF-}\gamma$ nicht nur auf den Austausch der proteasomalen Untereinheiten beschränkt, sondern auch in größerem Umfang eine Steigerung der Antigenpräsentation über MHC Klasse I - Moleküle bewirkt, was eine Verstärkung der Immunreaktion bewirkt.

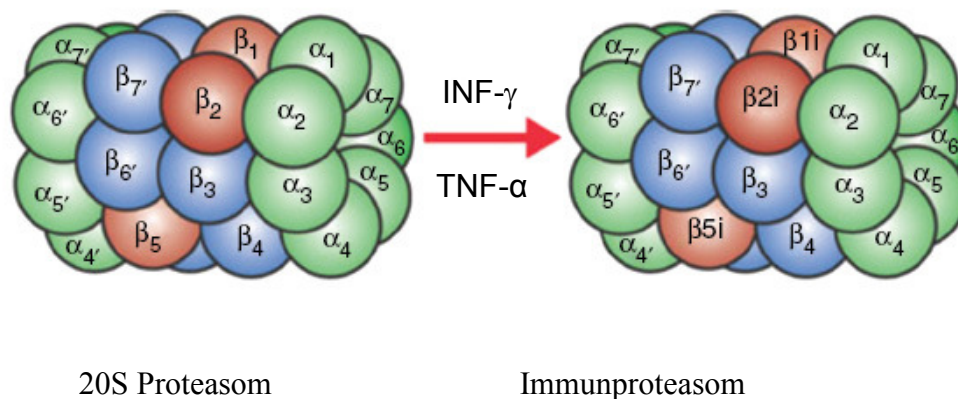


Abb. 1.8: Die Neusynthese des Immunproteasoms. Die Untereinheiten beta 1i (LMP2), beta 2i (MECL-1) und beta 5i (LMP7) (i bedeutet Immunantwort) werden unter dem Einfluß von Zytokinen wie Interferon γ und TNF gebildet und ersetzen den Platz ihrer Homologe beta 1, beta2 und beta5 bei der. Die Untereinheiten werden hierbei nicht ausgetauscht sondern der ganze Proteasomenkomplex wird neu synthetisiert wobei die $\text{INF-}\gamma$ induzierten Untereinheiten bevorzugt eingebaut werden³¹.

1.5.4. Das Zusammenfügen der proteasomalen Untereinheiten

Das Zusammenfügen der proteasomalen Untereinheiten ist ein langsamer Prozess, an dem nachweisbar Intermediärkomplexe mit Halbwertszeiten von mehreren Stunden beteiligt sind. Dieses „Präproteasom“ besteht aus einem kompletten α -Ring und einem β -Ring aus verschiedenen Vorläufern von β -Untereinheiten³². Die α - Untereinheiten scheinen eine essentielle Rolle beim Aufbau des Proteasoms zu spielen. Versuche mit Proteasomen des Bakteriums *Thermoplasma acidophilum* haben gezeigt, dass sie eine besondere Affinität füreinander besitzen und sich spontan aneinanderlagern³³. Dieser Schritt wird von der Inkorporation der Untereinheiten prä-beta 2, beta 3, beta 4 bzw. prä-beta 1i und prä-beta 2i gefolgt an die wiederum etwas später in einem zweiten Schritt die restlichen beta-Untereinheiten prä-beta 1, beta 5 bzw. prä-beta 5i, prä-beta 6 und beta 7 binden³⁴. Mit der relativ frühen Inkorporation von beta 1i unterscheidet sich das Immunproteasom interessanterweise vom konstitutiven Proteasom mit seinem späten Einbau von beta 1³⁵. Weiterhin wurde vor einigen Jahren das Protein Proteasemblin entdeckt, eine Komponente des Präproteasoms, das sowohl beim Aufbau des konstitutiven als auch des Immun-Proteasoms benötigt wird³⁶. Komplettiert wird der Aufbau des Proteasoms durch Gegenüberstellung von zwei Präproteasomen mit der Oberfläche ihrer beta-Ringe zueinander, wahrscheinlich unter Führung des Proteasemblins³⁷, der autolytischen Abspaltung der N-terminalen Propeptide der beta-Untereinheiten und der Degradation des Proteasemblins. Die als Zymogene synthetisierten beta-Einheiten mit proteolytischer Aktivität (beta 1, 2 und 5) gehören zur Familie der N-terminalen nukleophilen (Ntn) Proteinfamilie. Durch die autokatalytische Abspaltung der Propeptide nach abgeschlossener Assemblierung des Proteasoms bleiben Threoninreste als N-terminale Nukleophile im inneren des Proteasoms zurück und sorgen durch ihren nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppen von Peptidbindungen für die Spaltung von Proteinsubstraten³⁸. Sie sind also erst zugänglich, wenn sie durch die proteasomale Zylinderstruktur vom Cytosol getrennt sind wodurch eine unspezifische Degradierung von Proteinen verhindert wird.

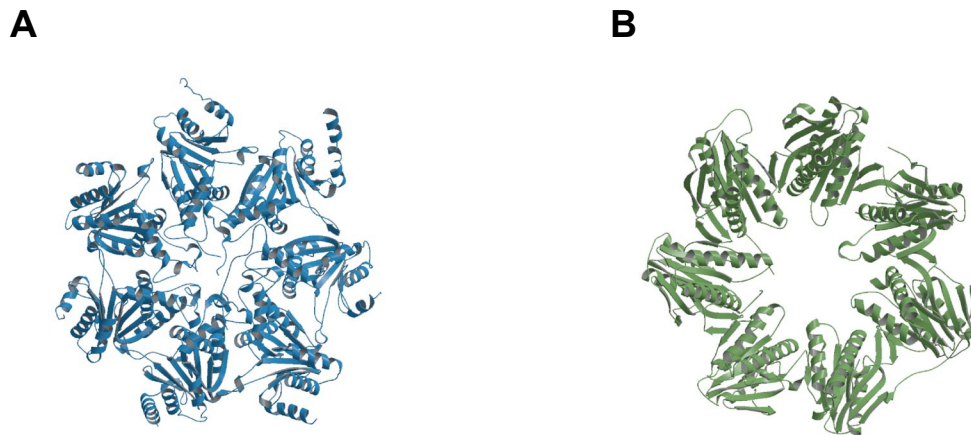


Abb. 1.9: Kristallographie eines alpha-Rings (A) und eines beta-Rings (B) eines 20S Proteasoms mit ihren jeweils sieben Untereinheiten. (Institute for Protein Research, Osaka University - Laboratory of Protein Crystallography³⁹)

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Aufbau von Immunproteasomen selbst beim Überwiegen von konstitutiven Untereinheiten bevorzugt wird⁴⁰. Es wurde beobachtet, dass LMP2 (beta 1i) für die Inkorporation von MECL-1 (beta 2i) benötigt wird und dass LMP7 (beta 5i) bevorzugt in Proteasomen integriert wird, die bereits LMP2 und MECL-1 enthalten. LMP7 selbst scheint jedoch die wichtigste Rolle beim Aufbau des Immunproteasoms zu spielen. Liegt ein LMP7 Mangel in der Zelle vor kommt es zu einer unzureichenden Bildung von Proteasomen, auch wenn alle anderen Untereinheiten in ausreichender Menge gebildet werden. Zudem weisen die Präproteasomen solcher Zellen eine längere Halbwertszeit auf⁴¹.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Nomenklatur der verschiedenen Untereinheiten des 20S Kerns.

Nomenklatur der 20S Proteasom-Untereinheiten			
Name	Alternative Bezeichnung in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alternative Bezeichnung in Säugern	Genname in Säugern
alpha1	C7, PRS2, ScII	iota, PROS27	PSMA6
alpha2	Y7, PRE8	C3	PSMA2
alpha3	Y13, PRE9	C9	PSMA4
alpha4	PRE6	C6, XAPC7	PSMA7
alpha5	PUP2, DOA5	Zeta	PSMA5
alpha6	PRE5	C2, PROS30	PSMA1
alpha7	C1, PRE10, PRS1	C8	PSMA3
beta1	PRE3	Y, LMPY, Delta	PSMB6
beta1i		LMP2, RING12	PSMB9
beta2	PUP1	Z, MC14	PSMB7
beta2i		MECL1	PSMB10
beta3	PUP3	C10-II, Theta	PSMB3
beta4	C11, PRE1	C7-I	PSMB2
beta5	PRE2, DOA3	X, LMPX, MB1, Epsilon	PSMB5
beta5i		LMP7, RING10, Y2, C13	PSMB8
beta6	C5, PRE7, PRS3	C5	PSMB1
beta7	PRE4	N3, Beta	PSMB4

Abb. 1.10: Überblick über die Nomenklatur der Untereinheiten des 20S Proteasoms.

1.5.5. Spaltung von Proteinsubstraten des Proteasoms

Das Proteasom stellt eine multikatalytische Protease dar, deren insgesamt sechs proteolytische Zentren unterschiedliche Spaltstellen bevorzugen. Durch Einschleusung fluorogener Peptidsubstrate konnten den katalytischen Untereinheiten charakteristische proteolytische Aktivitäten zugeordnet werden. $\beta 1$ zeigt Caspase-ähnliche Aktivität da sie hauptsächlich Substrate mit sauren Aminosäuren spaltet. Die Untereinheit $\beta 2$ spaltet vor allem C-terminal nach basischen Aminosäuren und zeigt damit Trypsin-ähnliche Aktivität wohingegen die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität von $\beta 5$ auf der Hydrolyse nach hydrophoben Aminosäuren beruht⁴². In vivo jedoch lässt sich diese strikte Zuteilung von Schnittpräferenzen nicht mehr aufrechterhalten, jedoch gilt prinzipiell, dass konstitutive Proteasomen Peptide nach basischen, sauren und hydrophoben Aminosäuren favorisiert spalten. Die proteolytischen Zentren beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Aktivität⁴³.

Beim Immunproteasom führt der Austausch der genannten beta-Untereinheiten zu einer bevorzugten Spaltung von Proteinen nach hydrophoben und basischen Aminosäuren und einem

Rückgang der Spaltung nach sauren Aminosäuren⁴⁴. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der o.g. bekannten Bevorzugung des TAP-Transporters von Peptiden mit hydrophoben und basischen Aminosäuren am C-Terminus.

1.5.6. Die regulatorischen Komplexe des Proteasoms

Das 20S Proteasom kann nur ungefaltete nicht ubiquitinylierte Proteine oder Peptide über einen ATP-unabhängigen Prozess degradieren. Die meisten Proteasomen in eukaryontischen Zellen existieren in einer 26S Form, die sich aus dem 20S Proteasom und zwei regulatorischen 19S Komplexen, die sich an die α -Ringe anlagern, den sog. Kappen oder PA700-Aktivatoren zusammensetzt. Man unterteilt den 19S-Regulator in zwei Komponenten, die aus mehreren Untereinheiten bestehen: die Basis (base) und den Deckel (lid). Der Basiskomplex setzt sich aus zwei hochmolekularen Proteinen, Rpn1 und Rpn2, und einem Ring aus sechs ATPasen, Rpt1 bis Rpt6, zusammen. Der Ring mit den sechs ATPasen aus der Tripel - A - Familie lagert sich in Gegenwart von ATP an den α -Ring des 20S Kerns an⁴⁵. Die ATPasen des 19S Regulators besitzen eine „reverse Chaperon-ähnliche Aktivität“, da sie Substrate entfalten, um sie durch die α -Ringe zum katalytischen Zentrum des Kerns zu führen.

Die anderen acht Nicht-ATPase-Untereinheiten des 19S-Regulators formen den Deckel, dessen genaue Funktionen nur teilweise verstanden wurden⁴⁶. Das 26S Proteasom ist in der Lage intakte, ubiquitinylierte Proteine zu degradieren und wird im Nukleus ebenso wie Zytoplasma gefunden. Es ist für etwa 70-90% der zellulären Proteindegradation verantwortlich.

Neben der Bindung von zwei 19S Einheiten kann das 20S Proteasom auch 11S Regulatoren binden. Die 11S Einheit wird durch INF- γ induziert⁴⁷ und scheint besonders an die beiden Enden des Immunproteasoms zu binden, das wie oben beschrieben, ebenfalls nach Stimulation mit INF- γ gebildet wird. Sie besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, PA 28 α , PA28 β und PA28 γ , das auch als Ki Antigen bekannt ist. Sie bilden einen heptamerischen $\alpha_3\beta_4$ -Komplex⁴⁸ und binden an die α -Ringe des 20S-Proteasoms. Im Gegensatz zum 19S-Regulator interagiert der 11S-Komplex in einem ATP-unabhängigen Prozess mit dem 20S-Proteasom. Der komplette Immunproteasom-Komplex degradiert somit Zielproteine auf einem ATP- und Ubiquitin-unabhängigen Weg und erhöht gleichzeitig die Rate der Degradierung von Proteinen. Die 11S-Einheit wird wohl benötigt, um spezielle Proteine, die besonders für die Antigenpräsentation geeignet sind zu produzieren. Man nimmt an, dass Proteine, die vom 26S-

Proteasom abgebaut wurden, durch Proteasomen, die mit PA28 verbunden sind, erst zu den Epitopen degradiert werden können, die mit den MHC Klasse I Komplexen kompatibel sind⁴⁹.

Zudem kann es zur Bildung eines sog. Hybrid-Proteasoms kommen, welches aus einem 20S Kern und je einer 19S- und einer 11S-Regulatoreinheit besteht, das womöglich in der Lage ist, sowohl die Funktionen eines 26S-Proteasoms als auch eines Proteasoms mit 11S-Regulatoren auszuführen⁵⁰.

1.5.7. Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Ubiquitylierung von Proteinen ermöglicht es dem 26S Proteasom spezifisch Proteine zu degradieren, die für die Zerstörung gekennzeichnet sind. Drei essentielle Schritte sind für die Ubiquitylierung von Proteinen notwendig. Zunächst wird Ubiquitin ATP-abhängig durch das Ubiquitin-aktivierenden Enzyme E1 aktiviert. Dann transferiert eines von verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2 Familie) Ubiquitin auf ein Protein der großen E3- oder Ubiquitin-Ligase-Familie. Durch verschiedene Erkennungsmechanismen überträgt dann das E3-Enzym sein Ubiquitin auf das zu degradierende Substrat (Abb. 1.10).

Die 19S-Kappen wiederum besitzen eine Affinität zu den poly-Ubiquitin-Ketten, mit denen das Substrat kovalent verbunden ist, und befördern es so in den Proteasom-Zylinder. Diese ATPasen, die die Zielproteine entfalten, kontrollieren so den Zugang der Substrate zum proteolytischen Kern des Proteasoms⁵¹.

Da der 20S Kern selbst keine ubiquitylierten Proteine abbauen kann, vermutete man, dass in den 19S Komplexen eine Ubiquitin-Isopeptidase verborgen sein muss, die das Ubiquitin von den Substraten trennt. Sie wurde in der Rpn1 Untereinheit des Deckels entdeckt⁵².

Die Poly-Ubiquitinkette wird durch Deubiquitinierungs-Enzyme (DUB) in die einzelnen Ubiquitin-Proteine zerlegt (Abb. 1.11)⁵³.

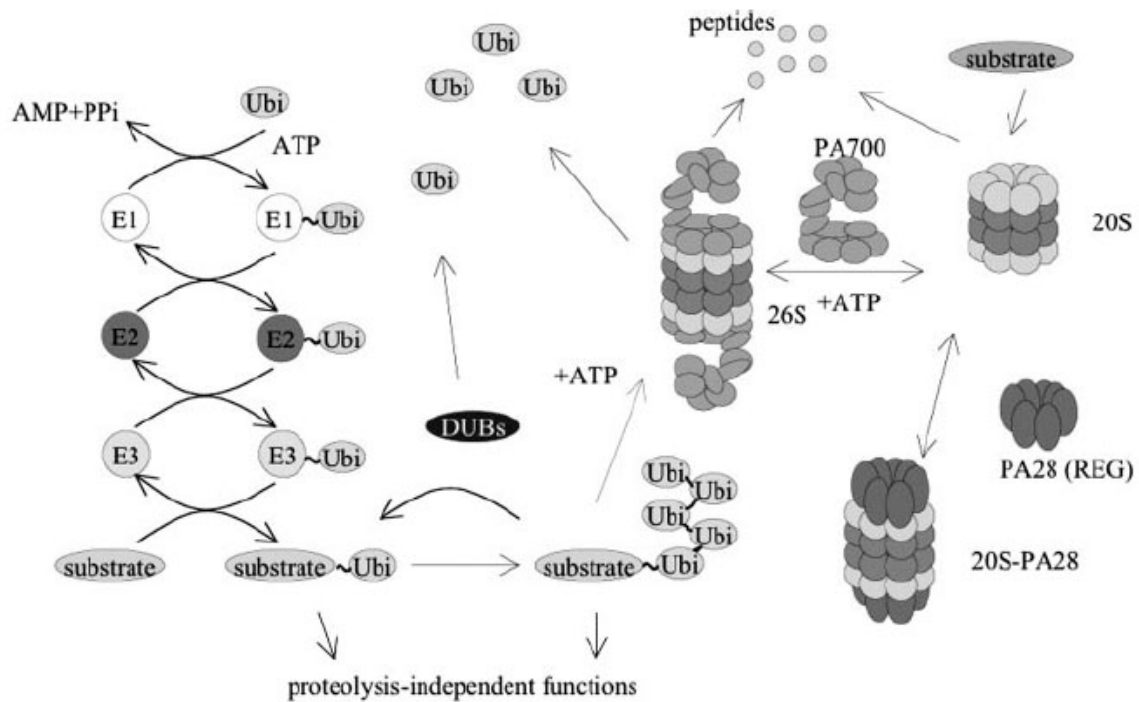


Abb. 1.11: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Das Proteasom wird aus der 20S-Einheit mit entweder den 19S-Regulatoren (PA700) oder den 11S-Regulatoren (PA28) gebildet. Das 20S-19S-Proteasom degradiert Proteine, die durch die abgebildete Kaskade ubiquitinyliert wurden, das 20S-11S-Proteasom arbeitet Ubiquitin-unabhängig⁵⁴.

1.5.8. Die Rolle des Proteasoms bei der B- und T-Zell Aktivierung

Die Immunreaktion wird durch eine große Anzahl stimulierender und inhibierender Regulatorproteine kontrolliert, deren Anzahl und Aktivität genau aufeinander abgestimmt sein müssen. Das Proteasom ist eine unverzichtbare Komponente in diesem Regelkreis, da es die Regulatorproteine nicht nur irreversibel eliminiert, sondern auch in ihre Synthese und Aktivierung eingreift.

Ein zentraler Mediator der Aktivierung von Monozyten und Makrophagen ist der pro-entzündliche Transkriptionsfaktor NF- κ B (**n**uclear **t**ranscription **f**actor binding to the **B** site of the intronic promoter of the **I**g κ chain). NF- κ B induziert transkriptionell eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen. So zum Beispiel TNF, IL-1, IL-8, IL-6, MCP-1, die MHC I - α -Kette und β 2-Mikroglobulin. Des weiteren ist er für die Induktion von Adhäsionsmolekülen

wie VCAM-1 und ICAM-1 verantwortlich, die eine Migration von Entzündungszellen in den Extravasalraum vermitteln⁵⁵. NF- κ B ist ein Überbegriff für Transkriptionsfaktoren aus der Rel-Familie und besteht aus zwei Untereinheiten, p65 und p50, die im Zytoplasma normalerweise an einen inaktivierenden Faktor I κ B gebunden sind. I κ B wird nach Zellaktivierung durch verschiedenste Stimuli wie LPS, UV-Strahlung oder Sauerstoffradikale durch die IKK (I κ B-Kinase) phosphoryliert, wodurch die Ubiquitinierung durch die E3 Ligase getriggert wird. Dadurch kann er anschließend im 26S Proteasom abgebaut werden. Der aktivierte NF- κ B wird in den Nukleus transloziert, wo er an die Promotorregionen von proinflammatorischen Genen bindet und die Entzündungsreaktion verstärkt⁵⁶ (Abb. 1.12).

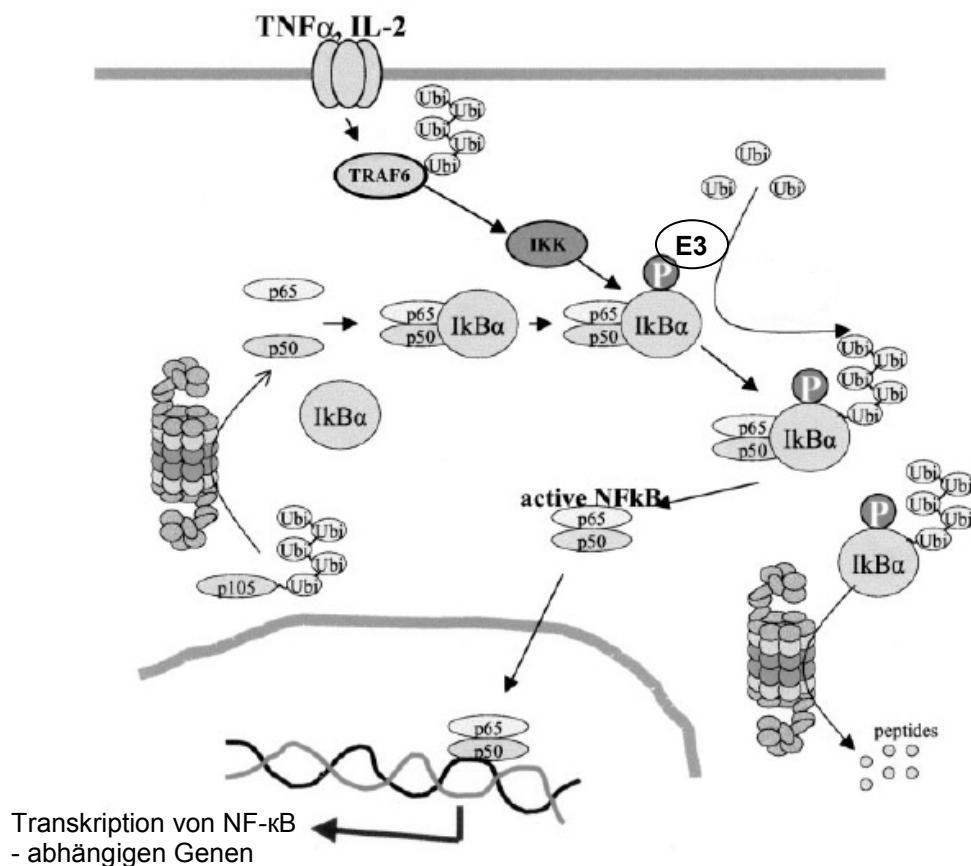


Abb. 1.12: Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei der Aktivierung von NF- κ B. Erhält die Zelle extrazelluläre Signale wie Stimulation durch TNF- α oder IL-2, erfolgt eine Aktivierung der IKK-Kinase. IKK phosphoryliert den inaktivierenden Faktor I κ B, der an das p65/p50 NF- κ B dimer gebunden ist. Der phosphorylierte NF- κ B-Komplex wird durch die E3-Ligase ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert. Dabei wird das p65/p50-Dimer freigesetzt, welches in den Nukleus transloziert und dort an spezifische Promotor-Regionen bindet und die Transkription proinflammatorische Gene induziert⁵⁷.

Auch für die Synthese der p50-Untereinheit von NF- κ B wird das 26S-Proteasom benötigt, indem es den Precursor p105 zur aktiven NF- κ B Einheit p50 degradiert. Es hat somit nicht nur für die Aktivierung, sondern auch für die Generierung von NF- κ B Bedeutung.

Eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei Entzündungsvorgängen spielen, werden durch proteasomalen Abbau degradiert. Die Inhibierung von Proteasomen müsste zur Akkumulation dieser Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene führen, was nach heutiger Annahme eine Desensibilisierung der Zellen für eine Aktivierung zur Folge hat. Darüber hinaus scheinen Makrophagen und Monozyten nach Blockade des Proteasoms in Apoptose überzugehen. Dies wird erklärt durch eine Akkumulation von potentiell zytotoxischen Proteinen, die normalerweise abgebaut werden müssten. Damit werden Entzündungszellen eliminiert.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe relativ spezifischer Proteasomen-Inhibitoren entwickelt. Proteasomen-Inhibitoren wurden erfolgreich in Tiermodellen zur Organtransplantation eingesetzt, wo sie Abstoßungsreaktionen verhindern konnten. Zudem sind gewisse Erfolge in Tumorstudien zu verzeichnen.

In die Funktion des Immunproteasoms ist auch das Enzym Leucin Aminopeptidase involviert.

1.6. Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen

1.6.1. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind chronisch entzündliche Erkrankungen des Darmes (CED). Beide Erkrankungen zeigen einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. - 40. Lebensjahr, wobei Morbus Crohn eine Inzidenz von ungefähr 3/100 000 aufweist und bei Colitis ulcerosa ca. 4 Neuerkrankungen pro Jahr auf hunderttausend Personen hinzukommen.

Die Forschung nach den ätiopathogenetischen Faktoren, die für die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verantwortlich sein könnten, konnte kürzlich neue Ergebnisse erbringen.

Früheren Annahmen zufolge war die Erkrankung an CED ein multifaktorielles Geschehen, in dem Ernährungsgewohnheiten genau so eine Rolle gespielt haben, wie Umwelteinflüsse und Infektionserkrankungen^{58,59}. Des Weiteren stellt Rauchen einen

Risikofaktor für einen aggressiveren Krankheitsverlauf und postoperative Rezidive des Morbus Crohn dar, wohingegen für Colitis ulcerosa ein protektiver Effekt auf die Krankheitsmanifestation gezeigt werden konnte.

Sicher ist hingegen, dass polygenetische Ursachen für die Entstehung von Morbus Crohn verantwortlich sind. So konnte an familiären Untersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingspaaren gezeigt werden, dass monozygote Geschwister bei Erkrankung ihres Zwillings ein im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung 15 - 35fach erhöhtes Risiko haben, an Morbus Crohn zu erkranken⁶⁰. Man vermutet, dass auf den Chromosomen 12 und 16, eventuell auch auf den Chromosomen 3, 7 und 11 derartige Risikoregionen liegen.

Neueren Studien zufolge können Mutationen auf dem CARD15/ NOD2-Gen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Morbus Crohn spielen^{61,62}. Besonders Mutationen des CARD15/NOD2-Gens (caspase recruitment domain-containing protein) sind mit einer erhöhten CED-Erkrankungshäufigkeit, früheren Erstmanifestationen und Stenosenbildung assoziiert^{63,64}. Mittels verschiedener Methoden konnten im nicht entzündeten Kolon Makrophagen als einzige Zellen identifiziert werden, in deren Zytoplasma CARD15/NOD2 vorhanden war⁶⁵. Des Weiteren konnte eine erhöhte Expressierung von CARD15/NOD2 in Makrophagen und intestinalen Epithelzellen von MC-Patienten nachgewiesen werden. Die Penetranz ist jedoch sehr gering. Weniger als zehn Prozent aller Träger von 2 CARD15 Risiko-Allelen entwickeln Morbus Crohn, was bedeutet, dass Umweltfaktoren und andere genetische Muster ebenso eine Rolle spielen und CARD15/NOD2 Mutationen nicht als einzige Determinante bei der Krankheitsentstehung von MC gewertet werden können⁶⁶.

Beide Erkrankungen zeigen erhebliche Überschneidungen in Symptomatik und extraintestinalen Begleiterkrankungen, aber auch eindeutige Unterschiede hinsichtlich des Befallsmusters des Darms und des makroskopischen und histologischen Erscheinungsbildes.

So können beide Erkrankungen Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Appetitlosigkeit mit Gewichtsverlust, Übelkeit und Schwächegefühl hervorrufen. Des weiteren können diffuse bis krampfartige Abdominalschmerzen und blutige Diarrhoen mit einer Stuhlfrequenz von 10-20 pro Tag auftreten. Extraintestinale Manifestationen sind wahrscheinlich auf die ablaufenden Immunprozesse zurückzuführen und können sich z.B. als fettige Degeneration des Leberparenchyms, Pericholangitis, Achten der Mundschleimhaut, Erythema nodosum, Arthritiden oder Entzündungen der Augen manifestieren.

Der Darmwandbefall des Morbus Crohn zeigt eine diskontinuierliche Entzündung mit scharf begrenzten, tiefen Ulzerationen und kann den gesamten Verdauungstrakt betreffen,

jedoch ist ein Befall proximal des Ileums eher selten. Alle Schichten der Darmwand einschließlich der Muskularis und Serosa, können von entzündlichen Infiltraten durchsetzt sein, die Bildung nicht-verkäsender Granulome ist möglich. Oft ist der Beginn der Erkrankung schleichend, im Verlauf kommt es zu Erkrankungsschüben mit inkompletten Remissionen. Komplikationen können auftreten, wenn es zu Darmobstruktionen aufgrund von entzündlich-fibrotischen Darmwandverdickungen oder zu Fistel- oder Abszessbildungen kommt. Eine kurative Operation ist nicht möglich, weshalb die Indikation zur Resektion befallener Darmabschnitte sehr zurückhaltend gestellt werden sollte.

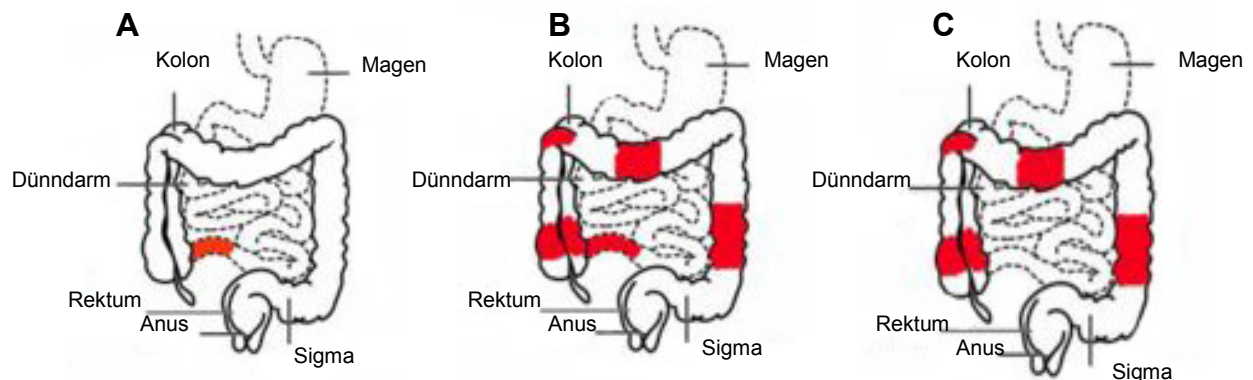


Abb. 1.14.: Befallsmuster des Morbus Crohn. Bei 1/3 der Patienten ist nur das terminale Ileum befallen (A), bei 1/3 der Patienten sind sowohl Ileum als auch Kolon befallen (B) und bei 1/3 der Patienten ist ausschließlich das Kolon befallen (C). Ein zusätzlicher Befall der Speiseröhre, des Magens und/oder Duodenums findet sich in 3-5% wohingegen eine Beteiligung des Rektums in 11-20% der Fälle auftreten kann. Mit 30-40% sehr häufig sind anorektale Erkrankungen wie Analfisteln, Analfissuren und Abszesse.

Die Colitis ulcerosa bleibt auf das Kolon beschränkt, wobei das Rektum in den meisten Fällen Ausgangspunkt der Erkrankung ist. Die Entzündung der Darmwand bleibt auf Mukosa und Submukosa beschränkt und zeigt flache, sich kontinuierlich ausbreitende Ulzerationen. Der Beginn der Erkrankung verläuft oft akut, zwischen den einzelnen Schüben kann es aber zu kompletten Remissionen kommen. Ein chronischer Verlauf ist anders als beim M. Crohn selten, das Risiko der Entwicklung eines Kolonkarzinoms liegt jedoch bei ca. 10%. Eine kurative Behandlung durch eine totale Kolektomie ist möglich, sollte jedoch die Ultimo ratio darstellen.

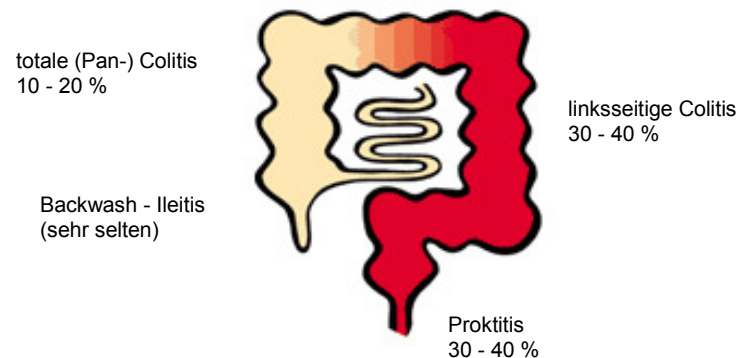


Abb. 1.15: Befallsmuster des Darms bei Colitis ulcerosa. In ca. 2/3 der Fälle sind entweder nur das Rektum oder das linksseitige Kolon befallen. Zu einer Entzündung des gesamten Kolons (Pancolitis) kommt es nur in 10 - 20 % der Fälle. Noch seltener ist die Backwash - Ileitis, bei der es zu einem Übergreifen der Entzündung auf das terminale Ileum kommt.

Eine kurativ-medikamentöse Therapie ist für keine der beiden Erkrankungen bekannt. Zur symptomatischen Behandlung eines akuten Schubs und der Remissionsbehandlung werden 5-Amino-Salizylsäure und Glukokortikoide, Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Ciclosporin eingesetzt. Ein neuerer Ansatz ist der Versuch, Antikörper gegen den Tumor-Nekrosefaktor einzusetzen. Die Krankheitsaktivität konnte dadurch zwar bei vielen Patienten für sechs Wochen bis zu sechs Monaten vermindert werden. Da die Kosten dieser Behandlung jedoch sehr hoch sind, wird sie erst nach Ausschöpfung aller anderen Möglichkeiten eingesetzt.

1.6.2. Störung des Gleichgewichts des intestinalen Immunsystems bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die besondere Stellung des intestinalen Immunsystems beruht auf der Gradwanderung zwischen Toleranz gegenüber den Antigenen und Pathogenen des Darminhalts und kontrollierter Immunreaktion zum Schutz vor Pathogeninvasion. Zum einen dürfen Nahrungsbestandteile nicht als zu eliminierende Pathogene erkannt werden, zum anderen müssen potentielle Noxen möglichst frühzeitig durch eine spezifische Immunantwort bekämpft werden.

Zu den wichtigsten zellulären Komponenten des intestinalen Immunsystems gehören intestinale Makrophagen, sowie die intraepithelialen (IEL) oder die in der Lamina propria gelegenen (LPL) Lymphozyten. Darüber hinaus spielen aber auch intestinale Epithelzellen (IEZ), intestinale Myofibroblasten und glatte Muskelzellen, intestinale Mastzellen und Endothelzellen eine Rolle. Die zellulären Komponenten des intestinalen Immunsystems bilden eine komplizierte Netzwerkstruktur. Sie sind auf Zell-Zell-Interaktion und -Kommunikation zur Funktionserhaltung des intestinalen Immunsystems angewiesen. Für diese notwendige Kommunikation produzieren sie eine Reihe von Interleukinen und Zytokinen.

Bei der Steuerung des intestinalen Immunsystems in der normalen Mukosa existiert ein Gleichgewicht von pro-entzündlichen (z.B. IL-1, IL-6, TNF)⁶⁷ und anti-entzündlichen (z.B. IL-10, IL-4)⁶⁸ Faktoren. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist dieses Gleichgewicht zwischen pro-entzündlichen und anti-entzündlichen Zytokinen gestört, ein Überwiegen der entzündungsfördernden Mechanismen wurde beschrieben^{69, 70, 71}.

IL-4 und IL-13 sind Makrophagen-inhibierende T_H2-Zytokine^{72, 73}. Im Zusammenhang mit chronischen Darmentzündungen gelten sie als antiinflammatorisch. Vor allem IL-4 spielt im Immunsystem des Darmes eine entscheidende Rolle⁷⁴. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind reduzierte IL-4-Level auf Protein- und mRNA-Ebene gefunden worden. Das bestätigt die Annahme, dass immunsuppressive und antiinflammatorische Mechanismen bei diesen Erkrankungen gestört sind⁷⁵.

IL-6 ist ein proinflammatorisches TH1-Zytokin, das von mononukleären Phagozyten, vaskulären Endothelzellen, Fibroblasten und anderen Zellen als Antwort auf mikrobielle Antigene produziert wird. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen werden erhöhte IL-6-Konzentrationen sowohl in mukosalen Biopsien als auch im Serum gefunden^{76, 77, 78, 79}.

IL-10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin und unterdrückt die Zytokinfreisetzung von TH1-Zellen und Makrophagen, bei letzteren besonders die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF und IL-12⁸⁰. IL-10 scheint gerade im Darm eine wichtige Rolle zu spielen, da IL-10 defiziente Mäuse eine Entzündung des Darmes erleiden, die durch Gabe von IL-10 verhindert werden kann.

TNF ist ein wichtiger Mediator der Immunantwort gegenüber Gram-negativen Bakterien. Es wird hauptsächlich von mononukleären Phagozyten wie Makrophagen produziert. Bei IBD werden erhöhte TNF-Level gemessen^{81, 82, 83}. Im Kolitis-Modell mit IL-10

defizienten Mäusen wurde ebenfalls eine erhöhte TNF-Expression in Kulturen aus Darmzellen festgestellt⁸⁴.

INF- γ wird u.a. von T_H1-Zellen exprimiert. Es aktiviert Makrophagen, indem es ihre Fähigkeit zur Zerstörung intrazellulärer Erreger erhöht. Des Weiteren triggert INF- γ die Entwicklung von CD4⁺-T-Zellen zu T_H1-Zellen und es unterdrückt die Differenzierung von T_H2-Zellen. Erstaunlicherweise wird auch immer wieder beschrieben, dass INF- γ von verschiedenen Populationen regulatorischer T-Zellen gebildet wird^{85, 86, 87, 88, 89}. Bei MC ist INF- γ in der intestinalen Mukosa vermehrt vorhanden^{90, 91, 92}, wobei keine Erhöhung im Serum festgestellt werden kann⁹³.

Das Monozyten-Makrophagen-System trägt wesentlich zur Synthese von Proteasen, Sauerstoffradikalen und Stickoxiden in der intestinalen Mukosa bei. Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen ist im akuten Schub der Entzündung vermehrt. Diese sowie andere Mediatoren können zu einer lokalen Gewebeschädigung führen.

Die Rolle der intestinalen Myofibroblasten und glatten Muskelzellen ist bisher wenig untersucht. Ihre mögliche Bedeutung für das intestinale Immunsystem wird durch die Fähigkeit, Akute-Phase-Zytokine wie IL-6 oder Chemokine wie IL-8 und MCP-1 in großen Mengen zu sezernieren, unterstrichen.

Alle Konzepte zur Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gehen zwar von einer unterschiedlichen Initiierung der Entzündung aus, sie stimmen jedoch darin überein, dass alle auslösenden Faktoren schließlich in die genannte Überaktivierung des Immunsystems münden.

1.6.3. Intestinale Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

In der Mukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gibt es eine vom gesunden Darm abweichende Makrophagenpopulation. Doe und Mitarbeiter konnten eine Population von Makrophagen aus der Mukosa von Patienten mit CED mit deutlich höherer LPS-Rezeptor Expression nachweisen⁹⁴. In der Entzündung sind etwa 30-40% der Mukosa-Makrophagen CD14 positiv⁹⁵. Mahida und Mitarbeiter konnten die Präsenz des Fc γ III-Rezeptors bei CED mit Hilfe immun-histochemischer Methoden und an isolierten Zellen nachweisen. Die entzündungs-assoziierte Makrophagenpopulation exprimiert auch die T-Zell-

kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf intestinalen Makrophagen aus normaler Mukosa ebenfalls nicht nachweisbar sind⁹⁶.

Neben der Veränderung im Antigenmuster entzündungsassoziierter Makrophagen ist auch eine Änderung des Aktivierungszustandes der Zellen nachgewiesen worden. Während der intestinalen Entzündung zeigt sich eine Aktivierung von NF- κ B⁹⁷. Des weiteren wird in intestinalen Makrophagen während der Entzündung vermehrt Cathepsin D exprimiert und es ist eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität nachzuweisen^{11,12}.

Somit existieren in der Mukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mindestens zwei verschiedene Populationen von Makrophagen, von denen eine einen erhöhten Aktivierungszustand aufweist.

2. Arbeitsziele

Die spezifische Differenzierung der Makrophagen im Intestinum bringt einen besonderen Phänotyp hervor, der in dieser Form in keinem anderen Organ des Menschen existiert. Intestinale Makrophagen aus normaler Mukosa zeigen keine Sekretion von IL-1 oder TNF. Dies ist darauf zurückzuführen, dass LPS-Rezeptoren (TLR4 und CD14) auf IMAC nicht exprimiert werden. Außerdem können normale IMAC keine T-Zellreaktionen induzieren, da sie keine für die T-Zell-Expansion notwendigen ko-stimulatorischen Moleküle (CD80 und CD86) aufweisen. Diese Daten weisen auf einen anergen IMAC-Typ in der normalen Mukosa hin.

In Vorarbeiten wurde zunächst mittels des Erkennungsmarkers CD33 eine Makrophagenpopulation isoliert und aufgereinigt. Während der intestinalen Entzündung zeigte sich eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in IMAC, der in der Lage ist, eine Reihe proentzündlicher Gene zu induzieren.

Zum Vergleich der differentiellen Genexpression von entzündungsassoziierten und normalen intestinalen Makrophagen wurde ein subtraktives Screening, eine Methode der „representative differential analysis (RDA)“ durchgeführt. Hierbei erhielt man bei den entzündungsassoziierten IMACS versus den normalen IMACs am häufigsten das „monocyte chemoattractant protein1 (MCP-1)“, gp91, eine Untereinheit der NADPH-Oxidase und Cathepsin D. Auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 werden auf normalen IMAC nicht exprimiert, wohl aber auf entzündungsassoziierten Makrophagen⁹⁸.

Während der Differenzierung von Blutmonozyten zu normalen IMACs konnte eine Induktion spezifischer Gene nachgewiesen werden. Dazu gehört MIP3a, das dazu dient, den Kontakt zwischen IMACs und CD45R0-memory-T-Zellen herzustellen⁹⁹, gp96, das möglicherweise auch Toleranz-induzierende Eigenschaften besitzt, und TANK, ein Antagonist des TNF-Signalweges, der zur Anergie der IMAC beiträgt.

Zudem wurden von der Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit subtraktive Hybridisierungs-Versuche mittels Affymetrix GeneChip® Analysen durchgeführt, um differenzierungsspezifische Gene für intestinale Makrophagen zu identifizieren. Dabei wurde cDNA von *in vitro* differenzierten Makrophagen von der cDNA von Makrophagen, die aus nicht entzündeten Därmen isoliert wurden, subtrahiert. Es zeigte sich, dass praktisch alle

Proteasomen- Untereinheiten der *in vitro* differenzierten Makrophagen höher exprimiert waren als die der IMACs aus normaler Mukosa.

Daher lag es nahe anzunehmen, dass IMACs auch deshalb anerg sind und zunächst keine Entzündungsreaktionen vermitteln, weil die Ubiquitinierung und die proteasomale Maschinerie herabreguliert sind.

Diese Hypothese soll mittels quantitativver PCR (Taqman®) bestätigt werden. Fünf ausgewählte Gene, die die Proteasomen-Untereinheiten ATPase 2, beta 2, beta 5, MECL-1 und LMP7 kodieren, wurden dafür in IMACs aus normaler und entzündeter Mukosa und in IMACs aus der Mukosa von Sigmadivertikulits-Patienten auf ihre Expression hin untersucht.

Insbesondere sollte die Expression der konstitutiven Untereinheiten beta 2 und beta 5 mit der Expression ihrer INF- γ induzierbaren Homologe MECL-1 und LMP7 in IMACs aus entzündeter bzw. nicht entzündeter Mukosa miteinander verglichen werden.

Zusätzlich wurden Blutmonozyten aus CED Patienten und gesunden Kontrollen bezüglich der Expression der proteasomalen Untereinheiten mittels Taqman® untersucht, um die Schritte bei der gewebsspezifischen Differenzierung genauer nachvollziehen zu können. Hierbei wurde auch berücksichtigt, ob sich die Patienten in Remission oder unter Steroid-Medikation befanden.

Um die Ergebnisse des Taqman® zu bestätigen wurde eine Immunhistochemische Färbung mit Vector Red® angefertigt, um proteasomale Untereinheiten in entzündeter und nicht entzündeter Mukosa sowie in Mukosa bei Sigmadivertikulitis nachzuweisen.

Zudem wurden für ausgewählte Proteasomen-Untereinheiten Western Blot Analysen aus Gesamtproteinlysaten aus entzündeter und normaler Mukosa durchgeführt.

Anschließend wurde mittels eines Proteasomenfunktionstests die Proteasomenaktivität in den Gesamtproteinlysaten untersucht.

3. Material

3.1. Herkunft von Material und Geräten

3.1.1. Chemikalien und Enzyme

Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DMEM Kulturmedium	PAA Laboratories GmbH, Pasching
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase I, RNase free	Quiagen GmbH, Hilden
dNTP Mix	Promega, Madison, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ficoll LSM 1077 Lymphozyte	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Gibeco™ HBSS mit CaCl ₂ + MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
Human GAPDH (20x)	PE Applied Biosystems, Warrington, UK
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kollagenase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
PBS-Dulbecco (1x) mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Random Primer	Promega, Madison, USA
RNase free water	Quiagen GmbH, Hilden
RNase ZAP®	Ambion® Inc., Huntingdon, UK
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Agarosegel 1,2%	Invitrogen, Karlsruhe
DAKO Pap-Pen	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
MACS MS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulose/Filter Papier Sandwich	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Novex Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger SuperFrost [®] Plus	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
PCR Tubes, 0,5 ml	Biozym, Oldendorf
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar [®] Corning Inc., Corning USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Schraubdeckelgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
384-Well-Platte	Abgene, Epsom, UK
Zellsieb, 70 µm	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.3. Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Bayonet electrode cartridge	Agilent Technologies, Waldbronn
Biofuge15 Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Digitalkamera, PowerShot G2	Canon, Lake Success, USA
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Elektrophoresekammer	XCell SureLock [™] , Invitrogen, Karlsruhe
IKA Vortex Mixer	Agilent Technologies, Waldbronn
Megafuge Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau

Mikroskop	Olympus, Stuttgart
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Meter	wiss. Tech. Werkstatt, Weilheim
Pipetboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilmentwickler, Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Schüttelgerät, HS 250	Janke & Kunkel, Staufen
Skalpell	pmf, Köln
SuperMACS Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen
Thermomixer, 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe, UVT-20M	Herolab, Wiesloch
Vortex	Heidolph, Kehlheim
Waage Sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen
Waage, sartorius laboratory L 6200 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad, Liquitherm FV	Labora, Mannheim

3.2. Fertigkombinationen von Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Fertigkombinationen von Biochemikalien („Kits“) sind mit deren Bezugsquellen in folgender Tabelle zusammengefasst. Kits, die Oligonukleotide enthalten, sind mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Die jeweiligen Oligonukleotide sind unter 3.3 zusammengefasst.

Advantage [®] cDNA Polymerase Mix (10x Puffer + Advantage [®] -Polymerase)	BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA
ChemMate Target Retrieval Solution, Ready-to-use	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

ECL Plus Western Blotting Detection Reagens	Amersham Biosciences, Freiburg
Gene Checker™ Kit (A)	Invitrogen, Karlsruhe
MicroBeads (MACS Beads)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
20S Proteasome Activity Assay Kit	Chemicon International, Hampshire, UK
Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit	Chemicon, Hampshire, UK
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RNA 6000 Pico Assay Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNase-Free DNase Set	Quiagen GmbH, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Taqman® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, UK
Vectastatin® ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA
Vector® NovaRED Substrate Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA

3.3. Oligonukleotide

3.3.1. Oligonukleotide für qualitative PCR

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aus Fertigkomponenten (3.2) von Biochemikalien sind in folgender Tabelle zusammengefasst und mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Die jeweiligen Kits sind unter 3.2 zusammengefasst:

(A) GAPDH upstream	5`- TTA GCA CCC CTG GCC AAG G -3`
(A) GAPDH downstream	5`- CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG -3`
(A) 5` Actin upstream	5`- GCT CAC CAT GGA TGA TGA TAT CGC -3`
(A) 5` Actin downstream	5`- GGA GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC -3`
(A) 3` Actin upstream	5`- GAA GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC -3`
(A) 3` Actin downstream	5`- CTG GTC TCA AGT CAG TGT ACA GG -3`
(A) 6K Clathrin upstream	5`- GAC AGT GCC ATC ATG AAT CC -3`
(A) 6K Clathrin downstream	5`- TTT GTG CTT CTG GAG GAA AGA A -3`

(A) 2K Clathrin upstream	5'- GCT CAC ATG GGA ATG TTC AC -3'
(A) 2K Clathrin downstream	5'- ATG TTG TCA AAG TTG TCA TAA G -3'

3.3.2. Oligonukleotide für Real-time PCR

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen.

ATPase 2 upstream	5'- CTT TGG TCC ACC CGG TAC AG -3'
ATPase 2 downstream	5'- CGA ATG AAG CAC GCA TCA GT -3'
ATPase 2 Probe	5'- AAG ACA CTC TGT GCG CGG GCA GTT -3'
beta 2 upstream	5'- TCG GAC CCC ATA TCA TGT GA -3'
beta 2 downstream	5'- CGC TGG CCC TTC ATG CT -3'
beta 2 Probe	5'- CCT CCT CCT GGC TGG CTA TGA T -3'
beta 5 upstream	5'- GGA AGT GGA GCA GGC CTA TG -3'
beta 5 downstream	5'- GCA TCT CTG TAG GTG GCT TGG T -3'
beta 5 Probe	5'- TCT GGC CCG TCG AGC CAT C -3'
MECl - 1 upstream	5'- TCT GGG CGC CGA TAC G -3'
MECl - 1 downstream	5'- GGA TCT TCT CGC AGC TCT TGT C -3'
MECl - 1 Probe	5'- CCA CTA ACG ATT CGG TCG TGG C -3'
LMP 7 upstream	5'- GCC TGC TGG CCA AGG AAT -3'
LMP 7 downstream	5'- GCT GCC GAC ACT GAA ATA CGT -3'
LMP 7 Sonde	5'- CAG GCT GTA CTA TCT GCG AAA TGG A -3'

3.4. Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Antikörper und Seren sind in folgender Tabelle unter Angabe des Konjugates, des Spenderorganismus, des Klons und des Herstellers zusammengefasst:

Antikörper	Konjugat	Spender	Klon	Hersteller
anti-CD33	Micro Beads	Maus IgG ₁ monoklonal	P67.6	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-ATPase 2	ohne	Kaninchen polyklonal	keine Angabe	Affinity Research Products, Exeter, UK
anti-beta 2	ohne	Maus monoklonal	keine Angabe	Affinity Research Products, Exeter, UK
anti-beta 5	ohne	Kaninchen polyklonal	keine Angabe	Affinity Research Products, Exeter, UK
anti-MECI - 1	ohne	Kaninchen polyklonal	keine Angabe	Affinity Research Products, Exeter, UK
anti-beta 2 / MECI-1	ohne	Kaninchen polyklonal	keine Angabe	Affinity Research Products, Exeter, UK
anti-LMP 7	ohne	Maus monoklonal	keine Angabe	Affinity Research Products, Exeter, UK
Negative Control Rabbit Immunglobulin Fraction	ohne	Kaninchen	keine Angabe	DakoCytomation, Hamburg
Mouse IgG1 Negative Control	ohne	Maus	keine Angabe	DakoCytomation, Hamburg
Goat anti-rabbit	Biotin	Ziege	keine Angabe	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Goat anti-mouse	Biotin	Ziege	keine Angabe	Dianova, Hamburg
Goat anti-rabbit	HRP	Ziege	keine Angabe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Goat anti-mouse	HRP	Ziege	keine Angabe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Mouse anti-Actin	ohne	Maus monoklonal	C4	Chemicon

3.5. Rekombinante Proteine

Protein	Gewicht	Hersteller
ATPase 2 (PSMC2)	49,8 kDa	ProSci Incorporated, Poway, California
MECL-1 (PSMB10)	55,77 kDa (30 kDa + GST tag)	Abnova (Taiwan) Corp., Taipei, Taiwan
LMP7 (PSMB8)	37,11 kDa (+ GST tag)	Abnova (Taiwan) Corp., Taipei, Taiwan
MsX Actin	42 kDa	Chemicon

3.6. Puffer

3.6.1. Lösungen für die Makrophagenisolation

PBS (10x)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	21,6 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	H ₂ O, pH 7,2 einstellen	ad 1 l
MACS Puffer	EDTA 0,5 M, pH 8,0	0,5 ml
	BSA Stufe IV oder V	0,25 g
	PBS	ad 50 ml
	Sterilfiltrieren und entgasen.	

3.6.2. Lösung zur Proteingewinnung für den Western Blot

RIPA Puffer (2x)	Tris 1M	5 ml
	NaCl 5M	3 ml
	Desoxycholsäure	1 g
	Triton-X-100	1 ml
	SDS 10%	500 µl
	DEPC- H ₂ O	ad 50 ml

Das Konzentrat wurde 1:2 mit DEPC-H₂O verdünnt und mit einer Complete Mini Tablette (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) versetzt.

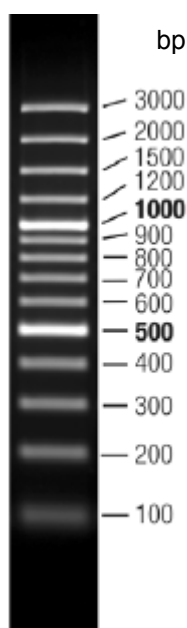
3.6.3. Lösungen für den Western Blot

NuPAGE [®] MES SDS Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [®] Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Waschpuffer für Western Blot	1,42 l Millipore Wasser 2 ml TWEEN 20 40 ml Tris 0,5 M 40 ml NaCl 5 M
Blockierlösung für Western Blot	100 ml Waschpuffer (s.o.) 5 g Magermilchpulver 3 g BSA

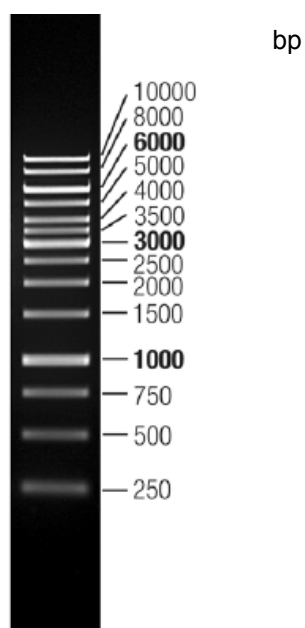
3.7. DNA-Größenstandard

Die Größen der Nukleinsäurebruchstücke der in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus und GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) sind im Folgenden aufgelistet:

100 bp DNA Ladder Plus



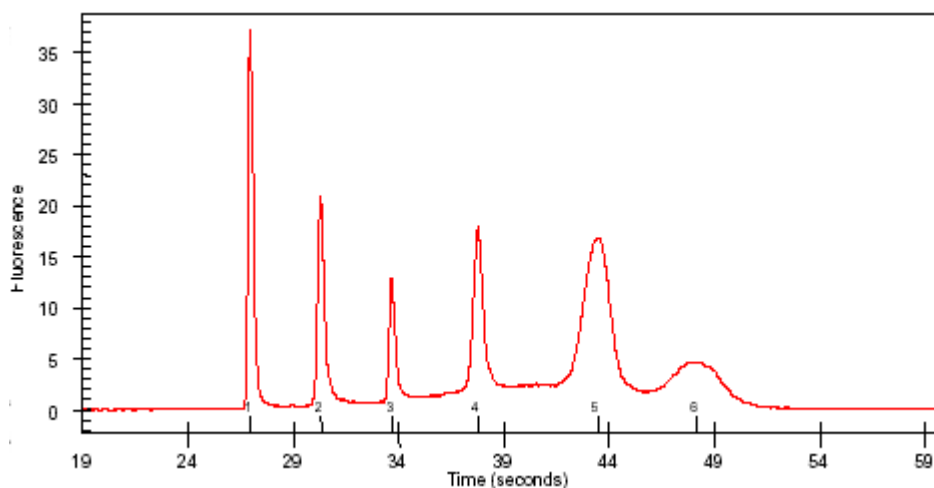
1 kb DNA Ladder



3.8. RNA-Größenstandard

Die RNA 6000 Leiter (Ambion®, Huntingdon, UK) wurde als Größenstandard für den Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Sie besteht aus sechs verschiedenen Transkriptionsprodukten unterschiedlicher Längen:

0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 und 6.0 kb.



3.9. Protein-Größenstandard für den Western Blot

Der SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Karlsruhe) besteht aus 10 Proteinen: 8 blau- und 2 rot-gefärbte im Bereich von 4 kDa bis 250 kDa abhängig vom Puffer-System. Er ermöglicht die Auswertung der Qualität des Proteintransfers und die Abschätzung der Größen von Proteinproben.

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)
Myosin	188
Phosphorylase	98
BSA	62
Glutamic Dehydrogenase	49
Alcohol Dehydrogenase	38
Carbonic Anhydrase	28
Myoglobin Red	17
Lysozyme	14
Aprotinin	6
Insulin, B Chain	3

NuPAGE[®] Novex Bis-Tris 4-12% Gel NuPAGE[®] MES

4. Methoden

4.1. Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen

In dieser Arbeit wurden differenzierungsspezifische und entzündungsinduzierte Proteine intestinaler Makrophagen identifiziert und funktionell charakterisiert. Voraussetzung für die Durchführung der phänotypischen und funktionellen Untersuchungen war die Isolation der dazu erforderlichen reinen Zellpopulationen von primären humanen Makrophagen der Lamina propria aus Darmresektaten:

6 Kontrollen, keine CED, IMAC aus gesunder Schleimhaut von Darmresektaten bei Tumorerkrankungen

Patient	Datum	Diagnose	OP
62 j. ♂	17.08.2005	Rektum Ca Rezidiv	Rektumexstriktion
77 j. ♂	13.04.2005	Rektum Ca	Rektumresektion
82 j. ♀	15.04.2005	Rektum Ca	Rektumresektion
72 j. ♂	18.04.2005	Rektum Ca	Rektumexstriktion
61 j. ♂	21.04.2005	Rektum Ca	Lap. Rektumsresektion
75 j. ♀	22.04.2005	Colon Ca	Hemicolektomie

5x IMAC bei Sigmadivertikulitiden

Patient	Datum	Diagnose	OP
66 j. ♂	28.04.2005	Sigmadivertikulitis	Sigaresektion
61 j. ♂	24.11.2005	Sigmadivertikulitis	Sigaresektion
69 j. ♂	09.12.2005	Sigmadivertikulitis	Sigaresektion
65 j. ♂	07.02.2006	Sigmadivertikulitis	Sigaresektion
65 j. ♂	26.10.2005	Divertikulitiden	Lap. Sigmaresektion

8x IMAC bei CED aus entzündeten und nicht entzündeten Bereichen

Patient	Datum	Diagnose	OP
36 j. ♀	15.06.2005	CU	Kolektomie
43 j. ♂	06.09.2005	CU	Prokto-Kolektomie
23 j. ♂	21.09.2005	CU	Prokto-Kolektomie
15 j. ♂	09.01.2006	MC, Konglomerattumor term. Ileum	Resektion
22 j. ♂	07.02.2006	MC mit Konglomerattumor	Resektion
52 j. ♀	19.04.2005	MC	Lap. Hemicolektomie
17 j. ♀	24.11.2005	entzündl. Sigmastenose bei MC	Sigmateteilresektion
18 j. ♀	11.01.2006	MC, Konglomerattumor Transversum	Kolonsegmentresektion

Monozyten, deren entzündungsspezifische Proteine direkt mit den Makrophagen verglichen wurden, wurden aus Spenderblut isoliert.

15x Blutmonozyten von CED-Patienten

Patient	Datum	Diagnose	Medikamente
37 j. ♀	12.06.2006	CED aktiv, Erythema	Steroide
51 j. ♂	12.06.2006	MC aktiv	Steroide
30 j. ♀	22.05.2006	MC aktiv, Aphthen	Steroide
41 j. ♀	26.05.2006	CED aktiv	keine Steroide
44 j. ♀	26.05.2006	CU aktiv	keine Steroide
23 j. ♀	21.06.2006	MC aktiv	keine Steroide
34 j. ♂	19.06.2006	CED aktiv	keine Steroide
60 j. ♂	19.06.2006	CED aktiv	keine Steroide
49 j. ♀	22.05.2006	CU Remission	Steroide
35 j. ♂	17.05.2006	CU Remission	Steroide
38 j. ♀	21.06.2006	MC Remission	Steroide
46 j. ♀	21.06.2006	MC Remission	keine Steroide

42 j. ♀	24.05.2006	MC Remission	keine Steroide
31 j. ♂	21.06.2006	MC Remission	keine Steroide
26 j. ♂	21.06.2006	MC Remission	keine Steroide

6x Blutmonozyten von gesunden Spendern, Kontrolle

In vitro differenzierte Makrophagen wurden aus leukapheretisch gewonnenen Monozyten generiert (4.1.4.).

6x *in vitro* differenzierte Makrophagen

4.1.1. Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Resektaten

Humane Lamina propria mononukleäre Zellen (LPMNZ) wurden aus chirurgischen Darmresektaten nach einem modifizierten Protokoll von Bull und Bookman gewonnen. Anschließend wurden aus den LPMNZ mittels magnetischer Zellsortierung Makrophagen isoliert. Die Isolation der LPMNZ beinhaltet das biochemische Ablösen der Epithelzellen vom Resektat, den enzymatischen Aufschluß der Lamina propria und das physikalische Abtrennen der nicht mononukleären Zellen.

Die 4–16 cm² großen Darmresektate wurden in 10 ml PBS von Stuhlresten gereinigt. Zur Abtrennung von Schleim und Muzinen wurde die Lamina propria in 1mM Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) in 10 ml PBS für 15 min bei 37°C geschüttelt (siehe Abbildung: 4.1). Die Rückstände wurden mechanisch entfernt und die Inkubation wiederholt. Zur Abtrennung von Epithelzellen und Krypten wurde die Lamina propria in 2mM EDTA in 10 ml *Hank's buffered salt solution* (GibcoTM HBSS mit CaCl₂ + MgCl₂, Invitrogen, Groningen, Niederlande) heftig geschüttelt und gevortext. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt und der Erfolg mikroskopisch kontrolliert.

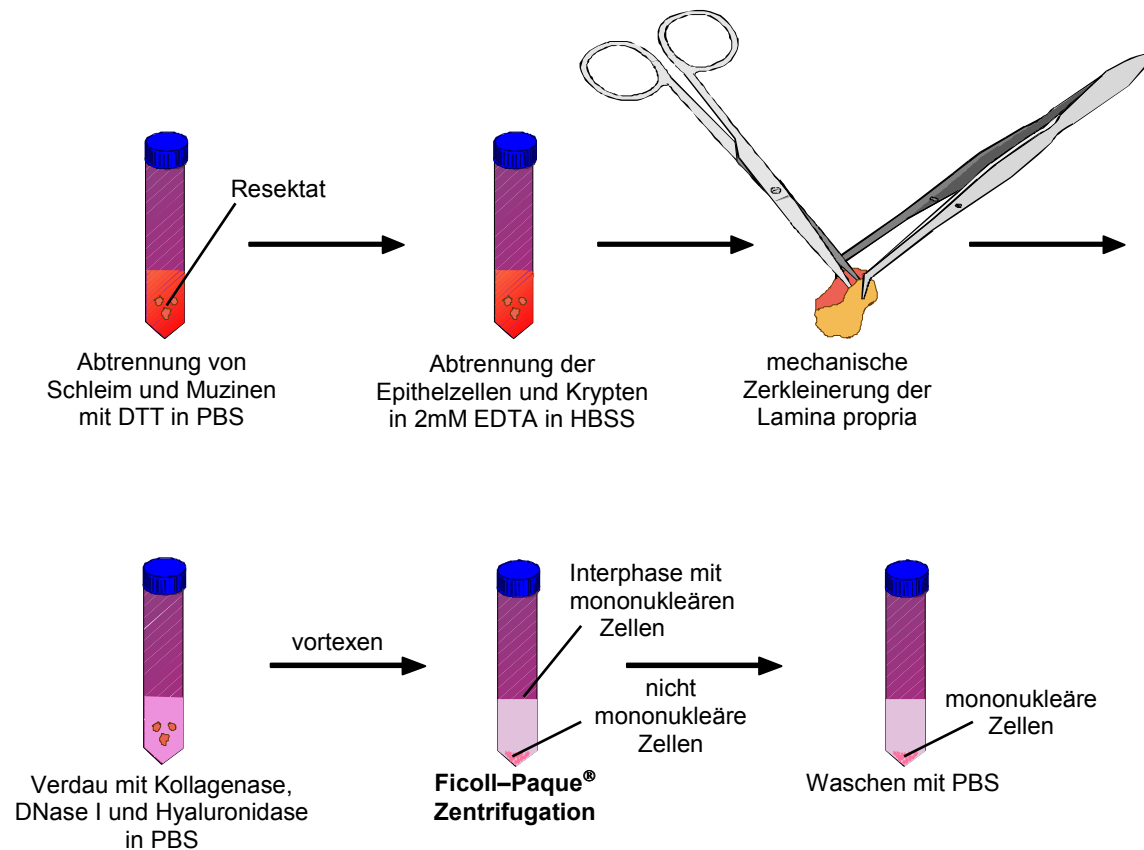


Abb. 4.1: Darstellung der Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Darmresektaten. Nach der Abtrennung von Schleim, Epithelzellen und Krypten wurde die Lamina propria mechanisch zerkleinert und verdaut. Mononukleäre Zellen wurden mit Ficoll Lymphocyte Separation Medium abgetrennt und mit PBS gewaschen.

Zum enzymatischen Aufschluß wurde die verbleibende de-epithelialisierte Lamina propria mechanisch zerkleinert und mit 1 mg/ml Kollagenase Typ I (=336 U/ml, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen), 0.3 mg/ml Deoxyribonuklease (DNase I, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 0.2 mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) in geeigneter Menge PBS für 45 min bei 37°C heftig geschüttelt. Nach ausgiebigem Vortexen wurden herausgelöste Zellen (durch ein Sieb) abgetrennt und in PBS gewaschen.

Mononukleäre Zellen (Makrophagen, Lymphozyten) wurden über Ficoll Lymphocyte Separation Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching) Zentrifugation von nicht mononukleären Zellen (Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) abgetrennt. Die Zellen wurden in 15 ml DMEM Kulturmedium (PAA Laboratories GmbH, Pasching) mit 10 % FCS (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) aufgenommen, über 15 ml Ficoll geschichtet und in einer Heraeus Zentrifuge bei 1800 rpm, bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die mononukleären

Zellen in der Interphase wurden mit PBS gewaschen. Aus den gewonnenen LPMNZ wurden mit Hilfe magnetischer Zellsortierung Makrophagen isoliert.

4.1.2. Isolation humaner Monozyten aus peripherem Blut

Die Isolation humaner Monozyten aus peripherem Blut entspricht prinzipiell der Isolation aus Resektaten (4.1.1).

Jeweils 15 ml eines 1:1 mit PBS verdünnten Spendervollbluts wurden über 15 ml Ficoll geschichtet und zentrifugiert. Die Interphase wurde mit PBS gewaschen und Blutmonozyten, entsprechend dem Protokoll zur Isolation aus Resektaten, mittels magnetischer Zellsortierung isoliert.

4.1.3. Magnetische Zellsortierung

Die Isolation intestinaler Makrophagen aus LPMNZ erfolgte mit Hilfe von immunomagnetischen MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), die an anti-CD33 Antikörpern haften. Magnetisch sortierte Makrophagen wurden zur polyA mRNA Isolierung oder in der Durchflußzytometrie eingesetzt.

LPMNZ wurden, zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen, in 200 µl MACS Puffer (3.6.1) aufgenommen und mit 2 µl humanem AB Serum 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen und anschließend, mit immunomagnetischen MicroBeads, die mit anti-CD33 Antikörpern beschichtet sind, erneut für 15 min bei 4°C inkubiert. Die LPMNZ wurden einmal gewaschen und in 1 ml MACS Puffer aufgenommen. Eine MS Separationssäule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde mit MACS Puffer gespült, mit einer 24 gauge Kanüle bestückt, in das magnetische Feld des SuperMACS Magneten (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gebracht und mit den Zellen beladen (Abbildung 4.2). MicroBeads markierte Makrophagen, die im magnetischen Feld am Säulenmaterial verblieben, wurden mit 1 ml MACS Puffer gewaschen, um nicht markiertes Material zu entfernen. Anschließend wurde die Separationssäule aus dem Magnetfeld entfernt und die noch vorhandenen Zellen wurden mit Hilfe eines Stoskolbens mit 500 ml MACS

Puffer aus dem Filter der Säule eluiert. Nach erneutem Einbringen in das magnetische Feld wurde die Zellsuspension wieder auf die Säule gelassen, mit 1 ml MACS Puffer gespült und eluiert.

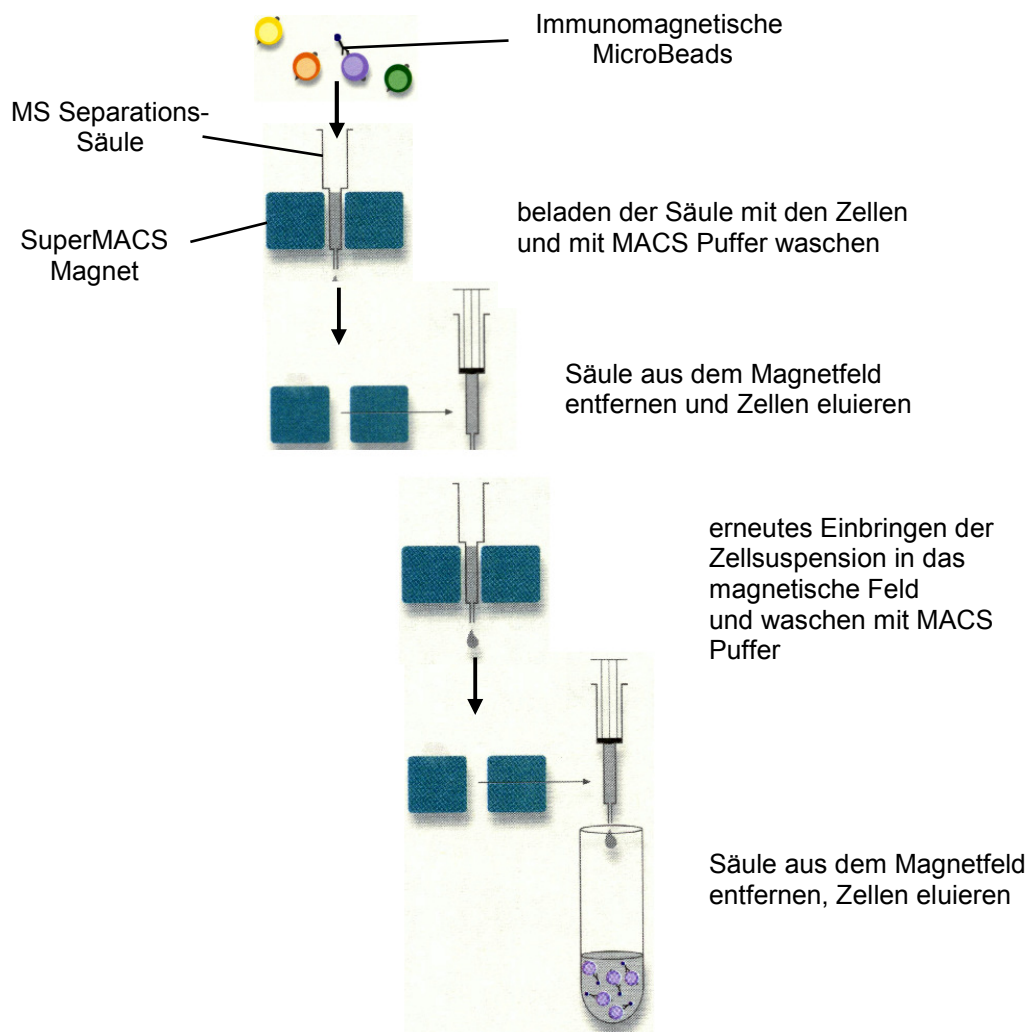


Abb. 4.2: Darstellung der magnetischen Zellsortierung mit Hilfe von MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in Anlehnung an das „user manual“. Mit anti-CD33 Antikörpern markierte LPMNZ werden auf eine Separationssäule geladen und in das Feld des SuperMACS Magneten gebracht. Markierte Zellen (Makrophagen) werden im ersten Reinigungsschritt angereichert und im zweiten Reinigungsschritt in eine frische Säule überführt und weiter aufgereinigt.

Zur weiteren Steigerung der Reinheit der Makrophagen im Eluat wurden die Zellen ein zweites Mal entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren über eine MS Separationssäule gereinigt. Das Makrophageneluat der zweiten Säule wurde für qualitative und quantitative RNA-Messungen eingesetzt.

Entsprechend diesem Protokoll wurde auch mit den Monozyten aus peripherem Blut verfahren.

4.1.4. Gewinnung und Kultivierung von Monozyten zur Herstellung *in vitro* - differenzierter Makrophagen

Monozyten wurden von Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Regensburg isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Isolation der Monozyten beinhaltet die Leukapherese, die Dichtegradientenzentrifugation und die Gegenstromzentrifugation. Anschließend wurden *in vitro* aus den Monozyten Makrophagen generiert und für die quantitative Real-Time-PCR (Taqman[®]) eingesetzt.

Gesunden Spendern zwischen 20 und 40 Jahren wurden mit Hilfe einer Leukapherese Leukozyten aus dem Blut entnommen. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque[®] (Pharmacia, Freiburg) wurden die mononukleären Zellen (MNZ) von den restlichen Leukozyten abgetrennt und dreimal in PBS gewaschen. Die so isolierten MNZ beinhalten Monozyten und Lymphozyten mit geringen Anteilen Thrombozyten und Erythrozyten.

Die Aufreinigung der Monozyten erfolgte durch eine Gegenstromzentrifugation (Elutriation). $1-10 \times 10^9$ Zellen wurden in einer 50 ml Kammer bei 2500 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, J6-MC). Unter fortwährendem Zufluß von *Balanced Salt Solution* nach Hank (HANK'S, 5100 ml, Biochrom, Berlin) mit 6 % autologem Plasma mit steigender Durchflußrate wurden definierte Fraktionen entnommen. Monozyten wurden als letzte Fraktion (letzten 800 ml) bei höchster Durchflußrate (111 ml/min) entnommen. Die Ausbeute an Monozyten lag je nach Spender zwischen 10 und 30 % der eingesetzten MNZ. Die Anzahl der CD14-positiven Zellen (Monozyten) wurde durchflußzytometrisch bestimmt und lag bei 85–95 %. Aus den so gewonnenen Monozyten wurden *in vitro* Makrophagen generiert.

4.1.5. *in vitro* Generierung von Makrophagen

Makrophagen wurden von Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Regensburg isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Durch Leukapherese und Elutriation (4.1.4) gewonnene Monozyten wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in Beuteln aus Teflonfolie (Teflonbeutel) bei 37°C und 7 % CO₂ kultiviert. Durch Zugabe von 2% AB-Serum für 7 Tage wurden aus den Monozyten Makrophagen generiert. Makrophagen adhäreren auf hydrophober Teflonfolie nur schwach. Durch Inkubation bei 4°C für 30 min wurden die Zellen abgelöst. Makrophagen wurden für Taqman[®]-Versuche eingesetzt.

4.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine mehrparametrische Analyse von Zellen. Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren oder Proteine (membranständig oder intrazellulär) fluoreszenzmarkiert wurden, können chemische und physikalische Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Dabei können sehr große Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit (bis zu 1000 Zellen/sek) analysiert werden.

Beim verwendeten Durchflusszytometer Coulter[®] EPICS[®] XL-MCL[™] (Coulter Immunotech, Krefeld) werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt. In einem Flüssigkeitsstrom werden die einzelnen Zellen durch eine Messküvette geschleust, auf die ein Laserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) trifft. Gestreutes Licht und Fluoreszenz werden zu Photomultipliern (PMT) geleitet und detektiert. Abb 3.3 zeigt den schematischen Aufbau des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter[®] EPICS[®] XL-MCL[™].

Die Photodiode für Vorwärtsstreulicht (FS) detektiert Licht, das in Strahlenrichtung von der Zelle gestreut wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulichtes gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SS) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert. Das SS-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzemission bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluoresceinisothiocyanat [FITC], R-Phycoerythrin [PE], Energy-coupled dye [ECD] und R-

Phycoerythrin-Cyanin [PC5]) wird wie das Seitenstreulicht im 90°-Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in Spektralbereiche bestimmter Wellenlängen aufgetrennt.

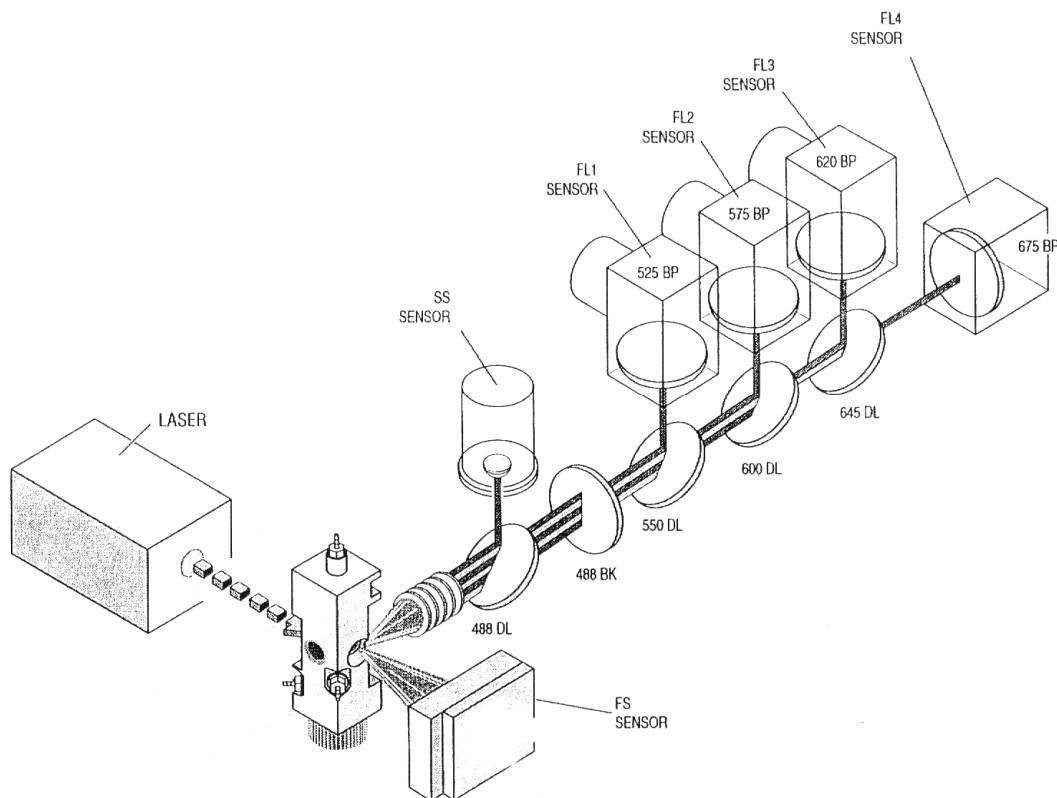


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflußzytometers Coulter® EPICS®XL-MCL™ in Anlehnung an das “user manual” von Coulter, Immunotech (Krefeld). Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Sensormessbereich in nm (BP).

Verwendet man mehrere Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in ihrem Emissionswellenbereich überlagern, so muss die spektrale Überlappung ausgeglichen werden, um in einem Kanal nur die gewünschte Fluoreszenz zu detektieren. Hierzu verfügt das Durchflußzytometer über ein elektronisches Kompensationswerk.

Fluorochrom	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Fluoreszenz
FITC	495	525	Grün
PE	488	575	Orange-rot
ECD	488	625	Rot
PC5	488	670	Tief-rot

Für jede vermessene Zelle wird eine Datenbank angelegt. Dadurch ist es möglich, Zellsubpopulationen einer Messung unabhängig voneinander zu betrachten und zu analysieren. Zellpopulationen können im Histogramm oder, bei Auftragung von zwei gemessenen Parametern, als Dot Plot dargestellt werden. Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software Win.MDI-2.6 (J. Trotter) durchgeführt.

In dieser Arbeit erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der magnetisch isolierten Makrophagen, um deren Reinheit zu bestimmen. Zunächst erfolgte ein Blockierschritt mit einer 1:1500-Verdünnung Ziegen Serum für 30 min auf Eis. Die Makrophagen wurden anschließend auf zwei 1,5 ml Eppendorfcups aufgeteilt und die Markierung der Zellen erfolgte mit einem Antikörper, der gegen den CD33-Microbead-Antikörper gerichtet war (anti-Maus-IgG₁-PE, Caltag) bzw. mit einem Isotyp-AK (Ziegen IgG-PE, Caltag). Die Inkubation erfolgte für 15 min auf Eis. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS resuspendiert und sofort gemessen.

4.3. RNA-Isolation

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zelllysaten erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Spin-Protokoll (Abb. 4.4).

Zunächst wurden etwa 6×10^6 Zellen in je 350 μ l RLT-Puffer (mit β -Mercaptoethanol) aufgenommen und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mit einer 20 gauge Kanüle lysiert. Die Zelllysate konnten nun bis zur eigentlichen RNA-Isolation bei -80°C gelagert werden.

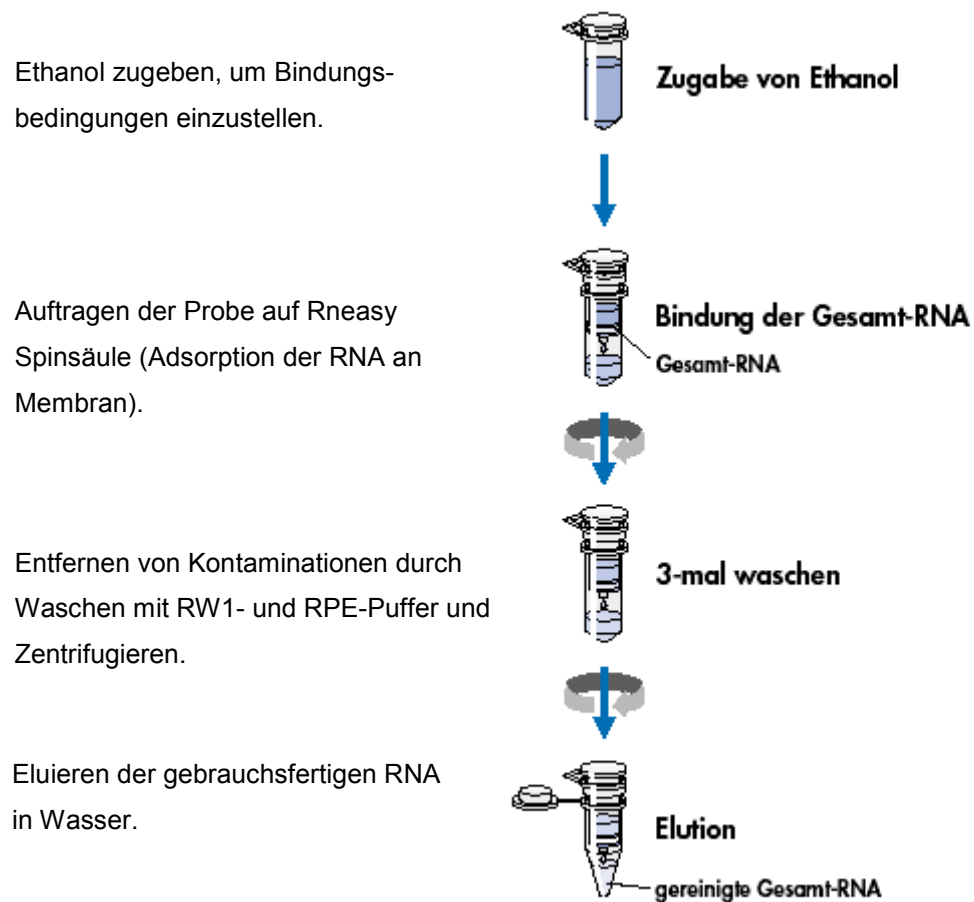


Abb. 4.4: Darstellung der Gesamt RNA-Isolation mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) in Anlehnung an das „user manual“

Um die RNA zu isolieren, wurden die Lysate aufgetaut und zur Homogenisation mehrmals durch eine Spritzenkanüle aufgezogen. Anschliessend gab man 350 μ l 70%igen Ethanol zu den Lysaten und mischte gut. Das Lysat wurde nun auf RNeasy Mini Säulen übertragen und bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert.

Um eine Kontamination der RNA-Probe mit DNA zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 350 μ l RW1-Puffer auf die Säule gebracht und mit 8 000 g für 15 Sekunden abzentrifugiert. Anschließend wurden 10 μ l DNase-I-Stammlösung mit 70 μ l RDD-Puffer vermischt, auf die Säulenmembran pipettiert und 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden weitere 350 μ l RW1-Puffer aufgetragen und für 15 Sekunden mit 8000 g zentrifugiert.

Für einen weiteren Waschschrift wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden. Nachdem nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert wurden, erfolgte die Zentrifugation bei 8000 g für zwei Minuten, um die Membran trocken zu zentrifugieren.

Um die RNA von der Säule zu eluieren wurden 50 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und es erfolgte eine nochmalige Zentrifugation bei 8000 g für eine Minute. Der Durchfluss wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und enthielt die RNA.

4.4. RNA 6000 Pico Assay

Die isolierte Gesamt-RNA (4.3) wurde mit Hilfe des RNA 6000 Pico LabChip® Kits (Agilent Technologies, Waldbronn) analysiert. Mit dieser Methode können sehr kleine Proben von RNA auf ihre Integrität geprüft werden als auch die Menge der isolierten RNA abgeschätzt werden.

Zunächst wurden 550 µl der RNA 6000 Pico gel matrix auf eine Spin-Säule geladen, bei 1500 g 10 min lang zentrifugiert und das filtrierte Gel anschließend in 65 µl Aliquots aufgeteilt. Nach der Zugabe von 1 µl RNA 6000 Pico Farbstoff Konzentrat zu einem der Gel-Aliquots wurde die Mischung gevortext und mit 13000 g für 10 min zentrifugiert. Ein RNA 6000 Pico Chip wurde zuerst mit dem Gel-Farbstoff-Gemisch mit Hilfe der Chip-Ladestation beladen, danach wurden die Conditioning-Lösung und der Marker hinzugefügt. Je 1 µl der RNA 6000 Leiter (Ambion, Huntingdon, UK) und der RNA-Proben wurden in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Nach 1 min im Vortexer wurde der Chip in den Agilent 2100 Bioanalyser eingesetzt und das Programm gestartet.

4.5. RT-PCR

Zum Nachweis spezifischer mRNA in intestinalen Makrophagen wurde nach der mRNA-Isolation aus den Zellen eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Dies geschah mit dem *ReverseTranscription System* von Promega. Pro Probe wurden 9,5 µl der erhaltenen mRNA in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz für die reverse Transkriptase sah wie folgt aus:

RNA	9,5 µl
MgCl ₂	4 µl
10x Puffer	2 µl
dNTPs	2 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Oligo (dT _s)	1 µl

Die mRNA wurde zunächst ohne die anderen Komponenten für zehn Minuten bei 70°C inkubiert. Nachdem die restlichen Komponenten zugegeben wurden, erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 42°C, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 95°C.

4.6. Gene Checker™ Kit

Die erhaltene cDNA wurde auf ihre Integrität mit Hilfe des Gene Checker™ Kits untersucht. Es wurden dabei fünf Komponenten von drei Haushaltsgenen herangezogen: Aktin 5', Aktin 3', Clathrin 2K, Clathrin 6K und GAPDH. Der PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

cDNA	1 µl
Advantage [®] -Polymerase	1 µl
Puffer 10x	5 µl
dNTPs	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
H ₂ O	40 µl

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

5 min	95°C	
30 sek	95°C	} 40 x
30 sek	55°C	
30 sek	72°C	
7 min	72°C	
	4°C	

Der gesamte PCR-Ansatz wurde zur Kontrolle auf ein 1,2 %iges Agarosegel (Invitrogen) aufgetragen und unter UV-Licht fotografiert. Die Größen der einzelnen Haushaltsgene waren wie folgt:

5' Aktin	1 000 bp
3' Aktin	720 bp
Clathrin 2K	550 bp
Clathrin 6K	570 bp
GAPDH	540 bp

4.7. Real-Time-PCR (Taqman®)

Die jeweiligen Proteasom-Unterheiten wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert (3.3.2). Innerhalb der Primer lag der Bindebereich einer genspezifischen Sonde, die an ihrem 5' Ende kovalent an einen Reporter-Farbstoff gebunden war: für die Proteasome-Untereinheiten war das 6-FAM, für das Haushaltsgen GAPDH handelte es sich um VIC. Am 3' Ende der Sonde war der Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) kovalent gebunden. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer Express 1.5 Software (PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) gefunden und durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Primer für GAPDH wurden durch die Firma PE Applied Biosystems hergestellt. Der Taqman-Mix wurde ebenfalls von der Firma PE Applied Biosystems bezogen.

Eine Reaktion wurde in einem Volumen von 20 μl durchgeführt, wobei die cDNA-Menge für jede Probe im Dreifachansatz bestimmt wurde. Die Komponenten eines Ansatzes waren die Folgenden:

Taqman-Master-Mix	10 μl
Primer forward (18 μM)	1 μl
Primer reverse (18 μM)	1 μl
Sonde (5 μM)	1 μl
cDNA	4 μl
H ₂ O	3 μl

Die Ansätze wurden in einer 384-Well-Platte (Abgene, Epsom, UK) mit dem ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems) gemessen. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

2 min	50°C	
10 min	95°C	
15 sek	95°C	} 45 x
1 min	60°C	

Das Prinzip des Taqman[®] ist Folgendes (Abb. 4.5): Die beiden Primer und die dazwischenliegende Sonde binden spezifisch an einen DNA-Abschnitt der cDNA. Der Reporter-Farbstoff an der Sonde leuchtet durch die räumliche Nähe zu dem Quencher nicht. Durch die 5'-Exonucleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde abgebaut und der Quencher kann durch die räumliche Trennung das Leuchten des Farbstoffes nicht mehr unterdrücken. Diese Zunahme des freien Farbstoffes wird gemessen und somit kann durch spezielle Software auf die relative Menge der in der Probe vorhandenen cDNA zurückgerechnet werden.

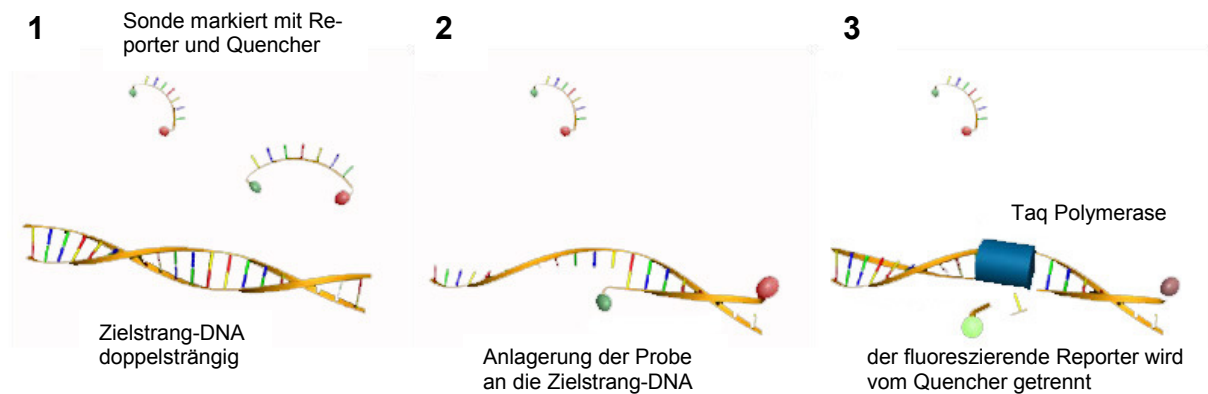


Abb 4.5: (1) Die Fluoreszenz des Reporters wird bei intakten TaqMan[®]-Sonden durch einen Quencher unterdrückt. (2) Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. (3) Durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird der Quencher räumlich vom Farbstoff getrennt, die Fluoreszenz des Reporters wird messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an.¹⁰⁰

Datenanalyse

Die während der 45 Zyklen freiwerdende Menge des Reporter-Farbstoffes wurde mittels der Sequence Detector Software SDS 2.0 (PE Applied Biosystems) gemessen. Die Fluoreszenz wurde gegen die Zyklenzahl aufgetragen. In der exponentiellen Phase der Kurve wurde ein Detektionsschwellenwert für die Fluoreszenz ermittelt und die Zyklusnummer (Ct) wurde daraus errechnet. Die Ct-Werte von GAPDH wurden von den Ct-Werten des zu untersuchenden Gens abgezogen:

$$dCT = Ct(\text{Gen}) - Ct(\text{GAPDH})$$

Der Durchschnitt der dCt-Werte wurde errechnet und potenziert (dCT^2). Von diesem Wert wurde der Kehrwert gebildet ($1/dCT^2$). Auf diese Weise konnte der cDNA-Gehalt des Gens, in Bezug auf GAPDH, der verschiedenen Patienten direkt miteinander verglichen und in einer Tabelle zusammengefasst werden.

4.8. Immunhistochemische Färbemethode

Zum Nachweis der Expression zellulärer Oberflächenmarker und intrazellulärer Chemokine und Enzyme wurden ca. 4µm dicke Paraffinschnitte von intestinaler Mukosa von Patienten mit oder ohne chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angefertigt und immunhistochemisch gefärbt.

Patient	Datum	CED/Ko	Diagnose/OP
73 j. ♂	21.10.2002	Ko	Rektumexstirpation
50 j. ♀	29.10.2002	Ko	Sigmadivertikulose
53 j. ♂	03.06.2003	Ko	entzündliche Sigmastenose
64 j. ♀	29.10.2003	Ko	Sigmadivertikulitis
71 j. ♀	03.11.2003	Ko	Stenosierte Sigmadivertikulitis
60 j. ♂	06.04.2004	Ko	Hemikolektomie links
48 j. ♀	08.04.2004	Ko	Lap. Sigmaresektion
27 j. ♂	30.10.2002	MC	MC Ileozökalresektion
39 j. ♂	16.12.2002	MC	MC Ileozökalstenose, Ileozökalresektion
51 j. ♀	16.06.2003	MC	MC, subtotale Kolektomie
36 j. ♂	25.06.2003	MC	MC Stenose, Kolonsegmentresektion
20 j. ♂	20.08.2003	MC	MC, Kolonresektion, Ileozökalresektion
39 j. ♂	21.08.2003	MC	MC, Anastomosenresektion, Fistelexzision
23 j. ♂	14.11.2003	CU	Prokto-Kolektomie
46 j. ♂	20.01.2004	CU	Prokto-Kolektomie
44 j. ♂	16.04.2004	CU	Stenose, Transversumresektion
23 j. ♂	28.06.2004	CU	Kolektomie
56 j. ♀	09.08.2004	CU	Kolonnachresektion
45 j. ♂	18.10.2004	CU	Loop-Ileostomie, Prokoto-Kolektomie

Das Immunoperoxidase-System ABC-Elite der Firma Vector (Burlingame, USA) wurde als Standardmethode für die Immunhistochemie auf Darmgewebe verwendet. Die Färbung mit dem Reagenz Vector[®] Nova Red[™] (Vecto Laboratories) ergab einen roten Farbton.

Das Paraffin wurde durch Inkubation der Schnitte im Sterilisator bei ca. 70°C für 15 min herausgeschmolzen und anschließend durch Spülen der Objektträger mit einer absteigenden Xylol-Ethanolreihe völlig entfernt.

Danach wurden die Schnitte im Wasserbad bei 97°C für 30 min in Target Retrieval Solution, Ready-to-use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert um die Antikörper-Bindestellen freizulegen. Sobald die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde mit dem DAKO Pen für Immunhistochemie (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) ein die Gewebeprobe umschließender Kreis aus wasser-abstoßendem und acetone- und alkohol-unlöslichem Material auf den Objektträger gezeichnet.

Um die Aktivität der endogenen Peroxidasen der Zellen im Gewebeschnitt zu senken, wurde der Objektträger für 30 min in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung (Merck KGaA, Darmstadt) inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte dreimal für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte in 1% BSA/PBS Blockierlösung für eine halbe Stunde inkubiert.

Alle folgenden Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Der gewebespezifische Primärantikörper wurde in 1%iger BSA/PBS-Lösung verdünnt. 100 µl Primärantikörper-Lösung wurden auf den Gewebeschnitt pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Antikörper-Isotypenkontrolle. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen.

Das Gewebe wurde anschließend mit einem biotinyliertem Zweitantikörper, der gegen den gewebespezifischen Primär-Antikörper gerichtet war, in 1%iger BSA/PBS Lösung für eine Stunde inkubiert und danach wiederum dreimal für fünf Minuten mit 1x PBS-Lösung gespült. Als nächstes wurden je 100 µl der vorbereiteten Streptavidin-Peroxidase-Lösung (ABC-Kit, Vector®) auf die Gewebeproben pipettiert, die 30 min Einwirkzeit benötigt hat, und anschließend durch dreimaliges Waschen für je 5 min mit 1x PBS Lösung entfernt wurde.

Anschließend wurde das Gewebe mit 100 µl Peroxidase-Substratlösung (Vector® NovaRed™) versetzt und unter visueller Kontrolle bei RT inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität positiv gefärbter Zellen wurden die Objektträger fünf bis zehn Minuten mit PBS gespült, um die Färbereaktion abzustoppen.

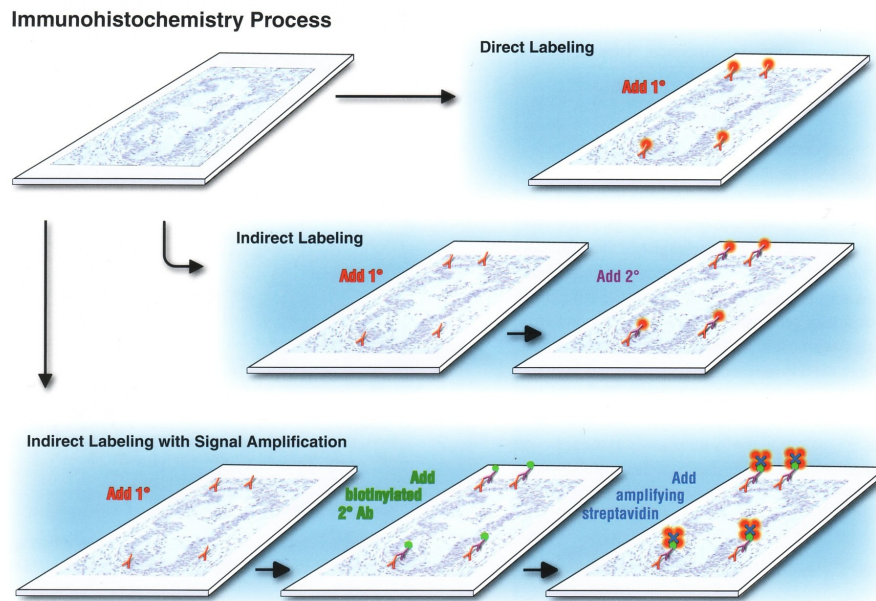


Abb. 4.6: Prinzip der Immunhistochemie. Aus (101).

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem wässrigen Eindeckelmedium (biomeda, Foster City, CA, USA) und einem Deckgläschen versiegelt und mikroskopisch ausgewertet.

4.9. Quantitative Messung von Protein

4.9.1. Probengewinnung

Biopsate von entzündeten und nicht entzündeten Därmen wurden in 500 µl RIPA-Puffer (1x), versetzt mit einer Tablette Complete Mini (Roche, Mannheim), gegeben, zerkleinert und anschließend 30 min auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurde die Gewebeprobe 5 min lang bei 4°C und 4500 rpm zentrifugiert, der Überstand danach abgezogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Gesamtproteinlysate von Kontrollen:

Patient	Datum	Diagnose
65 j. ♀	16.01.2006	Sigmakarzinom, Resektion
30 j. ♀	17.01.2006	Slow transit obstipation
37 j. ♀	18.01.2006	Sigmakarzinom
♂	23.02.2006	Rektumkarzinom, Rektumresektion
68 j. ♀	06.03.2006	Zökumadenom, Polyp, Ileozökalresektion
63 j. ♂	15.03.2006	keine CED, Entzündung, Koloskopie und Biopsie
34 j. ♂	16.03.2006	keine CED, keine Entzündung, Koloskopie und Biopsie
58 j. ♀	16.03.1006	Rektumkarzinom
67 j. ♂	28.03.2006	Rektumkarzinom

Gesamtproteinlysate von CED-Patienten

Patient	Datum	Diagnose
46 j. ♂	16.03.2006	CU, geringe Entzündung
19 j. ♀	11.01.2006	MC mit Konglomerattumor Transversum
22 j. ♂	07.02.2006	MC mit Konglomerattumor
42 j. ♀	14.03.2006	MC, mäßig bis starke Entzündung, Stenose
48 j. ♀	16.03.2006	MC Stenose der Ileotransversostomie
33 j. ♂	16.03.2006	MC, geringe Entzündung
32 j. ♀	28.03.2006	MC, Stenose stark entzündet
16 j. ♂	09.01.2006	MC mit Konglomerattumor term. Ileum

4.9.2. Proteingehaltbestimmung (BCA-Test nach Pierce)

Bei der Proteingehaltbestimmung wird Cu^{2+} (copper (II) sulfat pentahydrate 4% (w/v) solution, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) in alkalischer wässriger Lösung durch Proteine zu Cu^{1+} reduziert, das einen farbigen Komplex mit jeweils zwei Molekülen bicinchonic acid solution (BCA, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) bildet. Dazu wurden 10 μl Probe mit 200 μl BCA: Cu^{2+} (50:1) Mischung für 30 sec geschüttelt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend mit einem Absorptionsspektrometer (ELISA-Reader Emax) bei 562 nm vermessen.

Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch die Messung einer Konzentrationsreihe einer BSA-Standardlösung erstellt. Durch Auftragung der Absorption gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe erhielt man eine Eichgerade, aus der der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden konnte.

4.9.3. Western Blot

Zunächst wurden die Proben anhand der Messergebnisse des BCA-Tests durch Verdünnung mit DEPC-H₂O auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht.

Um eine Oxidation der Proteine zu verhindern, wurde folgender Ansatz mit einem reduzierenden Agens vorbereitet, der anschließend im Thermoblock auf 95°C 10 min lang inkubiert wurde:

Proteinprobe	26 µl
NuPAGE [®] Loading Buffer	10 µl
NuPAGE [®] Reducing Agent (10x)	4 µl

Nach diesem Schritt wurden je 40 µl der Proben in die Taschen eines 4-12 %igen Bis-Tris-Gels (NuPAGE[®], Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert und in einer mit MES-Puffer (3.6.3) gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die Proteine auf dem Gel wurden anschließend unter Verwendung von Transfer-Puffer (3.6.3) auf eine Nitrocellulose-Membran (Invitrogen, Karlsruhe) übertragen, die dann für den Proteinnachweis verwendet werden konnte.

Zunächst wurden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen geblockt, indem die Membran eine halbe Stunde in PBS mit 5 %igem Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde eine weitere halbe Stunde mit Western Blot - Waschpuffer gespült.

Der erste Antikörper wurde daraufhin in einer Konzentration von 1:1000 in die Blockierlösung gegeben und die Membran darin eine Stunde lang inkubiert bevor sie wiederum ½ Stunde lang mit Waschpuffer gewaschen wurde. Danach wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (3.4) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS / 5% Magermilchpulver

zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die eigentliche Nachweisreaktion mit dem ECL-Reagenz.

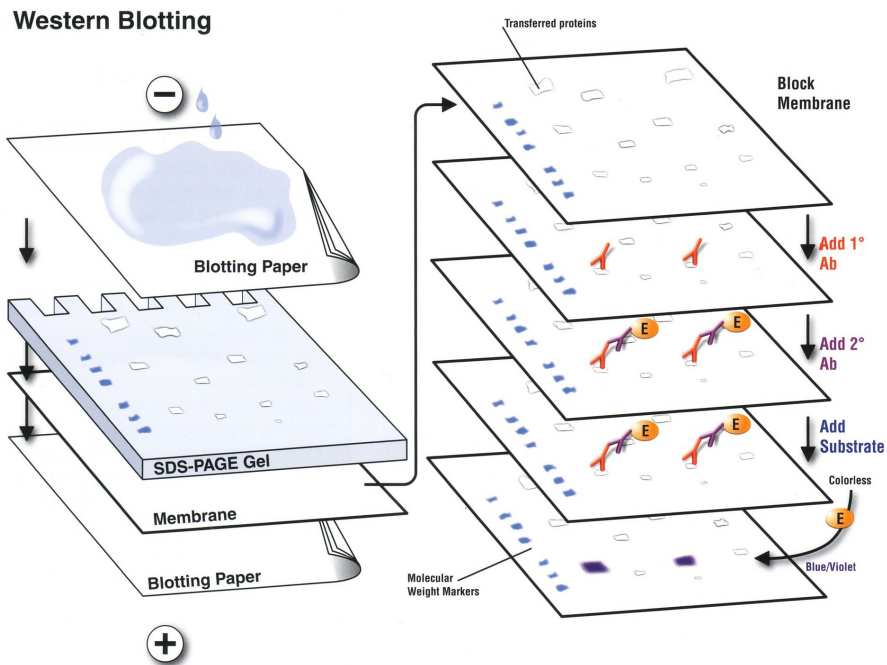


Abb. 4.7: Prinzip des Western Blots. Aus (102).

Um die Membranen für weitere Reaktionen verwenden zu können, wurden die gebundenen Antikörper mit Re-Blot Plus Western Blot Recycling Kit (Chemicon, Hampshire, UK) entfernt.

4.10. Proteasom-Funktionstest

Der Funktionstest basiert auf der Detektion des fluoreszierenden AMC-Moleküls. Nach proteasomaler Spaltung des Substrats Suc-LLVY-AMC (Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin) kann das freie AMC mit einem Fluoreszenzmessgerät mit einem 380/460 nm Filter vermessen werden.

Zunächst wurde eine Standardkurve mit AMC erstellt, um das Messgerät zu kalibrieren. Dann wurden die einzelnen Biopsielysate mit dem Substrat inkubiert und auf ihre Proteasomenaktivität hin untersucht und die Fluoreszenzwerte gegen die Gesamtproteinmenge aufgetragen.

5. Ergebnisse

5.1. Aufreinigung von intestinalen humanen Makrophagen

Makrophagen, die sich im Intestinum ausdifferenziert haben, verfügen über einen spezifischen Phänotyp, der in dieser Weise in keinem anderen menschlichen Organ zu finden ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation von Proteinen des Immunproteasoms bei der Differenzierung intestinaler Makrophagen zu untersuchen, basierend auf Studien, die beweisen konnten, dass ausdifferenzierte intestinale Makrophagen bezüglich der Expression immunmodulatorischer Oberflächenantigene^{101,102} und der Sekretion entzündungs-induzierender Botenstoffe¹⁰³ im Gegensatz zu Blutmonozyten einen anergen Phänotyp entwickeln.

Hierfür wurden RT-PCR-Versuche mit mRNA von Makrophagen, die aus Darmresektaten gewonnen wurden, und mRNA aus *in vitro* differenzieren Makrophagen und Blutmonozyten durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die proteasomalen Untereinheiten ATPase 2, beta type 2, beta type 5, MECL-1 (beta type 2i) und LMP7 (beta type 5i) gelegt.

Dazu war eine Isolation und Aufreinigung intestinaler Makrophagen notwendig, wofür in der Arbeitsgruppe bereits ein etabliertes Protokoll bestand. Das Oberflächenantigen CD33 konnte als verlässlicher positiver Erkennungsmarker für intestinale Makrophagen bereits vor einiger Zeit etabliert werden¹⁰⁴ wodurch es möglich wurde, Makrophagen in großer Reinheit aus Darmmukosa zu extrahieren. Es wurden Proben aus Darmresektaten von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU), Sigmadivertikulitis (Sigma) und ohne intestinale Entzündung (Kontrollen) entnommen. *In vitro* differenzierte Makrophagen, die man durch Ausreifung von Monozyten gewann, wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden Blutmonozyten von Patienten mit CED (CED Monozyten) und ohne CED (Monozyten) entnommen. Es sollte untersucht werden, ob die morphologischen Veränderungen, die die Makrophagen von an CED erkrankten Patienten aufweisen, bereits an den Vorläuferzellen, den Monozyten, nachzuweisen sind oder ob sich erst die fertig ausdifferenzierten Makrophagen von denen aus nicht entzündeten Resektaten unterscheiden.

Für die folgenden Versuche, die sich mit Genexpressionsanalysen beschäftigen, war es notwendig mit der mRNA einer besonders reinen Makrophagenpopulation zu arbeiten. Deshalb

sollte hier mittels der Durchflusszytometrie der Grad der Reinheit der isolierten Makrophagen untersucht werden.

Die Extraktion der Makrophagen aus dem Zellpool der Darmschleimhautzellen erfolgte mittels eines mit magnetischen Beads gekoppelten, gegen das Oberflächenantigen CD33 gerichteten Antikörpers. Ein weiterer PE-konjugierter Antikörper, der gegen den magnetisch markierten Primärantikörper gerichtet war, diente der Untersuchung von Reinheit und Spezifität der isolierten Makrophagen.

Auf den folgenden Abbildungen (Abb. 5.1) ist zu sehen, dass durch zweimalige Wiederholung der Separation intestinale Makrophagen in einer Reinheit von mehr als 90% erhalten werden konnten.

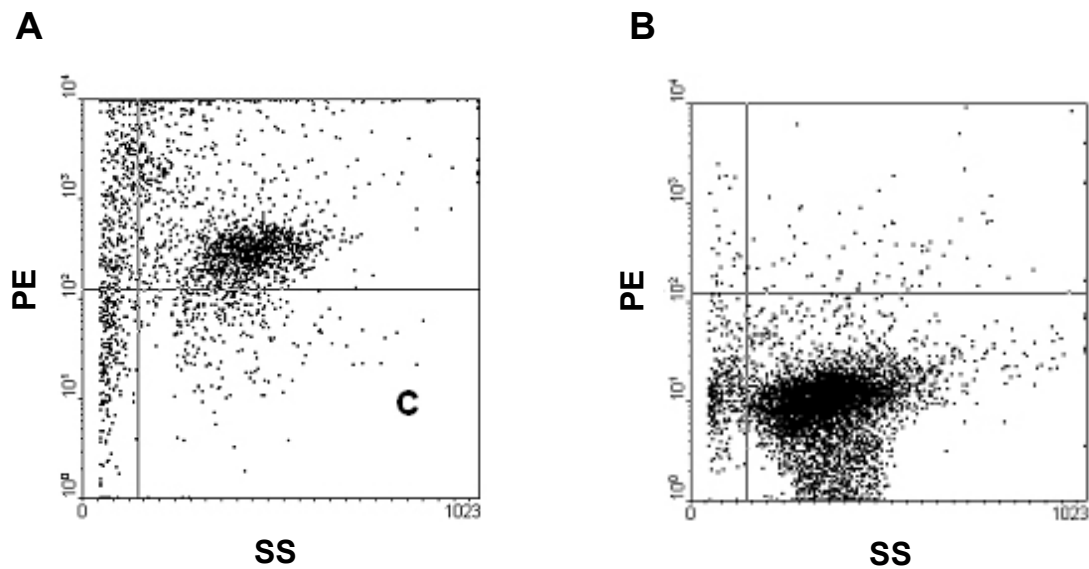


Abb 5.1: Extrahierte Makrophagenpopulation in der Durchflusszytometrie. Seitwärtsstreulicht (SS) und R-Phycoerythrin (PE). Die CD33 positiven Zellen zeigten nach zweimaliger Aufreinigung eine Reinheit von mehr als 90% (A). Die Isotypen-Kontrolle zeigte keine unspezifische Anfärbung (B).

5.2. RNA 6000 Pico Assay

Die Integrität der isolierten mRNA wurde mit Hilfe des RNA 6000 Pico LabChip® Kits (Agilent Technologies, Waldbronn) untersucht. Mittels eines Elektropherogramms lässt sich bestimmen, ob die mRNA bruchstückhaft oder intakt vorliegt (Abb. 5.2).

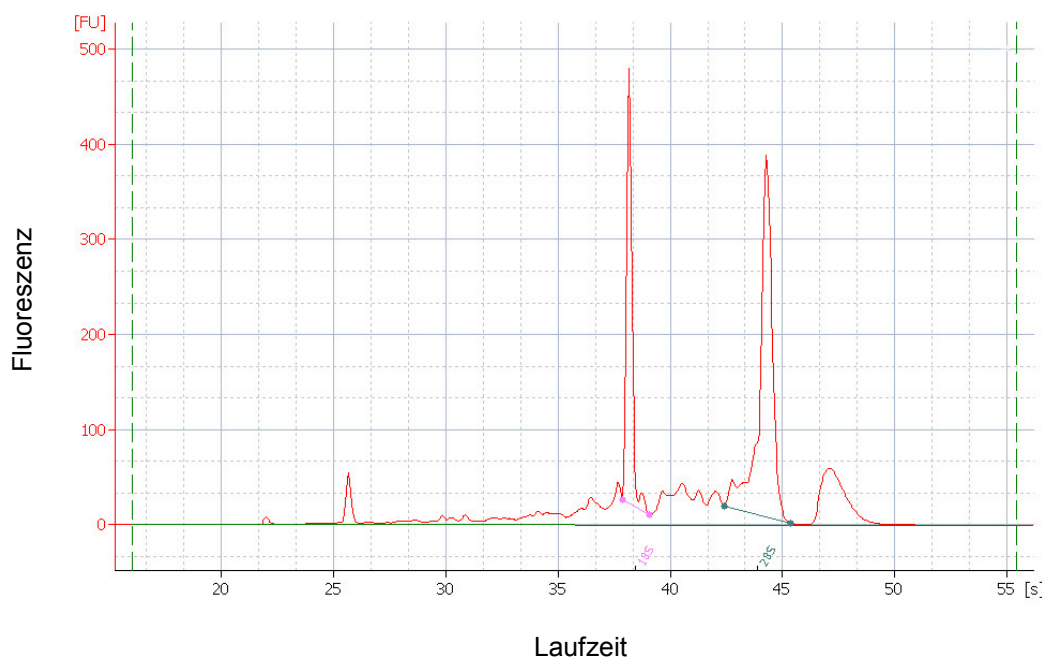


Abb 5.2: Die Abbildung zeigt die Merkmale eines erfolgreichen Laufs: einen kleineren Marker-Peak am Anfang und zwei große ribosomale Peaks. Für das Eukaryote Total RNA Assay werden die ribosomalen Fragmente 18S und 28S detektiert. Nach der Detektion wird die Ratio der Fragment-Bereiche berechnet und angezeigt. Die Abbildung ist repräsentativ für Makrophagen aus entzündeten und nicht entzündeten Resektaten.

Um die Konzentration der gesamten RNA zu berechnen, wird der Bereich unter dem gesamten Elektropherogramm integriert. Die RNA-Leiter, welche die Konzentration pro Fläche festlegt, wird verwendet, um die Werte unter dem Graphen in Konzentrationsangaben umzurechnen.

Des Weiteren gibt der Bioanalyser eine RNA integrity number (RIN) aus, die hilft, die Integrität der kompletten RNA Probe abzuschätzen. Auf diese Weise wird nicht länger nur über die Ratio der ribosomalen Banden bestimmt, wie intakt die mRNA ist, sondern durch die gesamte elektrophoretische Aufzeichnung der Probe, das heisst, es wird auch das

Vorhandensein von RNA-Bruchstücken detektiert und in die Berechnung mit einbezogen. Sie soll helfen, die Qualität der RNA objektiv zu beurteilen.

Die RIN des Beispielgraphen beträgt 8,7 bei einem maximal möglichen Wert von 10, der mit intakter RNA korrespondiert, und einem minimalen Wert von 1, der für degradierte RNA steht. Verwendbar sind RNA Proben mit einem RIN bis zu 6, ab 5 gilt die RNA bereits als partiell degradiert.¹⁰⁵ Die errechnete RNA Konzentration ist 2211 pg/ μ l. Die rRNA Ratio (18S/28S) beläuft sich auf 1,7.

5.3. Gelelektrophorese mit Gene Checker™ Kit

Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA mit dem Reverse Transcription System (Promega, Mannheim) wurde die Integrität des genetischen Materials noch einmal mit dem Gene Checker™ Kit (Invitrogen, Karlsruhe) überprüft. Bei den Proben wurden jeweils auf 3' Aktin, 5' Aktin, GAPDH, 6K Clathrin und 2K Clathrin kontrolliert. Die folgende Abbildung zeigt die auf Agarose-Gel aufgetragenen amplifizierten Genabschnitte unter UV-Licht Bestrahlung (Abb. 5.3).

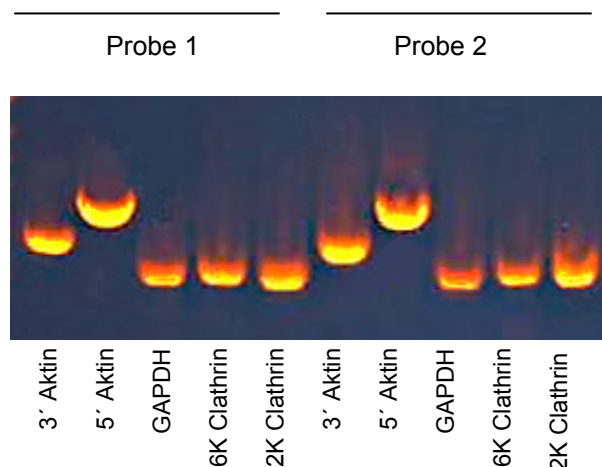


Abb 5.3: Die Expression der Haushaltsgene beispielhaft gezeigt an 2 Proben, aufgetragen auf 1,2 %iges Agarosegel und unter UV-Licht Bestrahlung fotografiert.

5.4. Quantifizierung der mRNA Expression

Nach der Sicherstellung der Integrität der isolierten mRNA wurde mittels quantitativer PCR die Expression der zu untersuchenden Gene geprüft.

Zunächst wurde mittels geeigneter Verdünnungsreihen der Primer versucht, die optimale Konzentration für die Amplifikation der RNA herauszufinden. Die Primer wurden dabei jeweils in Konzentrationen von 18 μ Molar, 6 μ Molar und 1 μ Molar in einer Dreifachbestimmung gegeneinander getestet. Folgendes Bild (Abb. 5.4) stellt beispielhaft die optimale Konzentration der Primer für ATPase 2 dar.

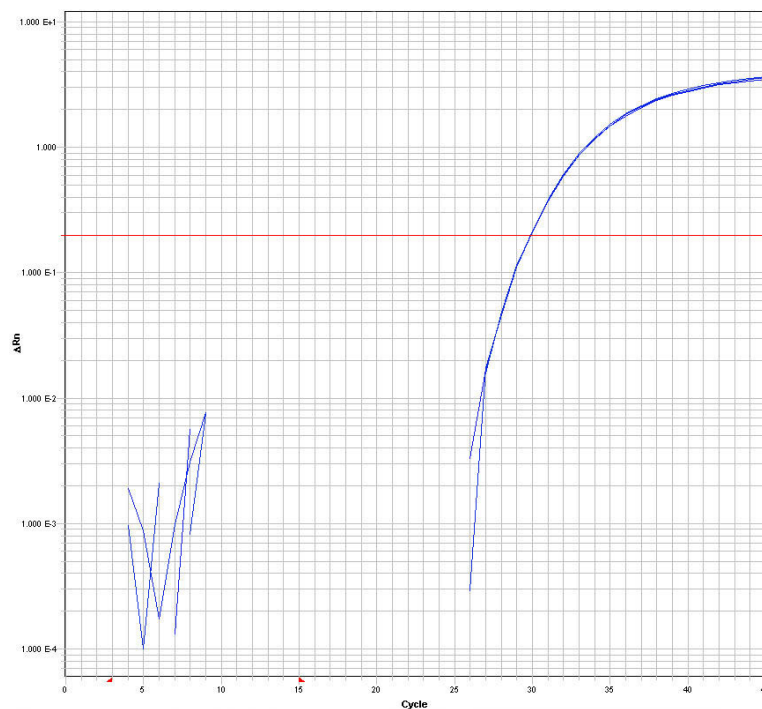


Abb 5.4: Sowohl der Forward- als auch der Reverse-Primer für ATPase 2 liegt in einer Konzentration von 6 μ Molar vor. Der gewünschte Genabschnitt wird bei allen drei Messungen bei genau 30 Zyklen detektiert.

Folgende Primerverdünnungen wurden für die RNA-Amplifikation ausgewählt:

Proteasomen-Untereinheit	Forward-Primer (μM)	Reverse-Primer (μM)
ATPase 2	6	6
Subunit beta type 2	18	18
Subunit beta type 5	6	18
Subunit MECL-1	18	18
Subunit LMP7	18	18

Anschließend wurden auch von der zu untersuchenden RNA Verdünnungsreihen hergestellt, um zu ermitteln, in welcher Menge das genetische Material in der quantitativen PCR eingesetzt werden muss, um gute Ergebnisse zu erzielen. Ausgangswert war eine RNA-Mindestkonzentration von 5 ng pro Well, die aufgrund der Meßergebnisse des RNA Pico-Assays hergestellt werden konnte. Danach wurde die Stammlösung auf 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 verdünnt. Die folgende Abbildung (Abb 5.5) zeigt eine Verdünnungsreihe der RNA von Blutmonozyten, die mit den Primern für ATPase 2 amplifiziert wurde. Die jeweiligen Werte wurden wiederum in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Verdünnung	RNA Konzentration pro Well (ng)	Zyklen
1:1	5	27,5
1:2	2,5	28,5
1:4	1,25	29,5
1:8	0,625	30,5
1:16	0,156	31,5
1:32	0,078	~32,5

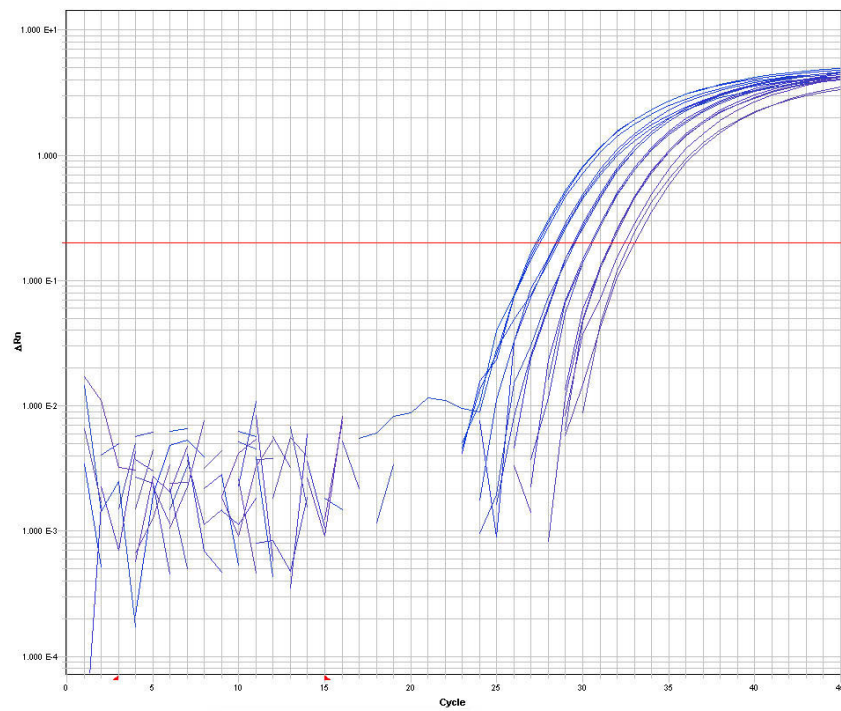


Abb 5.5: Je höher die Konzentration der cDNA, desto früher wurde das Signal der Taqman-Sonden detektiert. Bei einer Verdünnung von 1:8 wurde bei allen drei Messungen das Signal bei genau 30,5 Zyklen erfasst.

Auf der Basis dieser Untersuchungen wurde RNA in einer Konzentration von 0,625 ng pro Well mit den oben genannten Primerverdünnungen vermessen.

5.4.1. Quantitative Analyse der mRNA Expression von ATPase 2

Die ATPase 2 ist eine der sechs Proteasen mit Chaperon-ähnlicher Aktivität des 19S-Regulatorkomplexes. Dieser lagert sich an die α -Ringe des 20S-Proteasoms an und entfaltet die Protein-Substrate, so daß sie leichter dem proteolytischen Komplex in den β -Ringen zugeführt werden können. Die Antigenpräsentation kann so mit größerer Geschwindigkeit ablaufen, was die Immunantwort ankurbelt.

Zunächst wurde die mRNA Expression der ATPase 2 von jeder der isolierten Zellgruppen, d.h. die der IMACs aus entzündetem bzw. nicht-entzündetem Darm, der Monozyten und der *in vitro* differenzierten Makrophagen, miteinander verglichen. Bezogen auf die nicht entzündeten Kontroll-Makrophagen wurden die übrigen Makrophagen mit dem t-test daraufhin ausgewertet, ob ihre ATPase 2 - Expression signifikant höher liegt als die der Kontrollgruppe. In Abbildung 5.6 ist zu ersehen, dass zwischen der mRNA - Expression von ATPase 2 in der Kontrollgruppe, den *in vitro* differenzierten Makrophagen, der Patientengruppe mit den Sigmadivertikulitiden sowie der mit M. Crohn keine signifikanten Unterschiede bestehen (Ko vs. *in vitro* $p < 0,064$, Ko vs. Sigma $p < 0,37$, Ko vs. MC $p < 0,73$). Jedoch bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zu der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa (CU vs. Kontrollen $p < 0,5$).

Somit konnte bezüglich der ATPase 2 Werte das Ergebnis der der oben genannten Array-Gen-Expressionsstudie, bei der ebenfalls *in vitro* differenzierte Makrophagen mit IMACs aus normaler Mukosa verglichen wurden, nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression.

Verglichen mit den ATPase 2-Werten der Blutmonozyten weisen sowohl die IMACs der CU Patienten aber auch die IMACs aus MC Patienten deutlich höhere Werte auf (CU vs. Monozyten $p < 0,0009$, CU vs. CED Monozyten $p < 8,5 \cdot 10^{-9}$, MC vs. Monozyten $p < 0,001$, MC vs. CED Monozyten $p < 5,6 \cdot 10^{-9}$)

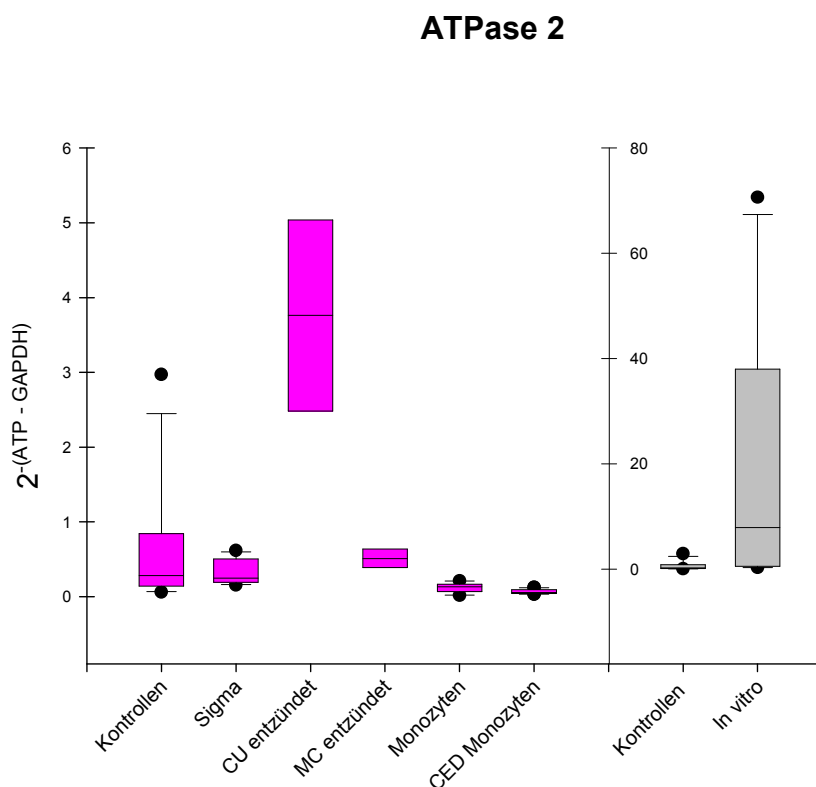


Abb. 5.6: Real-time-PCR (Taqman®) für ATPase 2: die mRNA Expression ist in Makrophagen von Patienten mit Colitis ulcerosa höher als in der Kontrollgruppe, den Sigmadivertikulitiden und den Patienten mit Morbus Crohn (CU vs. Kontrollen $p < 0,5$, CU vs. Sigma $p < 0,0005$). Auch gegenüber den Blutmonozyten zeigen CU-Makrophagen sigifikant erhöhte Werte (CU vs. Monozyten $p < 0,0009$, CU vs. CED Monozyten $p < 8,5 \cdot 10^{-9}$), aber auch die MC-Makrophagen exprimieren mehr ATPase 2 als Monozyten (MC vs. Monozyten $p < 0,001$, MC vs. CED Monozyten $p < 5,6 \cdot 10^{-9}$). Kein signifikanter Unterschied in der ATPase 2 Expression bestand hingegen zwischen in vitro differenzierten Makrophagen und CU- bzw. MC-Makrophagen (CU vs. in vitro $p < 0,44$, MC vs. in vitro $p < 0,20$). Prüfung auf statistische Signifikanz mittels t-Test.

Die folgenden beiden Diagramme (Abb 5.7) zeigen den Unterschied der ATPase 2 Expression in Makrophagen von Colitis ulcerosa (A) und Morbus Crohn (B) Patienten, wobei jeweils die Zellen aus den aktiv entzündeten Darmresektaten den Zellen aus Resektaten mit leichterem Krankheitsbild gegenübergestellt wurden. Bei beiden Erkrankungen war der Unterschied zwischen Makrophagen aus entzündeten und nicht entzündeten Proben signifikant (CU entzündet vs. CU nicht entzündet $p < 0,023$; MC entzündet vs. MC nicht entzündet $p < 0,018$). Daraus lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Entzündung des Darms und der Regulation der Expression der Proteasomenuntereinheit ATPase 2 ableiten, die positiv

miteinander korrelieren. Die Entzündungsreaktion regelt offensichtlich auch die Genexpression von ATPase 2 nach oben.

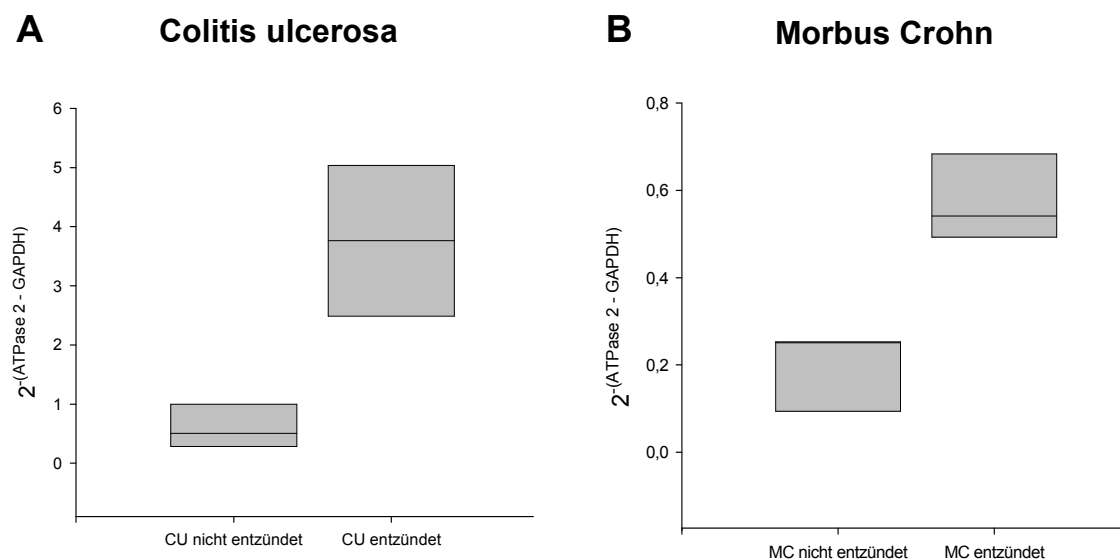


Abb. 5.7: ATPase 2 Expression in Patienten mit Colitis ulcerosa (A) und Morbus Crohn (B). Der Unterschied zwischen IMACs aus entzündeter und nicht entzündeter Mukosa war sowohl bei CU als auch bei MC signifikant (CU entzündet vs. CU nicht entzündet $p < 0,023$; MC entzündet vs. MC nicht entzündet $p < 0,018$). Untersucht wurden 2 Patienten mit aktiver und 4 Patienten mit inaktiver CU sowie je 3 Patienten mit aktivem und blandem MC. Bestimmung der p-Werte mittels t-Test.

Zusätzlich zu den intestinalen Makrophagen wurden Blutmonozyten von sechzehn Patienten mit CED isoliert. Acht Patienten litten an einer aktiven Entzündung (Erkrankungsschub), drei davon wurden mit Steroiden behandelt; von den 8 Patienten, die sich in Remission befanden, bekamen vier Steroide. Untersucht wurde, ob bereits in den Blutmonozyten von CED Patienten Unterschiede bezüglich der ATPase 2 Expression bestehen (Abb. 5.8).

Die Monozyten der Patienten mit aktiver Entzündung insgesamt zeigten gegenüber denen in Remission keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,56$). Auch die unterschiedlichen Zellgruppen einzeln betrachtet, zeigen keine relevanten Unterschiede bezüglich der ATPase 2 Expression. Die Expression von ATPase 2 scheint lediglich durch die Steroidmedikation etwas induziert zu werden.

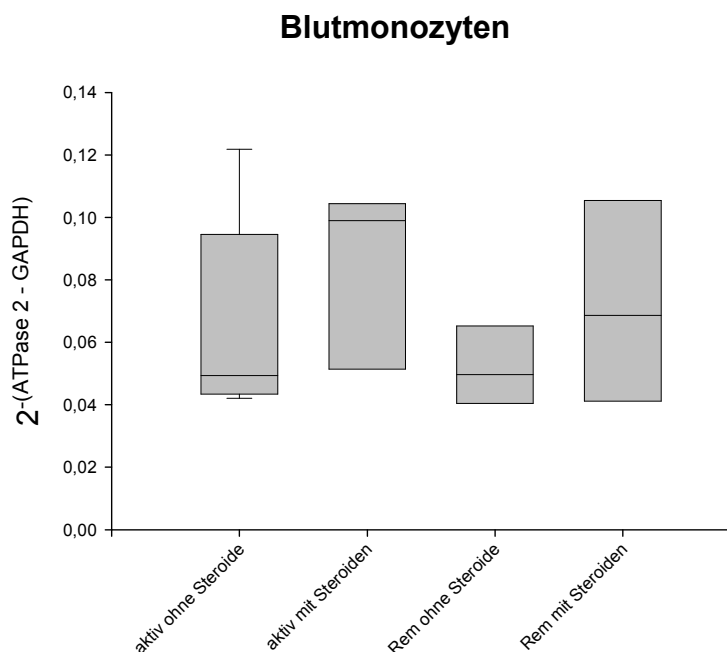


Abb. 5.8: Vergleich der Monozytengruppen von Patienten mit aktiver CED und in Remission mit Unterscheidung zwischen Steroidbehandlung und ohne Medikation. Die Unterschiede der entzündeten und nicht entzündeten Gruppe aufgrund der Steroidbehandlung waren nicht signifikant (aktiv ohne S. vs. aktiv mit S. $p < 0,67$, Rem mit S. vs. Rem ohne S. $p < 0,40$). Auch die beiden Steroidgruppen unterschieden sich nicht relevant ($p < 0,83$), ebensowenig wie die Gruppen ohne Steroidmedikation ($p < 0,44$). Ermittlung der p-Werte mittels t-Test.

5.4.2. Quantitative Analyse der mRNA Expression von Subunit beta type 2

Als Teil des proteolytischen Zentrums des konstitutiven Proteasoms spaltet Beta 2 Proteine bevorzugt nach basischen Aminosäuren und wird bei der Bildung von Immunproteasomen gegen die Untereinheit MECL-1 ausgetauscht. Die Expression der Proteasomen Untereinheit beta type 2 wurde bei den gleichen Zellgruppen gemessen (Abb 5.9). Sowohl die Colitis ulcerosa Gruppe als auch die Morbus Crohn Gruppe zeigten signifikant unterschiedliche Werte gegenüber den IMACs aus normaler Mukosa (CU vs. Kontrolle $p < 0,0001$ bzw. MC vs. Kontrolle $p < 0,016$). Keine relevanten Unterschiede bestanden zwischen den normalen IMACs, der Sigmadivertikulitis Gruppe und den normalen Monozyten (Kontrolle vs. Sigma $p < 0,55$, Kontrolle vs. Monozyten $p < 0,311$).

Die Makrophagen aus CED Mukosa wiesen statistisch signifikant höhere Werte auf als die Blutmonozyten (MC vs. Monozyten $p < 6 \cdot 10^{-5}$, MC vs. CED Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-9}$). Ebenso war in den *in vitro* differenzierten Makrophagen beta 2 in signifikant größerer Menge vorhanden als in der Kontrollgruppe und den Sigmadivertikulitiden (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,03$, In vitro vs. Sigma $p < 0,045$). Kein relevanter Unterschied fand sich zwischen *in vitro* differenzierten Makrophagen und der CU bzw. MC Gruppe (*in vitro* vs. MC $p < 0,24$, *in vitro* vs. CU $p < 0,44$).

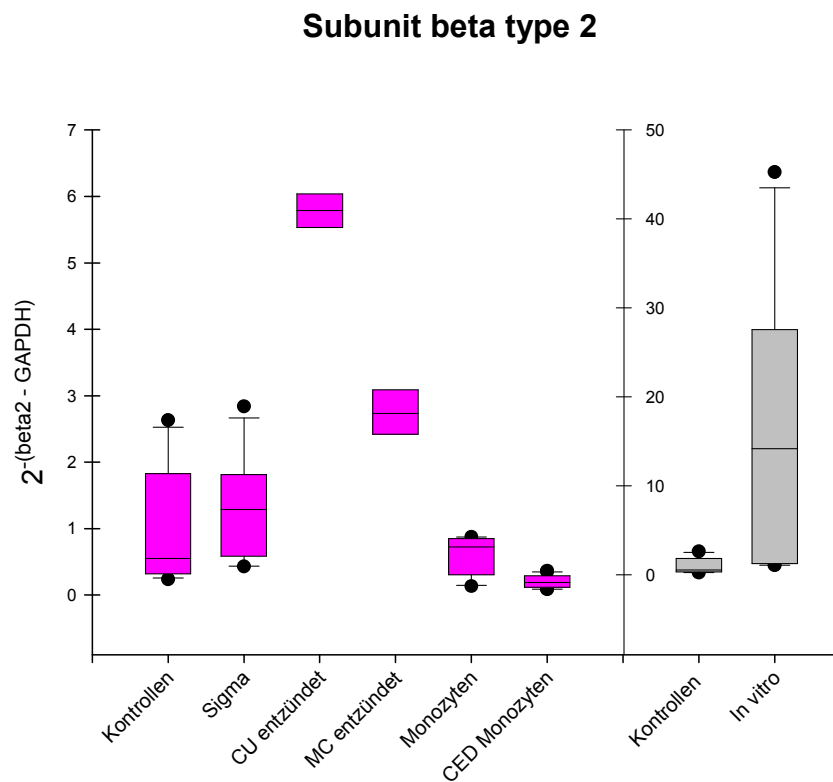


Abb 5.9: Vergleich der Subunit beta type 2 Expression. Die Werte der Makrophagen aus entzündeter Mukosa waren signifikant erhöht (CU vs. Kontrolle $p < 0,0001$, CU vs. Sigma $p < 0,0002$, CU vs. Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-6}$, CU vs. CED Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-9}$, MC vs. Kontrolle $p < 0,016$, MC vs. Sigma $p < 0,0284$, MC vs. Monozyten $p < 6 \cdot 10^{-5}$, MC vs. CED Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-9}$). In den *in vitro* differenzierten Makrophagen war eine höhere beta 2 Expression vorhanden als in den Kontrollen und den Sigmadivertikulitiden (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,03$, In vitro vs. Sigma $p < 0,045$). Die p-Werte wurden mittels T-Test bestimmt.

Die Makrophagen aus entzündeter Mukosa von Colitis ulcerosa (A) und Morbus Crohn (B) wiesen gegenüber denen aus weniger entzündeten Resektaten eine signifikant höhere beta 2 Expression auf (Abb. 5.10).

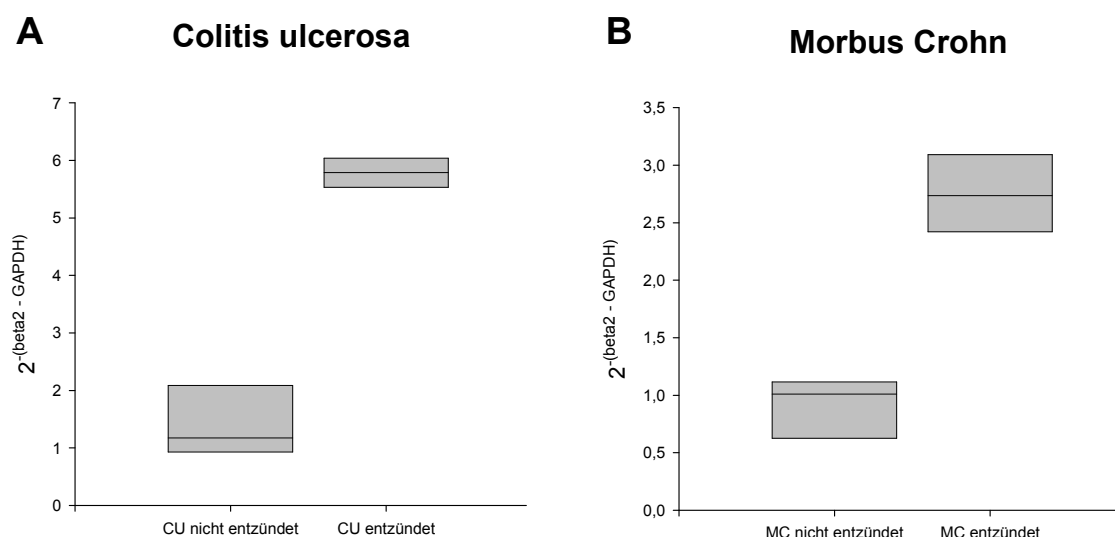


Abb. 5.10: Die Makrophagen der entzündeten CU Gruppe haben eine deutlich höhere beta 2 Expression als die aus der nicht entzündeten CU Proben (CU entzündet vs. CU nicht entzündet $p < 0,006$). Gleiches gilt für die Makrophagen aus der entzündeten Morbus Crohn Gruppe und den Makrophagen aus nicht entzündeten Crohn Resektaten (MC entzündet vs. MC nicht entzündet $p < 0,002$). Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mittels T-Test.

Analog zur Expression von ATPase 2 erbrachte ein Vergleich der sechzehn aus CED Patienten isolierten Blutmonozyten keine statistisch relevanten Unterschiede bezüglich der Subunit beta type 2 Expression (Abb. 5.11).

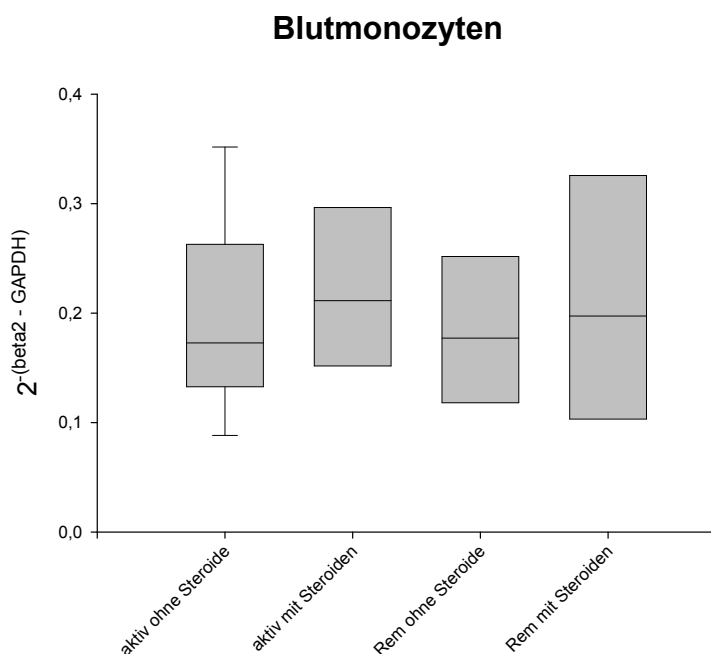


Abb. 5.11: Bezüglich der Subunit beta type 2 Expression war zwischen den unterschiedlichen Monozytengruppen kein signifikanter Unterschied vorhanden (aktiv ohne S. vs. aktiv mit S. $p < 0,75$, Rem ohne S. vs. Rem mit S. $p < 0,72$, aktiv ohne S. vs. Rem ohne S. $p < 0,84$, aktiv mit S. vs. Rem mit S. $p < 0,93$). Ermittlung der p-Werte mittels t-Test.

5.4.3. Quantitative Analyse der mRNA Expression von Subunit beta type 5

Beta5 ist eine Untereinheit des konstitutiven Proteasoms mit der Fähigkeit, Proteine bevorzugt nach hydrophoben Aminosäuren zu spalten. Analog zu beta2 wird sie im Immunproteasom gegen LMP7 ausgetauscht. Die Makrophagen aus normaler Mukosa zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zu denen der Sigmadivertikulitis-Gruppe und denen der an Morbus Crohn erkrankten Patienten bezüglich der Expression der Proteasomen Untereinheit beta type 5 (Kontrolle vs. Sigma $p < 0,46$, Kontrolle vs. MC $p < 0,49$).

Die *in vitro* differenzierten Makrophagen zeigten hingegen signifikant höhere Werte an beta 5 als die normalen IMACs (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,035$). Signifikant erhöht war auch die Genexpression in der Gruppe der Colitis ulcerosa Patienten gegenüber den normalen IMACs und denen der Sigmadivertikulitis-Gruppe (CU vs. Kontrollen $p < 0,002$, CU vs. Sigma $p < 0,002$) (Abb. 5.12). Die Werte der CU- und der MC-Gruppe waren gegenüber den Blutmonozyten signifikant erhöht (CU vs. Monozyten $p < 0,001$, CU vs. CED Monozyten

$p < 5 \cdot 10^{-9}$, MC vs. Monozyten $p < 0,007$, MC vs. CED Monozyten $p < 7 \cdot 10^{-6}$). Die beta 5 Expression in Monozyten von CED Patienten war gegenüber denen von Patienten ohne CED nicht signifikant erhöht.

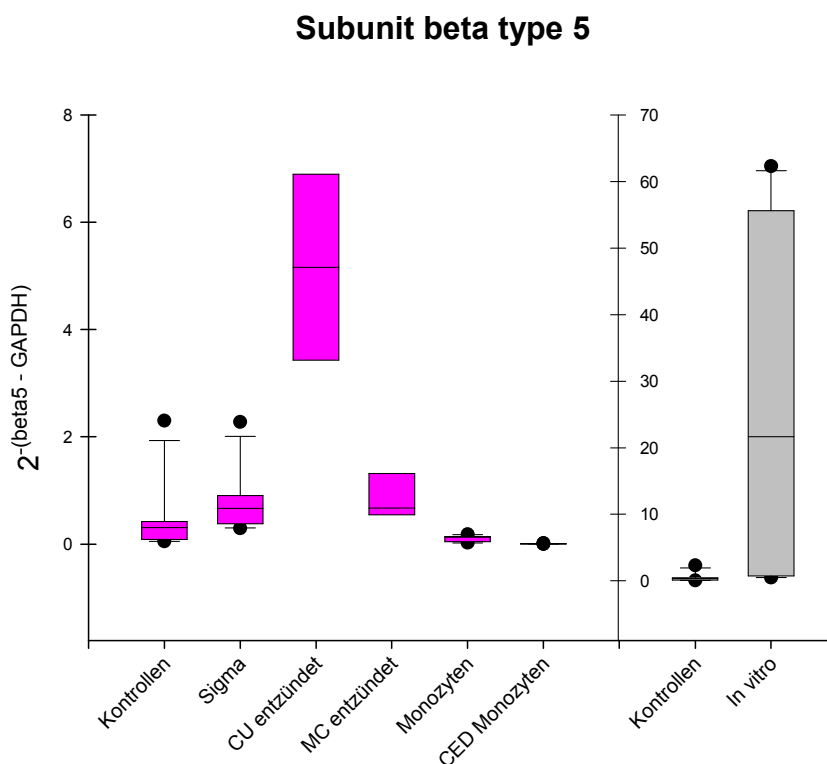


Abb. 5.12: Vergleich der Proteasome Subunit beta type 5 Expression: Die Makrophagen der CU-Gruppe wiesen signifikant höhere Werte gegenüber den Makrophagengruppen der Kontrollen und der Sigmadivertikulitiden auf (CU vs. Kontrollen $p < 0,002$, CU vs. Sigma $p < 0,002$). Die in vitro differenzierten Makrophagen zeigten eine signifikant höhere beta 5 Expression (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,035$, In vitro vs. Sigma $p < 0,37$). Sowohl die Colitis ulcerosa Makrophagen als auch die Morbus Crohn Makrophagen hatten gegenüber den Blutmonozyten signifikant erhöhte Werte (CU vs. Monozyten $p < 0,001$, CU vs. CED Monozyten $p < 5 \cdot 10^{-9}$, MC vs. Monozyten $p < 0,007$, MC vs. CED Monozyten $p < 7 \cdot 10^{-6}$). Ermittlung der p-Werte mittels t-Test.

Im separaten Vergleich wiesen die Makrophagen aus entzündeten Därfen im Vergleich zu denen aus geringer befallenen Resektaten nur bei Colitis ulcerosa ($n(\text{CU entzündet}) = 2$, $n(\text{CU nicht entzündet}) = 4$) (A) eine signifikant höhere Expression der Proteasomen Untereinheit beta type 5 auf (Abb. 5.13, CU entzündet vs. CU nicht entzündet $p = 0,05$). Der Unterschied zwischen den entzündeten ($n = 3$) und nicht entzündeten ($n = 3$) Crohn-Makrophagen (B) weist

zwar eine Tendenz in die gleiche Richtung wie bei den CU-Makrophagen auf, war jedoch statistisch nicht signifikant (MC entzündet vs. MC nicht entzündet $p < 0,11$).

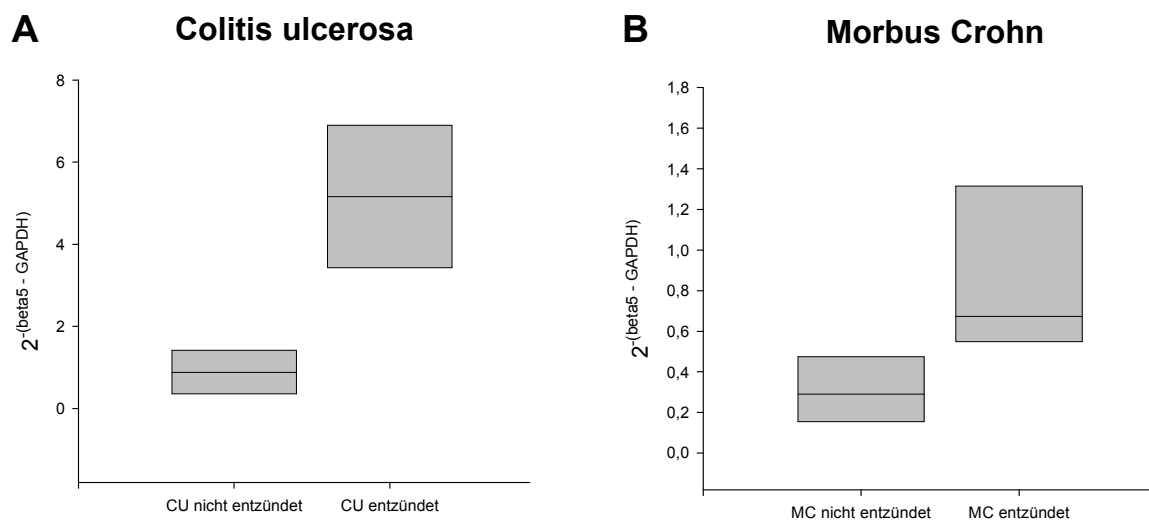


Abb 5.13: Vergleich der beta type 5 Expression in Makrophagen aus entzündeten und nicht entzündeten Resektaten. Der Unterschied zwischen den aus Colitis ulcerosa Patienten entnommenen IMACs war signifikant (CU entzündet vs. CU nicht entzündet $p = 0,05$). Bei der Crohn-Gruppe war lediglich eine tendenzielle Entwicklung ähnlich der Colitis-Gruppe nachzuweisen (MC entzündet vs. MC nicht entzündet $p < 0,11$). Bestimmung der p-Werte mittels t-Test.

Die 16 Proben der Blutmonozyten, die aus an CED erkrankten Patienten isoliert wurden, wiesen keine statistisch signifikant unterschiedlichen p-Werte bezüglich ihrer Subunit beta type 5 Expression auf (Abb 5.14, aktiv ohne Steroide vs. aktiv mit Steroiden $p < 0,72$, Remission ohne Steroide vs. Remission mit Steroiden $p < 0,16$, aktiv ohne Steroide vs. Remission ohne Steroide $p < 0,08$ und aktiv mit Steroiden vs. Remission mit Steroiden $p < 0,77$). Die p-Werte wurden mit dem t-Test ermittelt.

Blutmonozyten

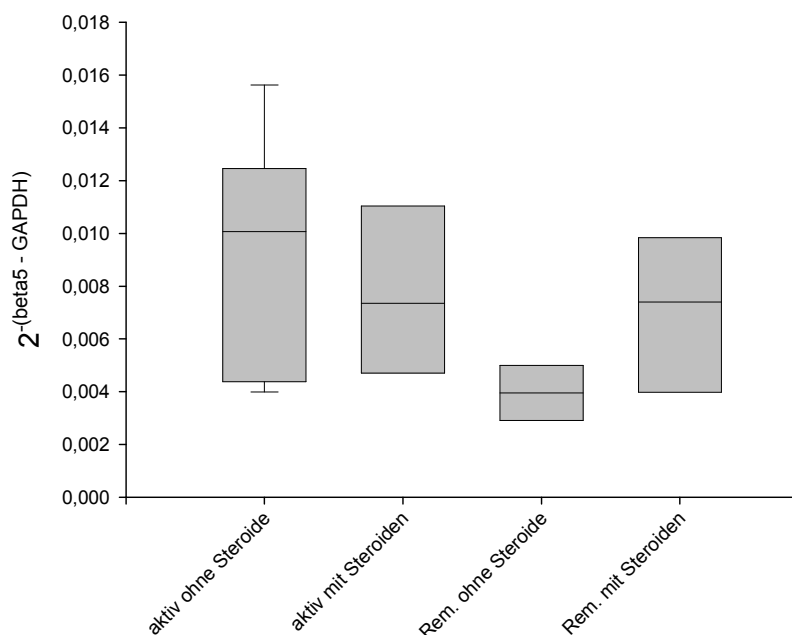


Abb. 5.14: Die verschiedenen Monozyten Gruppen im Vergleich zeigten keine signifikant unterschiedlichen Werte bezüglich ihrer beta type 5 Expression.

5.4.4. Quantitative Analyse der mRNA Expression von MECL-1

Die Immunproteasom-Untereinheit MECL-1 (beta 2i) ist eine der Untereinheiten des Immunproteasoms mit der Fähigkeit zur Proteolyse, bevorzugt nach basischen und hydrophoben Aminosäuren. Die so gespaltenen Proteinfragmente können dadurch besonders gut über den MHC-I-Komplex präsentiert werden und tragen so zur Aufrechterhaltung einer Immunreaktion bei.

Sie war sowohl in den Makrophagen der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa als auch in der mit Morbus Crohn gegenüber den IMACs aus normaler Mukosa signifikant vermehrt exprimiert (CU vs. Kontrollen $p < 7 \cdot 10^{-5}$, MC vs. Kontrollen $p < 0,001$). Gegenüber den normalen IMACs war in den in vitro differenzierten Makrophagen signifikant mehr MECL-1 exprimiert (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,03$). Die Blutmonozyten der Patienten ohne CED zeigten keinen statistisch relevanten Unterschied gegenüber den IMACs aus normaler Mukosa ($p < 0,58$), in den Monozyten von CED Patienten war die Expression von MECL-1 sogar

signifikant niedriger als in den normalen IMACs ($p < 1,8 \cdot 10^{-5}$). Vergleicht man die beiden Monozyten-Gruppen miteinander, weisen die CED Monozyten sogar eine signifikant niedrigere Expression als die normalen Monozyten ($p < 3,8 \cdot 10^{-6}$). Die MECL-1 Expression in den Makrophagen, die aus Resektaten mit Sigmadivertikulitis stammten, war jedoch gegenüber den normalen IMACs erhöht ($p < 0,02$) (Abb. 5.15). Alle p-Werte wurden mit dem t-Test bestimmt.

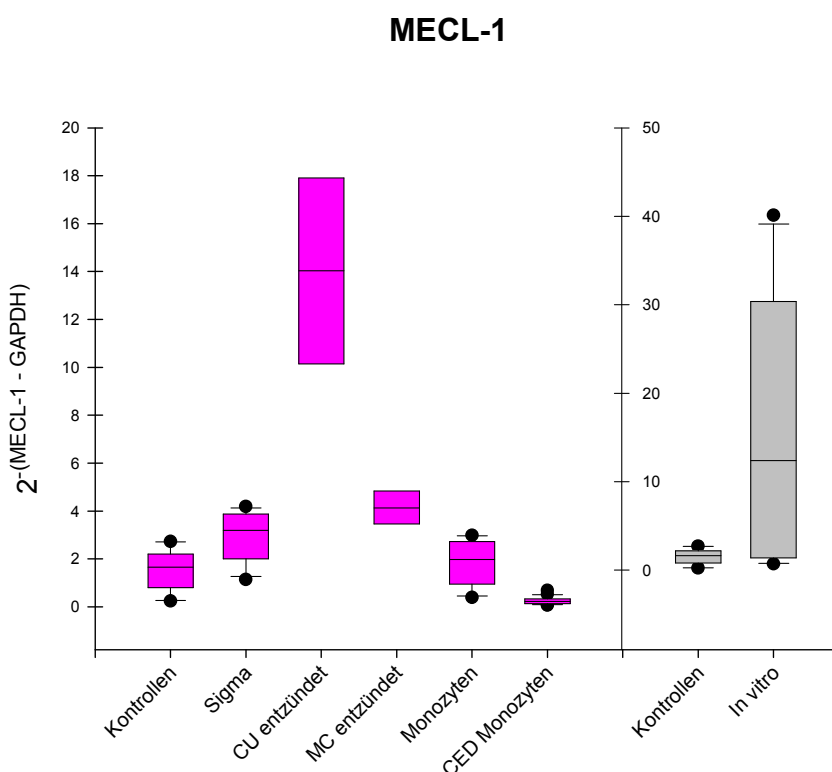


Abb. 5.15: Expression der Immunproteasomen-Untereinheit MECL-1 in den verschiedenen Zellgruppen. Die Makrophagen der Colitis ulcerosa Gruppe und der Morbus Crohn Gruppe zeigten eine signifikant höhere MECL-1 Expression (CU vs. Kontrollen $p < 7 \cdot 10^{-5}$, CU vs. Sigma $p < 0,001$, CU vs. Monozyten $p < 0,001$, CU vs. CED Monozyten $p < 5 \cdot 10^{-10}$, MC vs. Kontrollen $p < 0,001$, MC vs. Monozyten $p < 0,005$, MC vs. CED Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-10}$). Die in vitro differenzierten Makrophagen zeigten eine relevant höhere MECL-1 Expression gegenüber der Kontrollgruppe (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,03$).

Sowohl die Makrophagen aus den Colitis ulcerosa Darmresektaten (A) als auch die aus den Morbus Crohn Resektaten (B) zeigten signifikante Unterschiede in der Expression der MECL-1 Untereinheit. Die Zellen aus den Patienten mit schwererem Krankheitsverlauf wiesen

in beiden Gruppen höhere Werte auf (Abb. 5.16, CU nicht entzündet vs. CU entzündet $p < 0,03$, MC nicht entzündet vs. MC entzündet $p < 0,05$). Alle p-Werte wurden mit dem t-Test bestimmt.

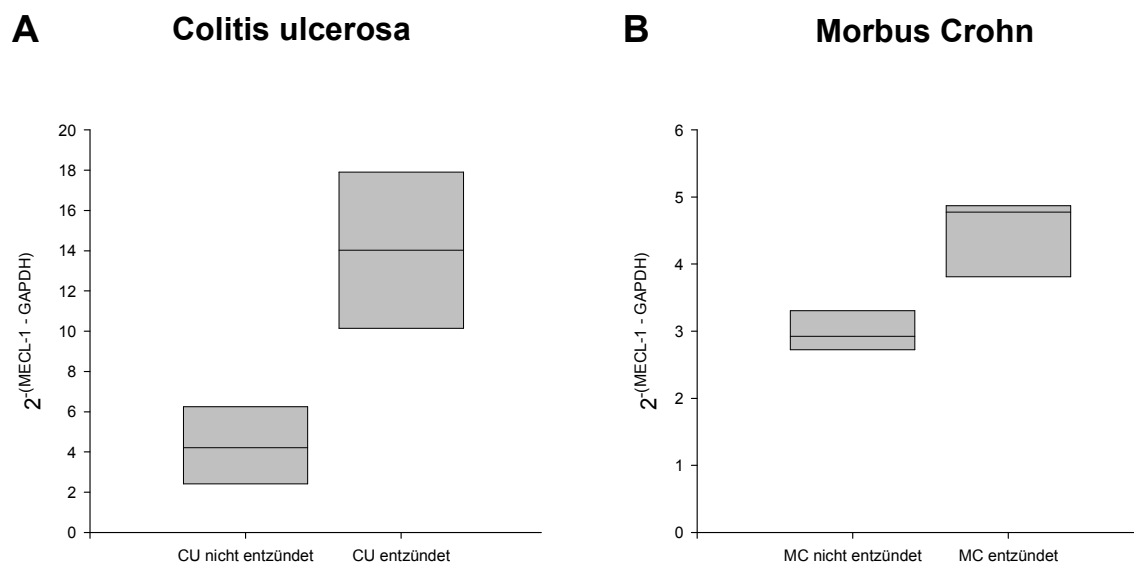


Abb. 5.16: Die Makrophagen aus den schwerer entzündeten Colitis ulcerosa Resektaten zeigten signifikant höhere Werte bezüglich der MECL-1 Expression als die Resektate die von Patienten mit leichterem Krankheitsverlauf stammen ($p < 0,03$). Das gleiche gilt für die Makrophagen der 3 Crohn Patienten mit stark aktiver Entzündung verglichen mit Makrophagen aus 3 Patienten mit MC in Remission ($p < 0,05$).

Die Blutmonozyten der CED Patienten im Vergleich zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer MECL-1 Expression (aktiv ohne Steroide vs. aktiv mit Steroiden $p < 0,88$, Remission ohne Steroide vs. Remission mit Steroiden $p < 0,33$, aktiv ohne Steroide vs. Remission ohne Steroide $p < 0,14$, aktiv mit Steroiden vs. Remission mit Steroiden $p < 0,82$) (Abb. 5.17). Die p-Werte wurden anhand des t-Tests ermittelt.

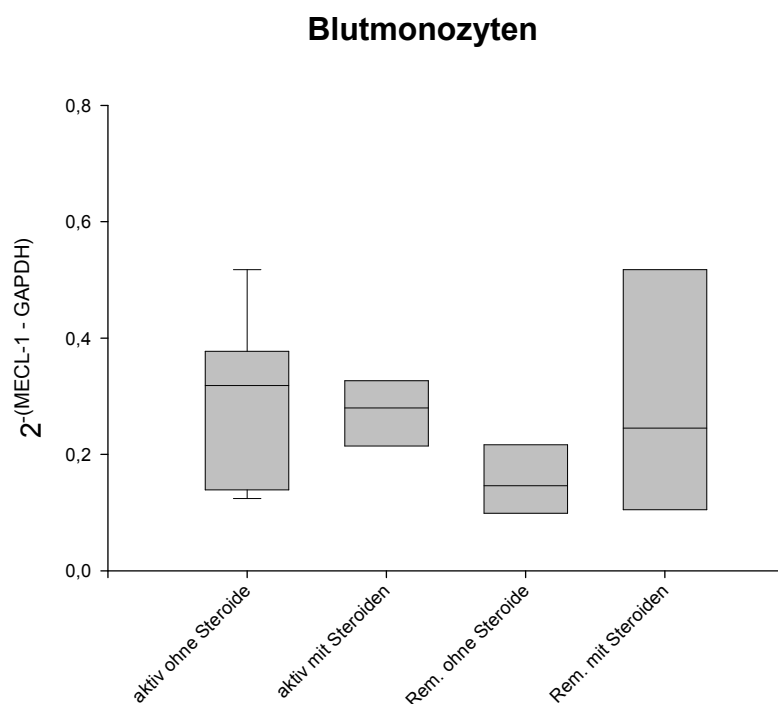


Abb. 5.17: Vergleich der MECL-1 Expression in den Gruppen der Blutmonozyten von CED Patienten. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

5.4.5. Quantitative Analyse der mRNA Expression von LMP7

LMP7 ist Teil des proteolytischen Komplexes des Immunproteasoms. Es spaltet Proteine bevorzugt nach hydrophoben und auch basischen Aminosäuren. Seine Expression wurde untersucht, da es eine entscheidende Rolle bei autoimmunen Reaktionen spielt, die auch für MC und CU mitverantwortlich sind.

Abbildung 5.18 zeigt, dass sowohl die Makrophagen aus Colitis ulcerosa Patienten als auch die aus den Morbus Crohn Patienten gegenüber den anderen Zellgruppen signifikant erhöhte Werte hinsichtlich ihrer Expression der Immunproteasomen-Untereinheit LMP7 aufwiesen. Die MC Makrophagen im Vergleich mit der Sigmadivertikulitis-Gruppe, wiesen jedoch keinen signifikanten Unterschied in der LMP7 Expression auf (CU vs. Kontrollen $p < 0,01$, CU vs. Sigma $p < 0,1$, CU vs. Monozyten $p < 0,02$, CU vs. CED Monozyten $p < 8 \cdot 10^{-6}$ bzw. MC vs. Kontrollen $p < 0,04$, MC vs. Sigma $p < 0,19$, MC vs. Monozyten $p < 0,003$, MC vs. CED Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-10}$). Die in vitro differenzierten Makrophagen weisen ebenfalls

signifikant höhere LMP7 Werte gegenüber den normalen IMACs auf ($p < 0,05$), zeigen jedoch keinen statistisch relevanten Unterschied gegenüber den CED Makrophagen (CU vs. *in vitro* $p < 0,62$, MC vs. *in vitro* $p < 0,25$). Die p-Werte wurden mit dem t-Test bestimmt.

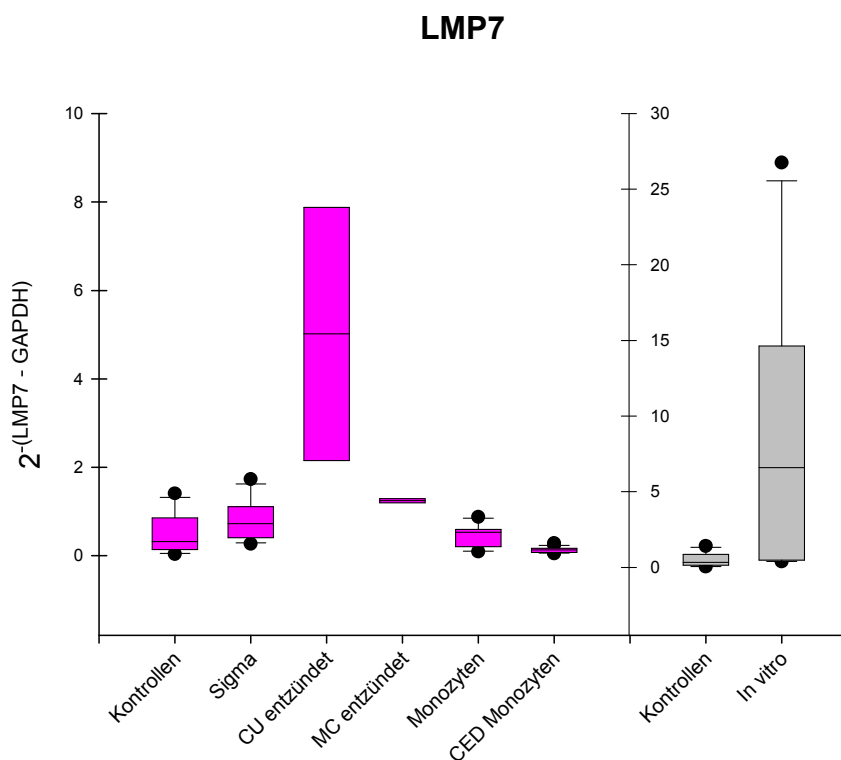


Abb. 5.18: Vergleich der LMP7 Expression in den verschiedenen isolierten Zellen. Die CU Werte waren relevant höher als in den restlichen Zellgruppen (CU vs. Kontrollen $p < 0,01$, CU vs. Sigma $p < 0,1$, CU vs. Monozyten $p < 0,02$, CU vs. CED Monozyten $p < 8 \cdot 10^{-6}$). Gleiches galt für die MC Werte mit Ausnahme im Vergleich zu den Sigmadivertikulitis-Makrophagen (MC vs. Kontrollen $p < 0,04$, MC vs. Sigma $p < 0,19$, MC vs. Monozyten $p < 0,003$, MC vs. CED Monozyten $p < 1 \cdot 10^{-10}$). Die *in vitro* differenzierten Makrophagen zeigen eine signifikant höhere LMP7 Expression als die normalen IMACs (In vitro vs. Kontrollen $p < 0,05$).

Im direkten Vergleich von entzündeten und nicht entzündeten Makrophagen aus Colitis ulcerosa (A) bzw. Morbus Crohn (B) Resektaten zeigt sich wiederum die gleiche Entwicklung wie bei den vorangehend betrachteten Untereinheiten, wobei der Unterschied diesmal nur bei Morbus Crohn signifikant ist (Abb. 5.19).

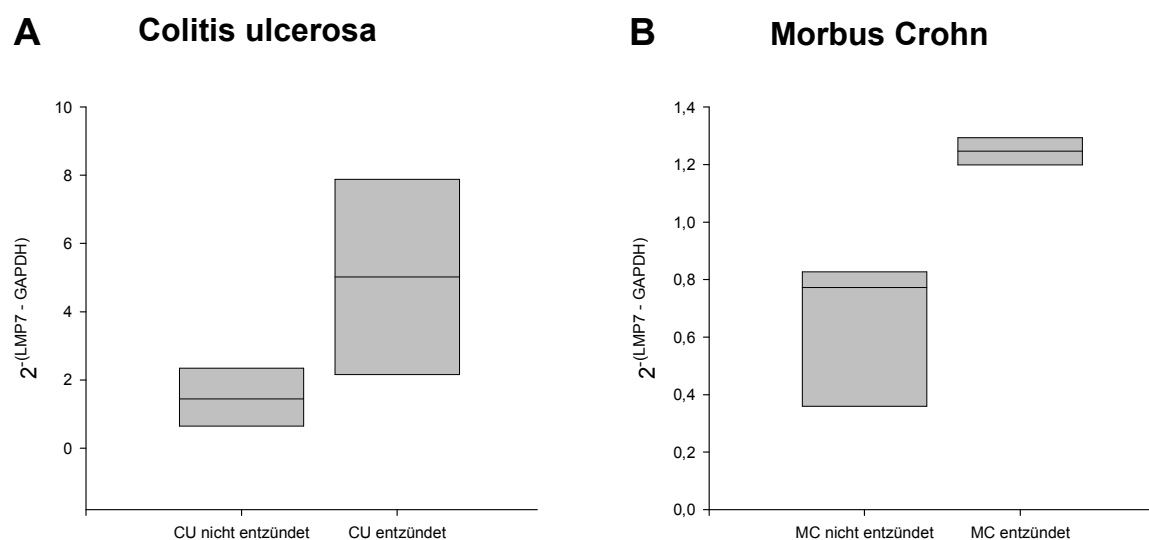


Abb. 5.19: LMP7 Expression in CU und MC Makrophagen. Der t-test Wert der Makrophagen aus entzündeter vs. nicht entzündeter Mukosa von Colitis ulcerosa Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,1$) jedoch ist aus Abbildung A ersichtlich, dass die Tendenz ebenfalls zu einer erhöhten LMP7 Expression bei den Patienten mit aktivem Erkrankungsschub geht. Vergleicht man in der MC Gruppe die Makrophagen aus entzündeter Mukosa mit denen aus nicht entzündeter Mukosa ergeben sich statistisch relevante Unterschiede in der LMP7 Expression ($p < 0,03$). Die p-Werte wurden mittels t-Test errechnet.

Die Blutmonozyten der CED Patienten zeigten im Vergleich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der LMP7 Expression (Abb. 5.20). Mit dem t-Test wurden folgende p-Werte ermittelt: aktiv ohne Steroide vs. aktiv mit Steroiden $p < 0,84$, Remission ohne Steroide vs. Remission mit Steroiden $p < 0,18$, aktiv ohne Steroide vs. Remission ohne Steroide $p < 0,12$ und aktiv mit Steroiden vs. Remission ohne Steroide $p < 0,76$.

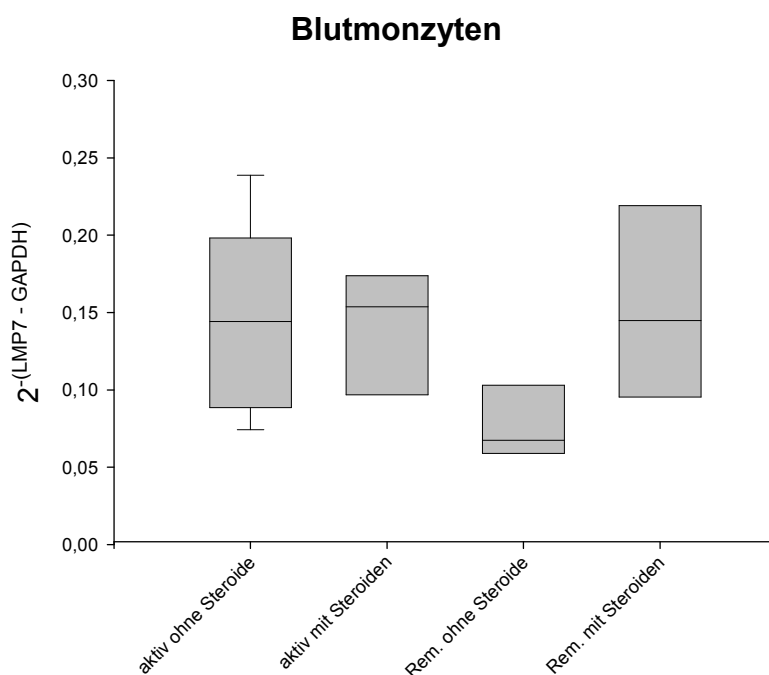


Abb. 5.20: Vergleich der LMP7 Expression in CED Blutmonozyten. Die Untersuchung ergab keine relevanten Unterschiede.

Zwar konnten beim Vergleich der Blutmonozytengruppen aus CED Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden, jedoch lässt sich aus den Diagrammen eine Tendenz zu einer vermehrten Expression von Proteasomen-Untereinheiten in den Blutmonozyten der Patienten mit aktivem Erkrankungsschub ohne Steroide im Vergleich zu denen in Remission ohne Steroide ablesen.

5.4.6. Vergleich der beta 2 - und der MECL-1 - Expression

Bei Stimulation mit $\text{INF-}\gamma$ werden die konstitutiven katalytischen Untereinheiten beta 1, beta 2 und beta 5 durch ihre induzierbaren Homologe des Immunproteasoms beta 1i (LMP2), beta 2i (MECL-1) und beta 5i (LMP7) ersetzt. Im Folgenden wurde untersucht, ob in intestinalen Makrophagen von Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa ein Unterschied in der Expression von beta 2 bzw. MECL-1 besteht. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind in den Zellen der CED Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne CED die proteasomalen

Untereinheiten höher exprimiert. Mit einem direkten Vergleich zwischen der beta 2 - Untereinheit und der induzierbaren Homologen MECL-1 soll festgestellt werden, ob die Untereinheiten des Immunproteasoms in Makrophagen von MC bzw. CU Patienten vermehrt exprimiert werden. Es wurden die Makrophagen der Patienten mit stark ausgeprägtem MC bzw. stark ausgeprägter CU und die der Patienten mit geringer ausgeprägter Entzündung, die aus dem bereits in 5.1. genannten Material isoliert wurden, verglichen und bezüglich ihrer beta 2 bzw. MECL-1 Expression neu ausgewertet.

Es zeigte sich, dass in allen Präparaten von Patienten mit Morbus Crohn, den gering entzündeten und den stark entzündeten, MECL-1 im Vergleich zu beta 2 signifikant stärker exprimiert wird (MC nicht entzündet: beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,001$, MC entzündet: beta 2 vs MECL-1 $p < 0,034$) (Abb. 5.21). Die p-Werte wurden mit dem t-Test ermittelt.

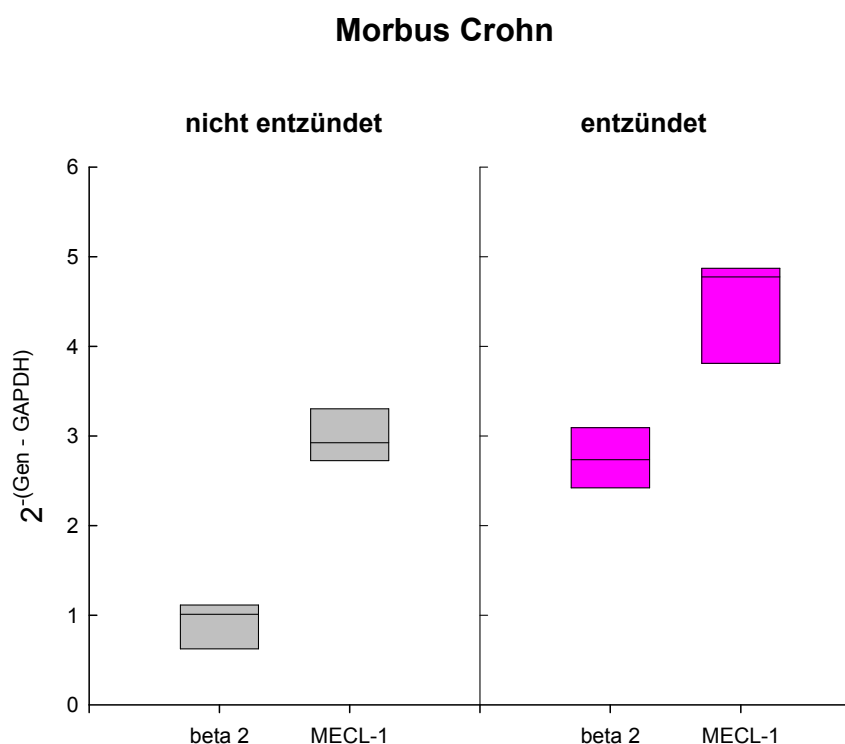


Abb. 5.21: Vergleich der beta 2 - und der MECL-1 - Expression in Makrophagen der MC-Gruppe. Sowohl in den entzündeten als auch den nicht entzündeten Präparaten zeigte sich eine signifikant höhere MECL-1 Expression (MC nicht entzündet beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,001$, MC entzündet beta 2 vs MECL-1 $p < 0,034$).

Auch beim Vergleich der entzündeten und nicht entzündeten Makrophagen aus der Colitis ulcerosa - Gruppe zeigte sich eine höhere Expression der MECL-1 - Untereinheit im Vergleich zur beta 2 - Untereinheit des konstitutiven Proteasoms. Jedoch zeigte hier der t-Test, dass der Unterschied statistisch nicht signifikant ist (CU nicht entzündet: beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,09$, CU entzündet: beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,16$) (Abb. 5.22).

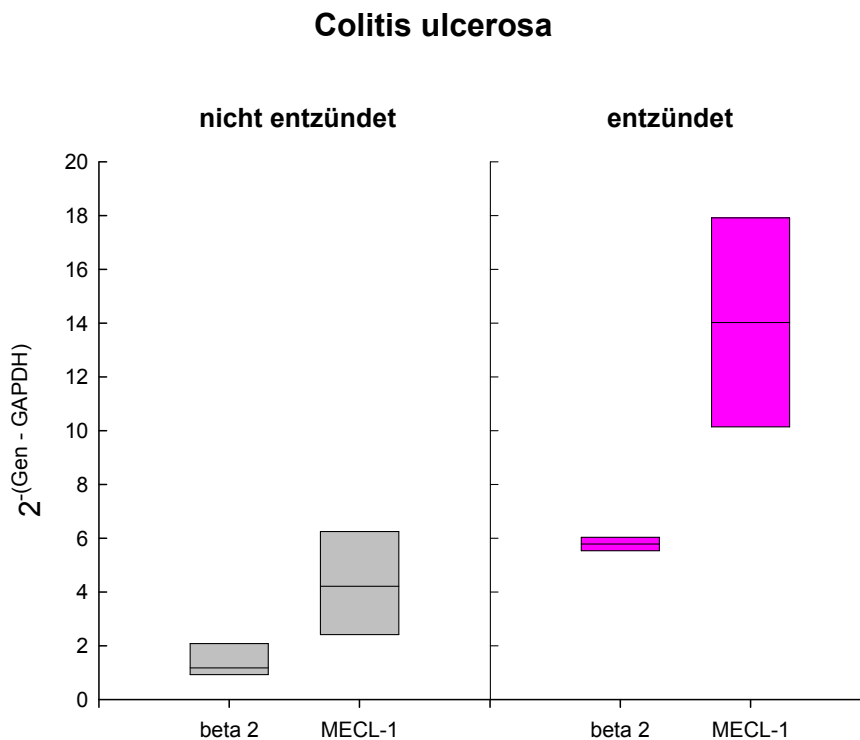


Abb. 5.22: Vergleich der beta 2 - mit der MECL-1 - Expression in Makrophagen der CU - Gruppe. Es zeigt sich eine Tendenz zu vermehrter MECL-1 - Expression in beiden Gruppen, jedoch ist die Differenz nicht statistisch relevant (CU nicht entzündet beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,09$, CU entzündet beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,16$).

Vergleicht man die IMACS aus normaler Mukosa zeigt sich, dass die erhöhte MECL-1 Expression nur bei den Makrophagen der CED Patienten zu finden ist (Abb. 5.23).

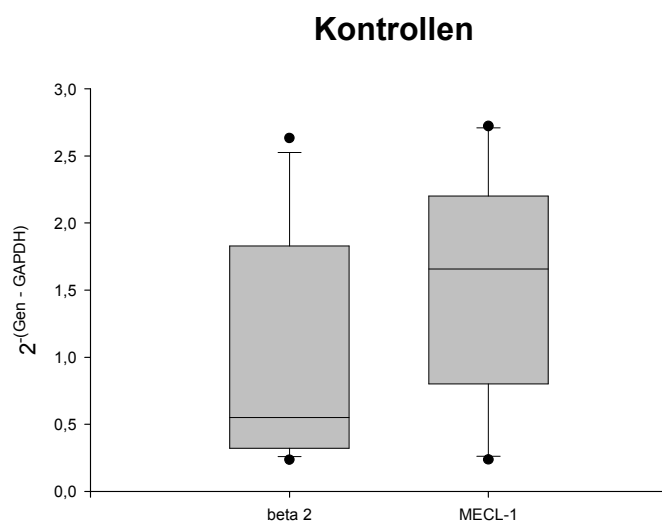


Abb. 5.23: Vergleich der beta 2 - und der MECL-1 - Expression in den Kontrollgruppen. Es besteht kein signifikanter Unterschied (beta 2 vs. MECL-1 $p < 0,3$)

5.4.7. Vergleich der beta 5 - und der LMP7 - Expression

Der gleiche oben beschriebene Vergleich wurde auch zwischen der konstitutiven Untereinheit beta 5 und ihrem induzierbaren Partner LMP7 angestellt. Verwendet wurden ebenfalls das unter 5.1 genannte Untersuchungsmaterial.

Es zeigte sich, dass in beiden Gruppen der Morbus Crohn Patienten, nicht entzündet und entzündet, im Gegensatz zu MECL-1 die Untereinheit LMP7 in den Makrophagen nicht signifikant höher exprimiert ist als beta 5, wenngleich die Tendenz zu einer höheren Expression der induzierbaren Untereinheit besteht (MC nicht entzündet: beta 5 vs. LMP7 $p < 0,23$, MC entzündet: beta 5 vs. LMP7 $p < 0,34$). Die p-Werte wurden mit dem t-Test ermittelt (Abb 5.24).

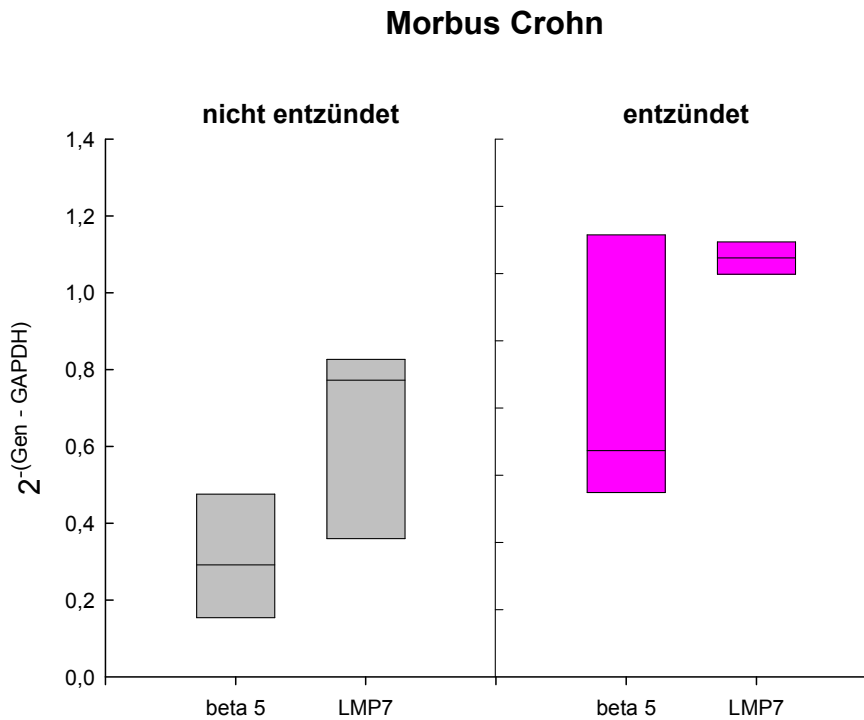


Abb. 5.24: Vergleich der beta 5 - und der LMP7 - Expression in Makrophagen von Patienten mit Morbus Crohn. Es besteht kein statistisch relevanter Unterschied zwischen der beta 5 - und der LMP7 - Expression (MC nicht entzündet beta 5 vs. LMP7 $p < 0,23$, MC entzündet beta 5 vs. LMP7 $p < 0,34$).

Auch in der Colitis ulcerosa - Gruppe zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen der beta 5 - und der LMP7 - Expression in Makrophagen aus entzündeten und nicht entzündeten Darmresektaten (CU nicht entzündet: beta 5 vs. LMP7 $p < 0,41$, CU entzündet: beta 5 vs. LMP7 $p < 0,97$). Die Berechnung der p-Werte erfolgte ebenfalls mit dem t-Test (Abb 5.25).

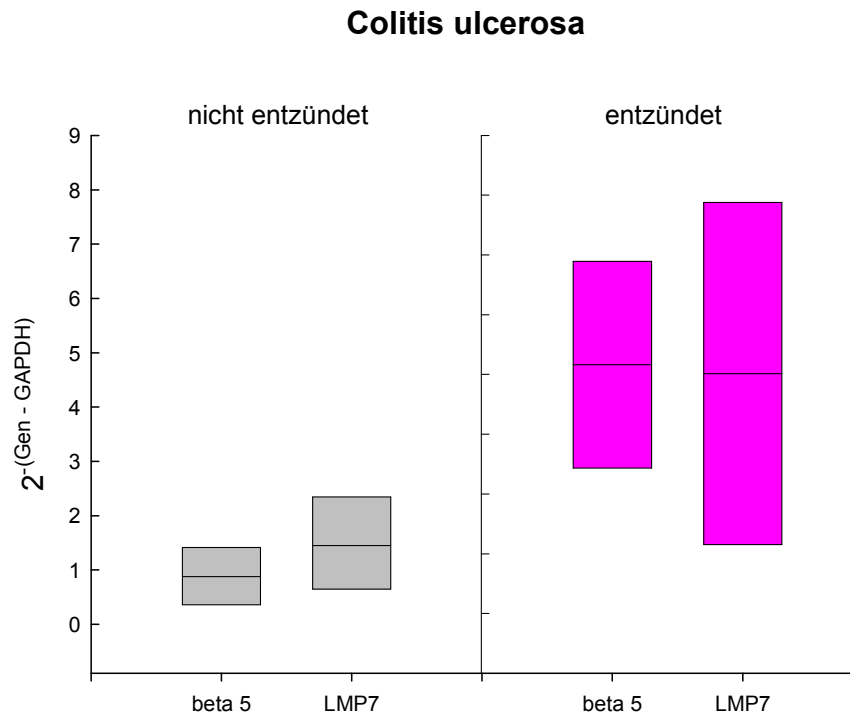


Abb. 5.25: Vergleich der beta 5 - mit der LMP7 - Expression in intestinalen Makrophagen von Colitis ulcerosa Patienten. Es bestehen keine signifikanten Expressionsunterschiede (CU nicht entzündet beta 5 vs. LMP7 $p < 0,41$, CU entzündet beta 5 vs. LMP7 $p < 0,97$).

Bei den IMACs aus normaler Mukosa besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression der konstitutiven beta 5 Untereinheit und der induzierbaren LMP7 Untereinheit (Abb. 5.26).

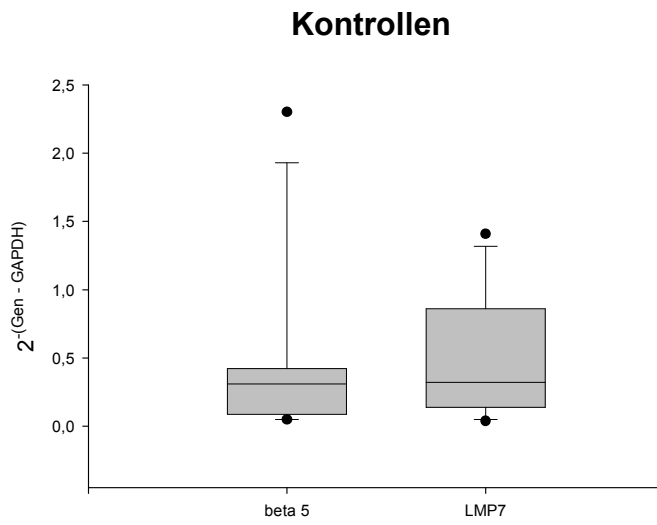


Abb. 5.26: Vergleich der beta 5 - und der LMP7 - Expression in den Kontrollgruppen. Ein statistisch relevanter Unterschied besteht nicht (beta 5 vs. LMP7 $p < 0,99$), die Ermittlung des p-Wertes erfolgte mittels t-Test.

5.5. Quantifizierung der Proteinexpression

Gewebeproben aus Kolonresektaten von jeweils neun Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Sigmadivertikulitis und ohne CED wurden verwendet, um 4 µm dicke Paraffinschnitte herzustellen, die anschließend immunhistochemisch eingefärbt wurden. Die Schnitte wurden mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und die Zielproteine mit Vector[®] NovaRED[®] (rot) nachgewiesen. Alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Kolonpräparaten von Patienten durchgeführt, die nicht aus dem *pool* der Proben für die Affymetrix-Daten stammten und nicht für PCR verwendet wurden.

Mit dem polyklonalen Antikörper anti-β2/MECL-1 von Affinity Research wurden sowohl die Untereinheit des 26S Proteasoms beta2 als auch die MECL-1-Untereinheit des Immunproteasoms detektiert. Der monoklonale Antikörper anti-β5i markiert die LMP7-Untereinheit des Immunproteasoms.

Des Weiteren wurde versucht, die Proteasomen-Untereinheiten ATPase1 und β5 nachzuweisen, sowie die Proteine β2 und MECL-1 getrennt voneinander zu untersuchen. Jedoch waren die verwendeten Antikörper nicht zum Einsatz für eine immunhistochemische Färbung generiert worden, so dass die Färbung fehlschlug. Geeignete Antikörper standen nicht zur Verfügung.

5.5.1. Nachweis der Proteasomen - Untereinheiten β2 und MECL-1 (β2i)

Folgende Schnitte wurden entsprechend dem Protokoll (siehe Methoden 4.8) mit dem anti-β2/MECL-1-Antikörper inkubiert, um die proteasomalen Untereinheiten β2 und MECL-1 nachzuweisen. Ziel der Untersuchung war es mögliche Unterschiede bei der Expression der Untereinheiten zwischen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und einer Kontrollgruppe mit nicht entzündeten Gewebeproben festzustellen.

Eine unspezifische Anfärbung des Darmepithels zeigte sich bei allen Färbungen mit anti-β2/MECL-1, bei den Isotypenkontrollen war dies jedoch nicht festzustellen.

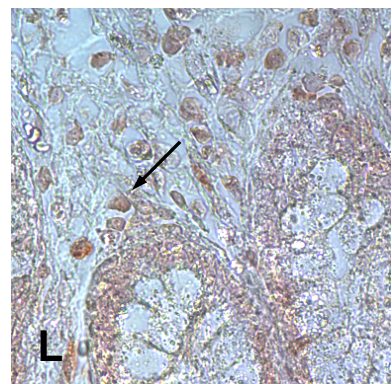
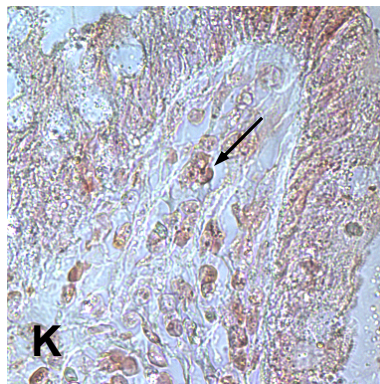
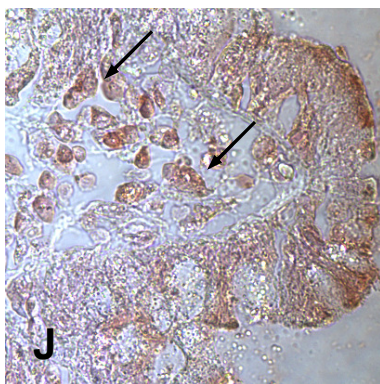
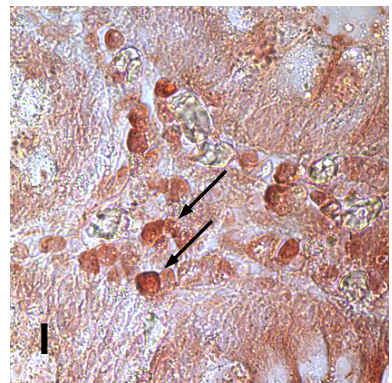
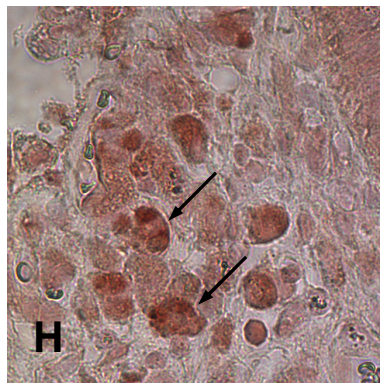
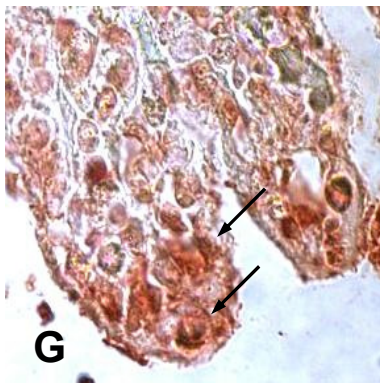
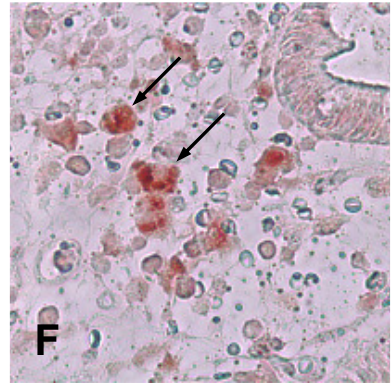
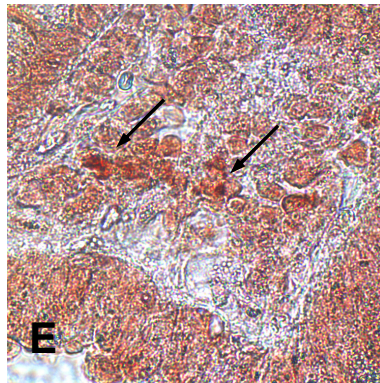
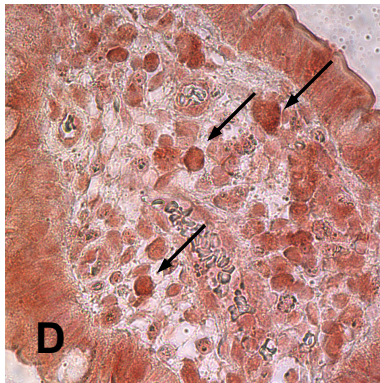
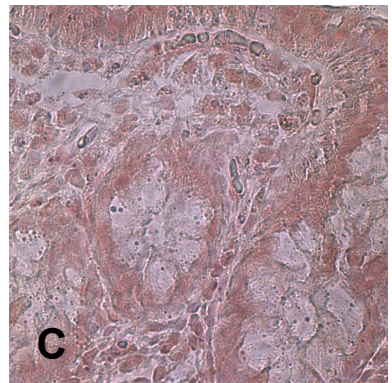
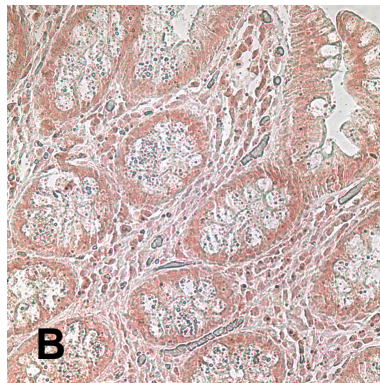
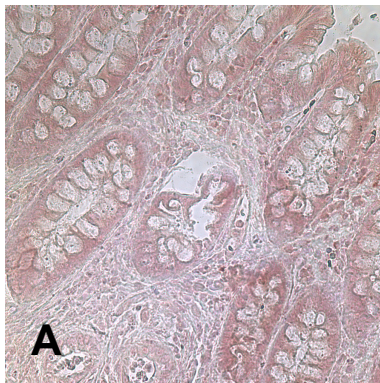


Abb. 5.27: A – C: Paraffinschnitte aus nicht entzündeten Darmresektaten
D – F: Morbus Crohn
G – I: Colitis ulcerosa
J – L: Sigmadivertikulitis

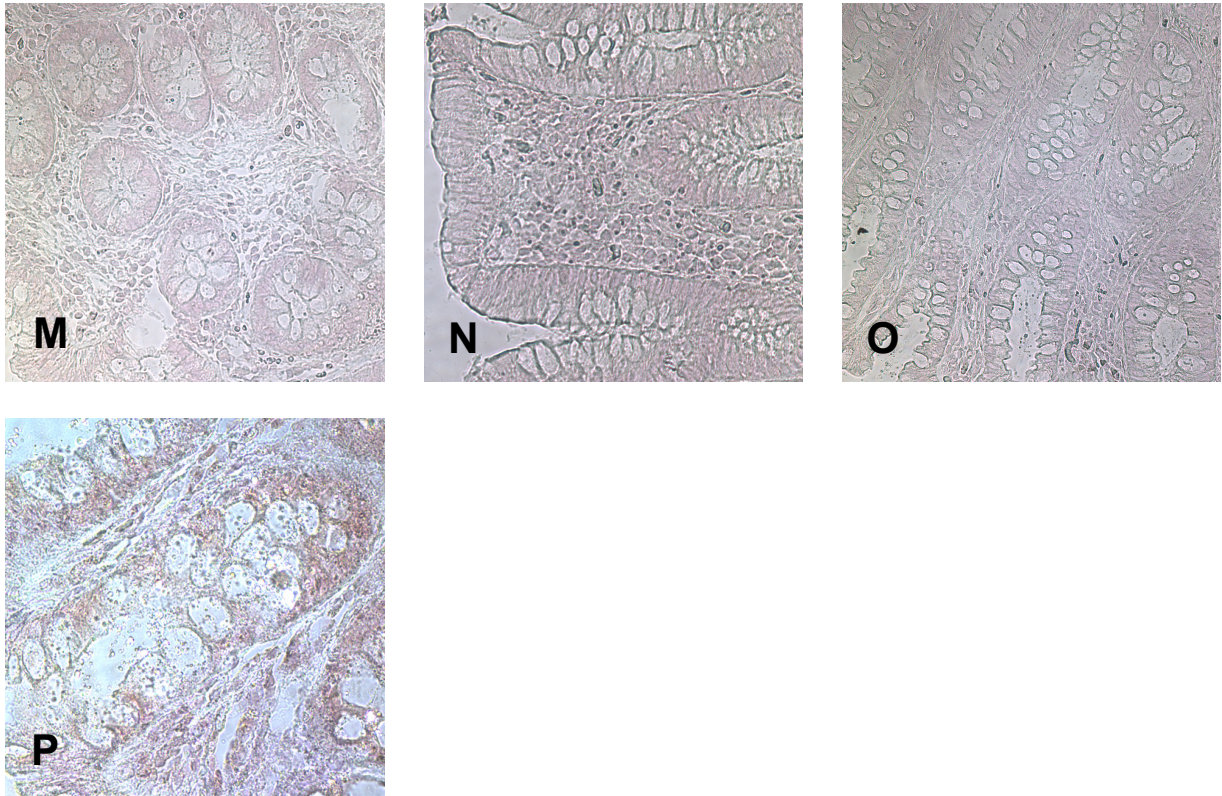


Abb. 5.28: M – P: Isotypenkontrollen für die Paraffinschnitte aus nicht entzündeten Darmresektaten (M), die MC-Schnitte (N), die CU-Schnitte (O) und die Sigmadivertikulitis-Schnitte (P)

5.5.1.1. β 2/MECL-1 - Expression in Kontrollschnitten (A-C)

Die Paraffinschnitte A bis C zeigen nicht entzündete Gewebeproben von Darmresektaten, die nicht aufgrund von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entnommen wurden, sondern wegen Karzinombefall.

Hier zeigt sich keine verstärkte Anfärbung von Makrophagen da hier keine vermehrte Expression der Gene der Proteasomen-Untereinheiten β 2 und MECL-1 vorliegt. Vielmehr liegt eine leichte gleichmäßige unspezifische rötliche Anfärbung aller Zellen vor.

Die angefertigten korrespondierenden Isotypenkontrollen (M) wiesen keine Anfärbung auf.

5.5.1.2. β 2/MECL-1 - Expression bei Morbus Crohn (D-F)

Die Paraffinschnitte D bis F von Patienten mit Morbus Crohn, die mit dem anti- β 2/MECL-1-Antikörper inkubiert wurden, zeigen eine intensivere Rotfärbung von Zellen (\blacktriangledown) mit Makrophagen-typischem Verteilungsmuster im Vergleich zum restlichen Gewebe, was für eine besonders hohe Dichte an β 2- und MECL-1- Untereinheiten in diesen Zellen spricht. Die starke Färbung bestätigt die Hypothese, dass in den Makrophagen von Patienten mit MC das Proteasom und Immunproteasom in besonders großer Anzahl vorhanden ist. Die Isotypenkontrollen (N) hingegen wiesen keine unspezifische Färbung auf.

5.5.1.3. β 2/MECL-1 - Expression bei Colitis ulcerosa (G-I)

Die gleiche stärkere Anfärbung von Zellen mit Makrophagen-typischer Morphologie, die bereits die Proben der MC-Patienten aufwiesen, ließ sich auch in den Paraffinschnitten G bis I der Patienten mit Colitis ulcerosa, die ebenfalls mit dem anti- β 2/MECL-1-Antikörper inkubiert wurden, nachweisen. Auch für diese Zellen (\blacktriangledown) gilt, daß ihre kräftigere Rotfärbung im Vergleich zum übrigen Gewebe für eine besonders hohe Anzahl an β 2- und MECL-1-Untereinheiten in ihrem Zytosol spricht. Bei den Schnitten der Isotypenkontrollen (O) blieb eine Anfärbung aus.

5.5.1.4. β 2/MECL-1 - Expression bei Sigmadivertikulitis (J-L)

Die Schnitte J bis L stammen von Patienten, die an Sigmadivertikulitis erkrankt waren. Es sollte untersucht werden, ob die Gene des Proteasoms bei Entzündungen, die sich im Gegensatz zu Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht auf immunologische Fehlreaktionen sondern auf direkte Einwirkung von Noxen wie Stuhlretention zurückführen lassen, ebenfalls in größerer Anzahl transkribiert werden.

Es zeigte sich, dass die Rotfärbung der Makrophagen (\blacktriangledown) hier wesentlich geringer ausgeprägt ist als bei den Gewebeschnitten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dies bedeutet, dass die Konzentration der β 2/MECL-1 - Untereinheiten des Proteasoms in diesen Zellen geringer ist als in den Proben der Patienten, die an CED erkrankt waren. Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auslöser der Entzündung und den induzierten unterschiedlichen Immunreaktionen, da trotz der ablaufenden Entzündungsreaktion bei einer Sigmadivertikulitis keine erhöhte Expression von β 2 und MECL-1 erfolgt.

Auch hier war bei den angefertigten Isotypenkontrollen (P) keine unspezifische Färbung zu erkennen.

5.5.2. Nachweis der Proteasomen-Untereinheit LMP7 (β 5i)

Mit dem monoklonalen Antikörper anti- β 5i wurde die Untereinheit LMP7 des Immunproteasoms erfasst. Wiederum wurde untersucht, ob im Darm die Genexpression des Proteasoms abhängig von der jeweiligen Erkrankung erfolgt. Miteinander verglichen wurden erneut Gewebeproben von Patienten, die an Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Sigmadivertikulitis und Kolonkarzinom litten. Auch hier zeigte sich in allen Schnitten eine unspezifische Anfärbung des Darmepithels.

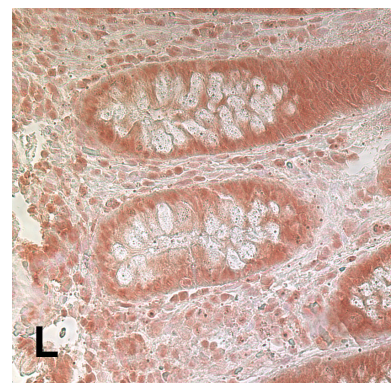
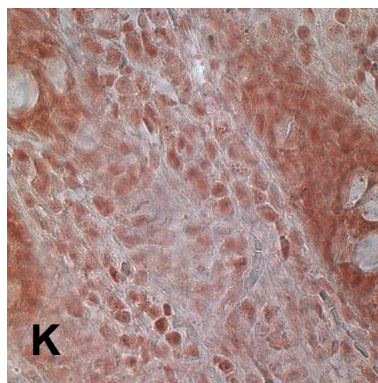
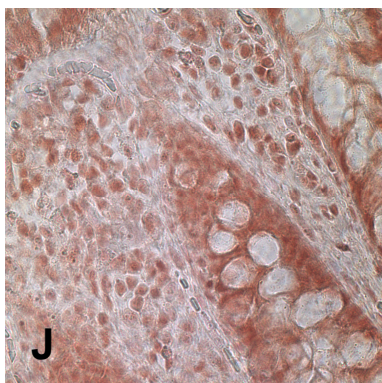
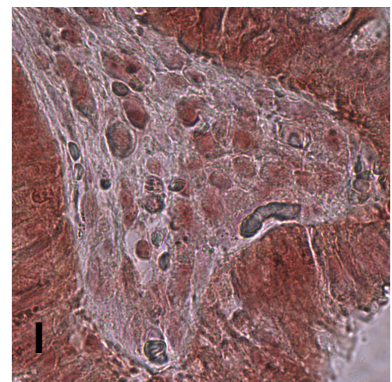
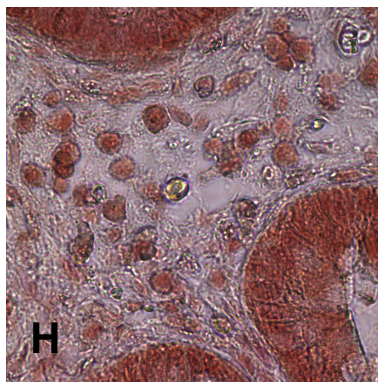
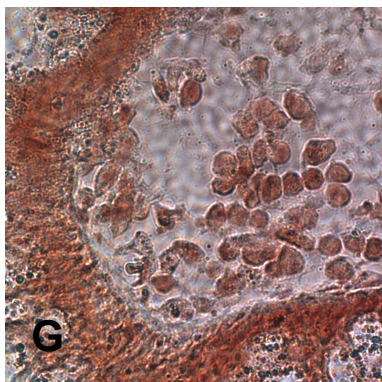
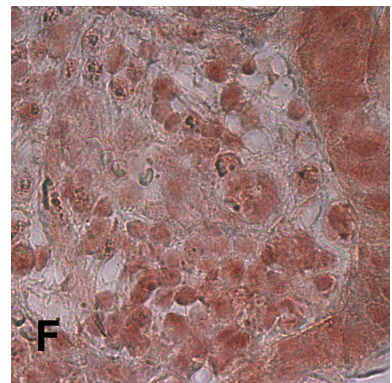
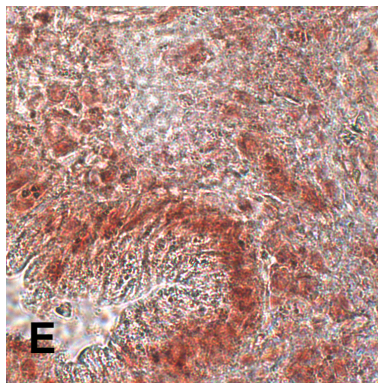
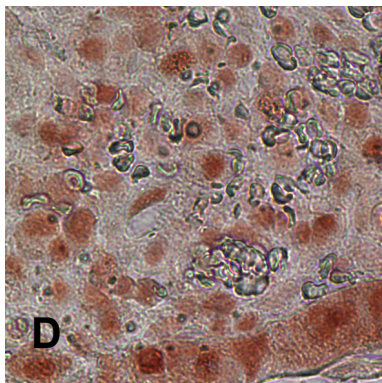
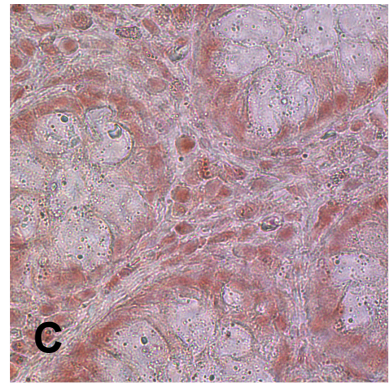
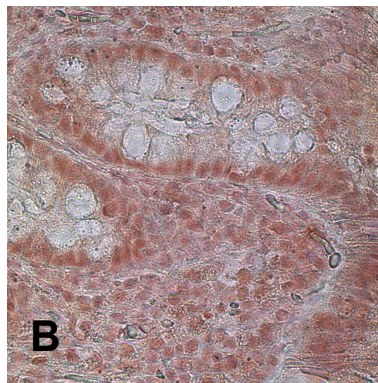
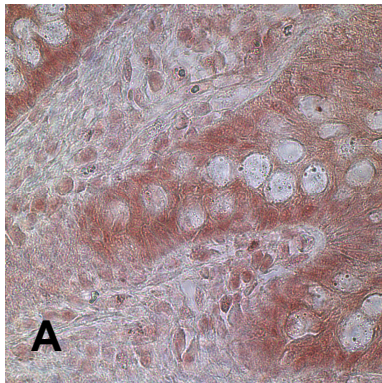


Abb. 5.29: A – C: Paraffinschnitte aus nicht entzündeten Darmresektaten
D – F: Morbus Crohn
G – I: Colitis ulcerosa
J – L: Sigmadivertikulitis

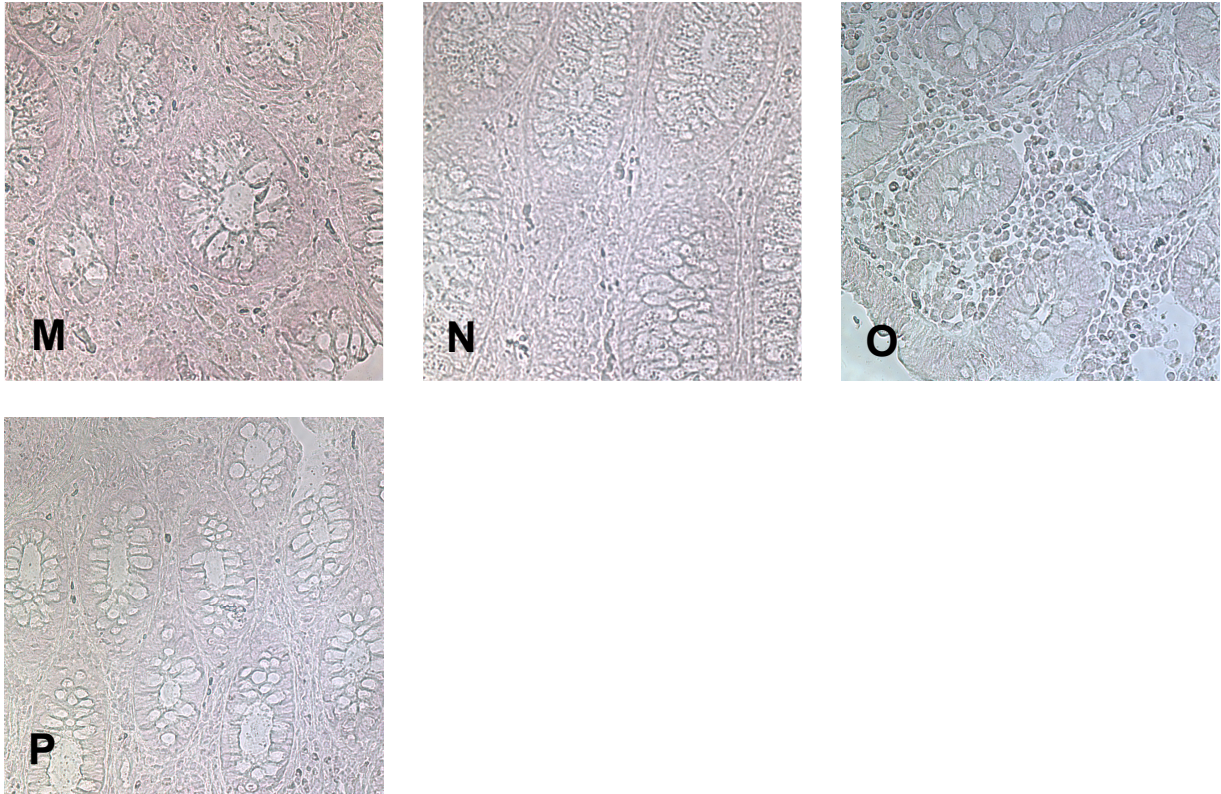


Abb. 5.30: M – P: Isotypenkontrollen für die Paraffinschnitte aus nicht entzündeten Darmresektaten (M), die MC-Schnitte (N), die CU-Schnitte (O) und die Sigmadivertikulitis-Schnitte (P)

5.5.2.1. LMP7 - Expression in Kontrollschnitten (A-C)

In den nicht entzündeten Kontrollschnitten A bis C von Kolonkarzinom-Patienten zeigt sich nach Inkubation mit anti-LMP7-Antikörpern kaum eine spezifische Anfärbung von Makrophagen. Dies bedeutet, dass in diesen Zellen in nicht entzündetem Gewebe kaum LMP7 exprimiert wird, ganz im Gegensatz zu den Makrophagen in den CED-Proben. Die korrespondierenden Isotypenkontrollen waren negativ bezüglich einer unspezifischen Anfärbung.

5.5.2.2. LMP7 - Expression bei Morbus Crohn (D-F)

Die Gewebeschnitte D bis F stammen aus Darmresektaten von Patienten, die an Morbus Crohn erkrankten. Sie wurden ebenfalls mit dem spezifischen Antikörper für LMP7 laut Protokoll (siehe 3.8) inkubiert. Eine Anfärbung von Zellen mit der für intestinale Makrophagen typischen Morphologie zeigte sich nach der Markierung mit dem LMP7-Antikörper, wenngleich nicht so stark wie nach der Inkubation mit dem anti- β 2/MECL-1 -Antikörper. Dies beweist, dass auch die proteasomale Untereinheit LMP7 in Makrophagen in höherer Konzentration vorhanden ist, als in den übrigen Zellen der Lamina propria. Bei den Isotypenkontrollen (N) blieb dagegen eine unspezifische Anfärbung aus.

5.5.2.3. LMP7 - Expression bei Colitis ulcerosa (G-I)

Mit der gleichen Fragestellung wurden die Gewebeschnitte G bis I, die von Colitis ulcerosa Darmresektaten stammen, untersucht. Nach der Inkubation der Schnitte mit dem anti-LMP7-Antikörper waren wiederum die Makrophagen des subepithelialen Bindegewebes mit ihrer vermehrten Anzahl an LMP7-Untereinheiten durch intensivere Rotfärbung hervorgehoben. Im Vergleich dazu zeigten die Isotypenkontrollen (O) keine unspezifische Anfärbung.

5.5.2.4. LMP7 - Expression bei Sigmadivertikulitis (J-L)

Auch bezüglich der Untereinheit LMP7 sollten Gewebeproben von Patienten, die an CED erkrankten, mit denen von Patienten, deren Kolon auf Grund einer Divertikelerkrankung reseziert werden musste, verglichen werden. Die Paraffinschnitte J bis L der Sigmadivertikulitiden, die mit anti-LMP7 reagierten, weisen eine vermehrte Expression von LMP7-Untereinheiten auf, jedoch nicht in gleichem Maße wie die Schnitte der CED-Proben, die eine viel kräftigere Anfärbung der Makrophagen zeigen. Die Isotypenkontrollen (P) stellen sich ohne unspezifische Anfärbung dar.

5.6. Western Blot

Die Taqman[®]-Versuche haben bestätigt, dass die Proteasomen - Untereinheiten ATPase 2, beta 2, beta 5, MECL-1 und LMP7 in Makrophagen aus entzündeter Darmmukosa von CED Patienten vermehrt exprimiert werden. Neben der immunhistochemischen Färbung soll die Expression von ATPase 2, MECL-1 und LMP7 auf Proteinebene mit dem Western Blot untersucht werden. Verwendet wurden dafür Biopsie-Lysate aus Patienten mit Morbus Crohn (3), Colitis ulcerosa (2), ohne CED als Kontrollgruppe (4) und einem Patienten mit Sigmadivertikulitis.

5.6.1. Expression von ATPase 2

Der Versuch wurde mit dem polyklonalen anti-ATPase 2 - Antikörper durchgeführt. Die Bande von ATPase 2 und des rekombinanten ATPase 2 Proteins sollten bei ca. 50 kDa zu detektieren sein. Sowohl die Biopsie-Lysate der Kontrollgruppe als auch die der Morbus Crohn Patienten zeigen eine deutliche Bande bei 50 kDa, aber vor allem die Lysate der M. Crohn - Gruppe und geringfügiger die Sigmadivertikulitis zeigen eine zweite Bande bei 20 kDa (Abb. 4.34). Dies spricht möglicherweise für eine Aufspaltung des Proteins bei CED Patienten.

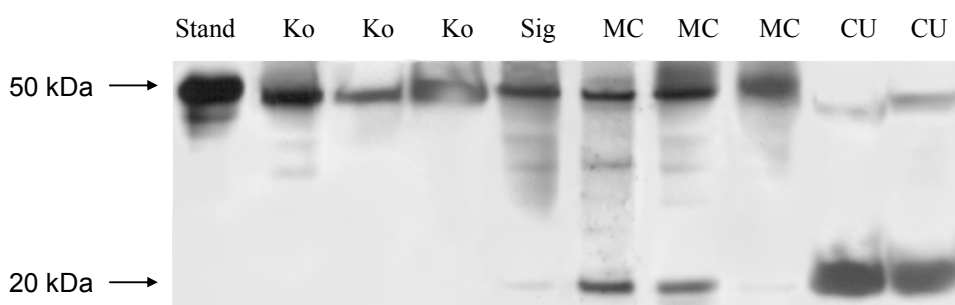


Abb. 5.31: ATPase 2 Expression in Biopsie-Lysaten. Das als Positivkontrolle verwendete rekombinante Protein (Standard) zeigt eine deutliche Bande bei 50 kDa. Die übrigen Banden der Lysate bei 50 kDa zeigten keine signifikant unterschiedlichen Mengen an ATPase 2 - Protein. Jedoch weisen die Lysate der CED Patienten zusätzlich zu der 50 kDa Bande auch eine Bande bei 20 kDa auf.

5.6.2. Expression von MECL-1

Der Nachweis von MECL-1 erfolgte mit dem polyklonalen anti-MECL-1 - Antikörper. Das zur Positivkontrolle (Standard) verwendete rekombinante Protein mit seinem GST tag (A) war bei 55,77 kDa detektierbar, die Proteasomen - Untereinheit MECL-1 (B) selbst erschien bei 30 kDa.

MECL-1 war sowohl in Patienten ohne intestinale Entzündung nachweisbar als auch in den Patienten, die an Morbus Crohn und Colitis ulcerosa litten, wobei die Banden dort stärker ausgeprägt waren (Abb. 5.32). Da Aktin in allen Lysaten nachweisbar war, ist der schwächere Nachweis von ATPase 2 in den Biopsien aus Patienten ohne CED nicht auf eine geringere Proteinmenge zurückzuführen. Neben den erwarteten Banden zeigten sich einige unspezifisch gefärbte Banden.

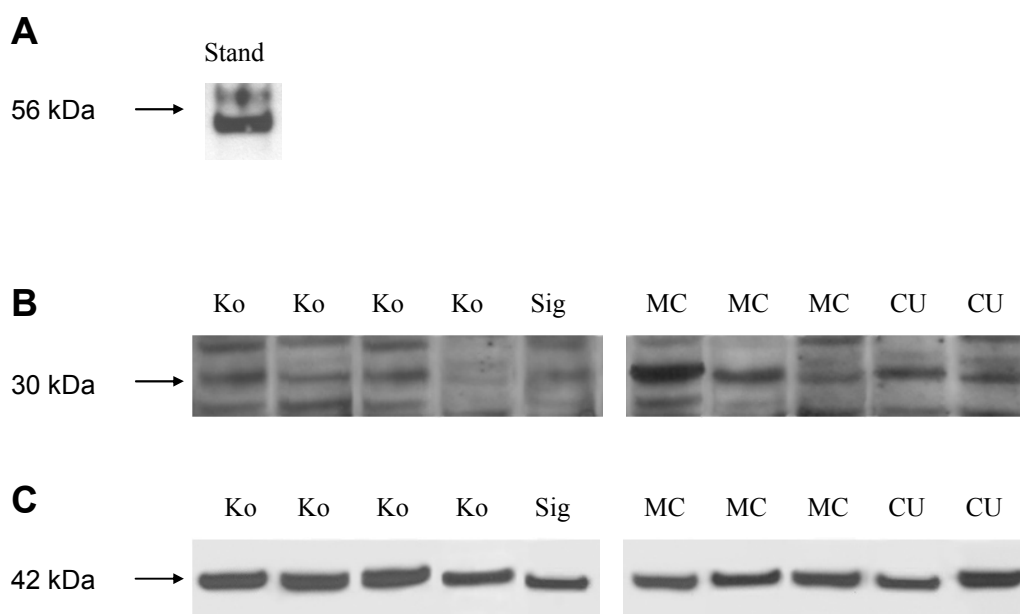


Abb. 5.32: Nachweis von MECL-1 in Lysaten aus Darmbiopsien. Die Positivkontrolle (A) mit dem rekombinanten Protein garantierte den Erfolg des Versuchs. MECL-1 (B) war in allen Lysaten nachweisbar, schien aber in den Biopsien aus an CED erkrankten Patienten stärker exprimiert zu sein. Bei allen Patienten war Aktin detektierbar (C).

Die Westernblot - Membranen wurden mit OptiQuant[®] Image Analysis Software (Packard BioScience Company, Meriden, CT) untersucht, um festzustellen, ob die Stärke der Proteinbanden signifikant unterschiedlich ist. Das Programm vermisst die Pixeldichte der Banden. Hierfür wird ein Grid (Rastergitter) auf die Membran projiziert, der individuell angepasst und korrigiert werden kann. Nachdem die Intensität in jedem Raster gemessen wurde, erfolgt eine Hintergrundnormalisierung, indem ein leerer Spot pro Array ermittelt und von den Einzelwerten abgezogen wird. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen den einzelnen Grids. Die unterschiedlichen Messwerte wurden graphisch ausgewertet und mit dem t-test auf die Signifikanz getestet (Abb. 5.33). $P < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Die Messwerte ergaben, dass in den Morbus Crohn - Lysaten MECL-1 signifikant höher exprimiert war als in den Kontrollen. Die Colitis ulcerosa - Proben zeigten hingegen nur eine Tendenz in diese Richtung.

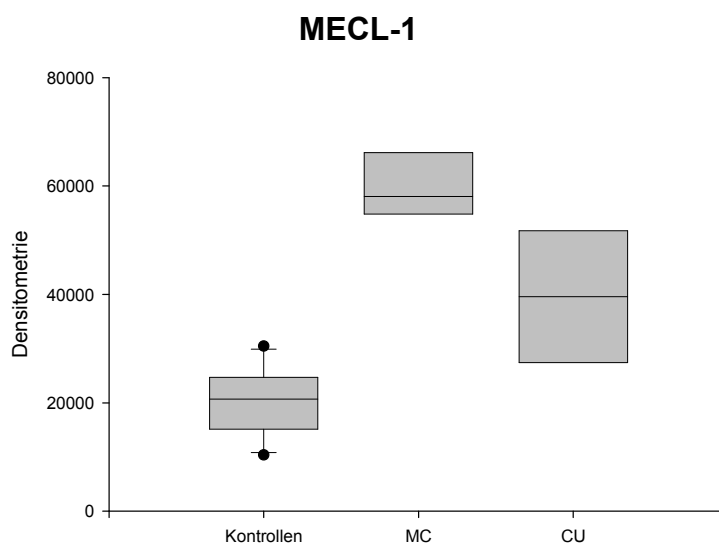


Abb. 5.33: MECL-1 Expression in Biopsie-Lysaten. Die Vermessung ergab, dass die MECL-1 Expression in den Morbus Crohn Lysaten signifikant höher ist als in den Kontrollen (Kontrollen vs. MC $p < 0,0003$). Die Werte der Colitis ulcerosa Proben unterschieden sich statistisch nicht signifikant von den Kontrollen, zeigen aber auch eine Tendenz zu vermehrter MECL-1 Expression.

5.6.3. Expression von LMP7

Die Untersuchung der LMP7 Expression in den Biopsielysaten erfolgte mit dem monoklonalen anti-LMP7 - Antikörper und dem partiell rekombinanten Protein zu LMP7. Das rekombinante Protein sollte bei 37 kDa zu detektieren sein, die LMP7 Untereinheit in den Patientenproben bei 30 kDa.

Das als Positivkontrolle eingesetzte rekombinante LMP7 Protein zeigte eine kräftige Bande bei 37 kDa. Die Banden der Kontrollgruppe und der Sigmadivertikulitis waren deutlich geringer ausgeprägt. In den Lysaten der CED Patienten war jedoch sichtlich mehr LMP7 Protein vorhanden (Abb. 5.34).

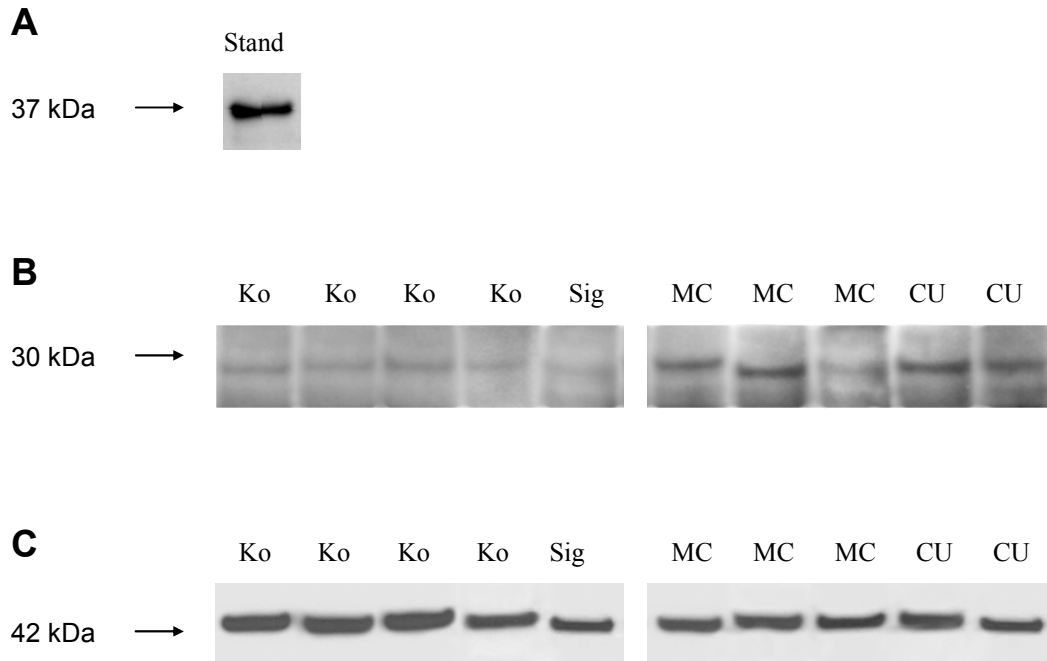


Abb. 5.34: LMP7 Expression in Lysaten von Darmbiopsien. Die kräftige Bande der Positivkontrolle (A) zeigt, dass der Versuch selbst erfolgreich war. LMP7 ist in den Lysaten der Patienten (B) in den Proben der M. Crohn und C. ulcerosa in größerer Zahl vorhanden als in den Kontrollproben und der Sigmadivertikulitis. Die Aktinbanden (C) waren bei allen Proben vorhanden.

Die Banden wurden wiederum mit OptiQuant® wie oben beschrieben vermessen und graphisch ausgewertet. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass sowohl in den Lysaten der Morbus Crohn Patienten als auch in denen der Colitis ulcerosa Patienten eine signifikant höhere Expression von LMP7 vorhanden ist (Abb. 5.35).

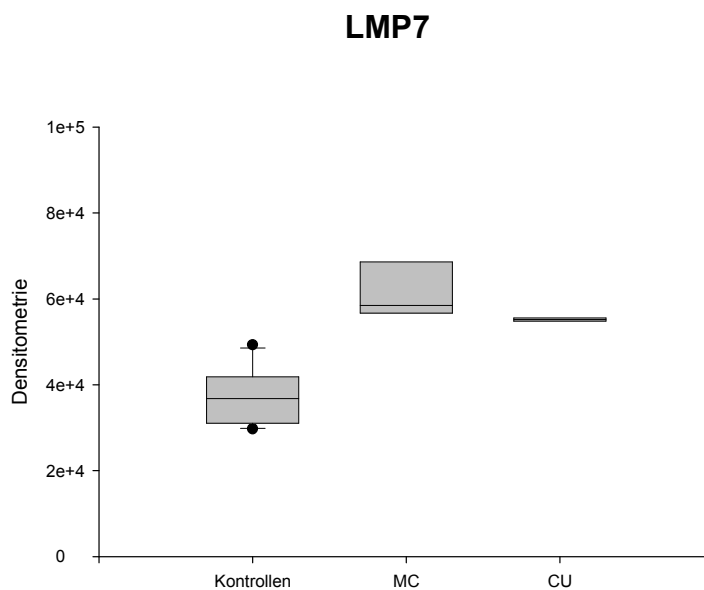


Abb. 5.35: LMP7 Expression in Biopsielysaten. Die Anzahl von LMP7 Proteinen ist gegenüber den Kontrollen in den Morbus Crohn Proben ebenso statistisch signifikant vermehrt exprimiert wie in den Colitis ulcerosa Proben (Kontrollen vs. MC $p < 0,017$, Kontrollen vs. CU $p < 0,02$).

5.7. Proteasomen - Funktionstest

Durch die Messung des fluoreszierenden Spaltproduktes 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) nach der Spaltung von dem markierten Proteasomen-Substrat LLVY-AMC konnte die proteasomale Aktivität in den Biopsielysaten der Patienten mit und ohne CED untersucht werden. Da vor der Aktivitätsmessung die Proteinmenge in den Proben angeglichen wurde, konnten die Fluoreszenzwerte direkt miteinander verglichen werden. Der t-Test zeigt, dass die Biopsielysate der CED Patienten ($n=5$) eine signifikant höhere Proteasomenaktivität aufweisen als die Lysate der Patienten ohne entzündliche Darmerkrankung ($n=6$): Kontrollen vs. CED $p < 0,48$ (Abb. 5.36).

Proteasomenfunktionstest

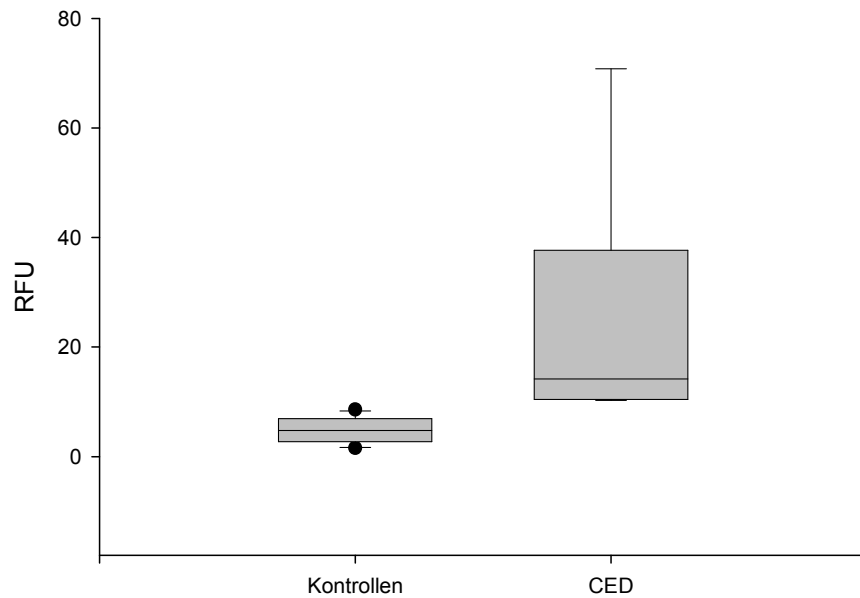


Abb. 5.36: Proteasomale Aktivität in Lysaten von Patienten mit und ohne CED. Die Lysate der Biopsate aus nicht entzündeten Darmresektaten weisen eine relativ gleichmäßige Fluoreszenz unabhängig von der Proteinmenge auf wohingegen die CED-Proben eine signifikant höhere Proteasomenaktivität besitzen (Kontrollen vs. CED $p < 0,48$).

6. Diskussion

6.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Arbeit

Affymetrix GeneChip[®] Analysen, die am Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik in Regensburg durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass in *in vitro* differenzierten Makrophagen im Vergleich zu Makrophagen aus normaler, nicht entzündeter Mukosa praktisch alle Proteasomen-Untereinheiten höher exprimiert waren. Es lag die Vermutung nahe, dass auch in den Makrophagen der CED-Patienten eine ähnliche Situation vorliegen könnte¹⁰⁶. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde eine Real-time-PCR mit Taqman[®] durchgeführt.

Die Taqman[®]-Daten bestätigen auf mRNA-Ebene die Ergebnisse der Affymetrix GeneChip[®] Analysen bezüglich der *in vitro* differenzierten Makrophagen für die ausgewählten Proteasomen-Untereinheiten ATPase 2, beta 2, beta 5, MECL-1 und LMP7. Sie alle sind gegenüber den normalen IMACs signifikant höher exprimiert, mit Ausnahme von ATPase 2, die jedoch die gleiche Tendenz zu höheren Werten aufweist.

Da bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass intestinale IMACs aus normaler, nicht entzündeter Mukosa etliche proinflammatorische Fähigkeiten durch eine spezifische Differenzierung verloren haben, lag nun der Verdacht nahe, dass es bei der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu einer Reaktivierung und konsekutiv vermehrten Expression von Proteasomen in den ruhenden IMACs kommt.

Um die Vermutung zu bestätigen wurden die Makrophagen von CED Patienten mittels Taqman[®]-Analysen auf die gleichen proteasomalen Untereinheiten hin untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass ebenso in Makrophagen aus Patienten mit Morbus Crohn als auch in denen mit Colitis ulcerosa die proteasomalen Untereinheiten ATPase 2, beta 2, beta 5, MECL-1 und LMP7 im Vergleich zu IMACs aus nicht entzündeten Därmen vermehrt exprimiert werden. Insgesamt waren alle untersuchten Untereinheiten in den Patienten, die an Colitis ulcerosa erkrankt waren, stärker exprimiert als in den Patienten, die an Morbus Crohn litten. Statistisch signifikant höhere Werte gegenüber den normalen IMACs wiesen jedoch nur die Makrophagen aus stärker entzündeten Darmresektaten auf. Die Proteasomen-Untereinheiten der Makrophagen, die aus moderat befallener Mukosa isoliert wurden, wiesen weder in der CU- noch in der MC-Gruppe relevant höhere Werte als die normalen IMACs auf.

Im Vergleich von Makrophagen aus stark entzündeter Mukosa mit denen aus moderat befallenen Bereichen zeigte sich entsprechend dazu, dass alle Proteasomen-Untereinheiten in den stark entzündeten Bereichen in signifikant höherer Menge exprimiert waren als in den milde entzündeten Präparaten, mit zwei Ausnahmen. In der Morbus Crohn Gruppe war der Unterschied der beta 5 Expression nicht signifikant unterschiedlich, ebenso verhielt es sich in der Colitis ulcerosa Gruppe mit der LMP7 Expression. Jedoch besteht bei beiden Gruppen ebenfalls eine deutliche Tendenz zu vermehrter Expression proteasomaler Untereinheiten in der Makrophagenpopulation aus stark entzündeten Kolonbereichen.

Blutmonozyten, die aus CED-Patienten isoliert wurden, besaßen keine erhöhte Expression proteasomaler Untereinheiten im Vergleich zu den Blutmonozyten und Makrophagen aus gesunden Patienten. Sie wiesen aber signifikant niedrigere Werte gegenüber den Makrophagen aus der MC- und CU-Gruppe auf.

Im Vergleich der Expression der konstitutiven Proteasomen-Untereinheiten beta 2 und beta 5 mit ihren INF- γ -induzierbaren Homologen zeigte sich, dass sowohl MECL-1 als auch LMP7 vor allem in Makrophagen aus MC-Patienten gegenüber ihren konstitutiven Pendanten vermehrt exprimiert sind während sich bei den normalen IMACs kein Unterschied feststellen ließ. Bei den CU-Patienten weist nur MECL-1 im Vergleich zu beta 2 eine eindeutig vermehrte Expression auf, wohingegen der Unterschied zwischen beta 5 vs. LMP7 geringer ausgeprägt ist.

Um zu sehen, ob die Veränderungen auf mRNA Ebene auch auf Protein-Expression Ebene bestehen, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Sowohl für MECL-1 als auch LMP7 konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Makrophagen in den Paraffinschnitten aus Gewebe von Patienten, die an Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erkrankt waren, diese proteasomalen Untereinheiten in deutlich größerer Anzahl enthielten als die nicht entzündeten, normalen IMACs. Des Weiteren enthielt das Gewebe der Sigmadivertikulitis-Gruppe eindeutig weniger Untereinheiten von MECL-1 und LMP7 wenngleich eine geringfügig stärkere Anfärbung von Makrophagen als bei den Kontrollen vorhanden war.

Neben den Taqman[®]-Versuchen auf RNA-Ebene und der immunhistochemischen Färbung zeigte der Proteinnachweis im Western Blot korrespondierende Ergebnisse. In den Biopsie-Lysaten der CED Patienten war sowohl MECL-1 als auch LMP7 in eindeutig größerer Menge vorhanden als in den Lysaten der Kontrollgruppe. Die Untereinheit ATPase 2 liegt bei den CED Patienten möglicherweise in einer aufgespaltenen Form vor.

Abschließend konnte mittels eines Proteasomenfunktionstests gezeigt werden, dass eine signifikant höhere proteasomale Aktivität in den Biopsielysaten der Patienten mit CED als in der Kontrollgruppe vorhanden war.

Die IMACs aus normaler Mukosa weisen also gegenüber den *in vitro* differenzierten Makrophagen ein geringeres Potential für die Induktion von Immunreaktionen auf, die maßgeblich durch das Proteasom vermittelt werden.

6.2. Das Proteasom und seine Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen

Eine Überfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems, führt zu einem pathologisch beschleunigten Abbau von Proteinen, die auf dem MHC-Klasse-I-Komplex dem Immunsystem präsentiert werden. Durch die Sensibilisierung des Immunsystems gegen körpereigene Proteine entstehen Erkrankungen aus dem rheumatologischen und allergischen Formenkreis, die ebenso wie die Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen durch ein autoimmunes Geschehen hervorgerufen werden.

Für die CED konnte in dieser Arbeit bewiesen werden, dass eine signifikant höhere Expression von Proteasomenuntereinheiten, insbesondere den proteolytisch aktiven Untereinheiten des Immunproteasoms, vorliegt. Dass bei anderen Autoimmunerkrankungen ebenfalls eine erhöhte Expression von Proteasomen-Untereinheiten vorliegt konnten Egerer und Kuckelkorn für die Rheumatoide Arthritis, die autoimmune Myositis, den Systemischen Lupus erythematodes (SLE) und das Sjögren Syndrom nachweisen¹⁰⁷.

Krause et al. konnten bezüglich der Rheumatoiden Arthritis außerdem eine signifikant erhöhte Expression von MECL-1 in Zellen des peripheren Blutes nachweisen¹⁰⁸, korrespondierend dazu enthielten die hier untersuchten IMACs von CED Patienten ebenfalls höhere Mengen an MECL-1.

Des weiteren konnten von Egerer et al. eine vermehrte Expression von LMP7 in Biopsien von Speicheldrüsengewebe von Patienten, die am Sjögren Syndrom leiden, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene festgestellt werden¹⁰⁹, während Krause et al. in den PBMCs von Sjögren Syndrom Patienten eine erhöhte Anzahl von LMP2, MECL-1 und PA28 α auf mRNA-Ebene beschreiben.¹¹⁰ Diese Arbeit hat bewiesen, dass v.a. MECL-1 und LMP7 auch in IMACs von MC und CU Patienten vermehrt exprimiert werden.

Subhankar et al. diskutieren zudem eine erhöhte proteasomale Aktivität bei der Entstehung von Erkrankungen wie Psoriasis, dem allergischen Asthma, der Multiplen Sklerose und den seronegativen Spondylarthritiden, ebenso wie bei Erbkrankheiten wie der Cystischen Fibrose, des α 1-Antitrypsin-Mangels und von M. Wilson spielt eine erhöhte Aktivität des Proteasoms eine Rolle.¹¹¹ Nun konnte bewiesen werden, dass auch bei CED eine erhöhte Expression bzw. Aktivität des Proteasoms vorliegt.

Bei allen untersuchten Erkrankungen, die dem autoimmunologisch-rheumatischen Formenkreis zugerechnet werden, konnte somit eine erhöhte Menge an Proteasomen-Untereinheiten festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Unterhaltung der Entzündungsreaktion spielt und sich dadurch als interessantes Ziel therapeutischer Maßnahmen erweisen könnte^{112, 113}.

6.3. Die physiologische und pathologische Suppression des Proteasoms

Im Darm ist eine verminderte Aktivität des Proteasoms physiologisch. Da im Intestinaltrakt eine große Kontaktfläche zwischen Epithel und Antigenen besteht, verhindert eine Herabregulation des Immunsystems eine unkontrollierte chronische Entzündung. Makrophagen, die normalerweise Entzündungsreaktionen mit aufrecht erhalten, besitzen im Darm einen anergen Phänotyp.¹¹⁴ Passend dazu konnte in dieser Arbeit bewiesen werden, dass die untersuchten Proteasomenuntereinheiten in normalen IMACs im Vergleich mit MC und CU signifikant geringer exprimiert werden.

Der großen Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen liegt ebenfalls eine verminderte Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems zugrunde. Sie zeichnen sich durch eine Akkumulation von beschädigten oder abnormalen ubiquitinylierten Proteinen aus. Zu ihr gehören Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung oder M. Huntington^{115,116,117,118}. Die beschädigten Proteine, die sich in den Zellen zu Plaques, Filamenten und Aggregaten verdichten und sich als sog. Einschlusskörperchen zeigen, führen ihrerseits zu einer weiteren Aktivitätsminderung der proteasomalen Proteindegradation und damit zu einem Absterben von Neuronen. Zusätzlich scheint der altersabhängige Verlust des antioxidativen Schutzes der Zellen die Proteasomen selbst, vor allem aber das 26S Proteasom, zu betreffen, die selbst anfällig für Inaktivierung

aufgrund von oxidativem Stress zu sein scheinen¹¹⁹. So sind Proteasomen, die selbst durch oxidative Prozesse geschädigt wurden, nicht mehr in der Lage, die oxidierten Proteine, die sich bei genannten neurodegenerativen Erkrankungen ansammeln, abzubauen.

6.4. Ergebnisse und Konzepte zu CED

6.4.1. Ergebnisse der Arbeit im Vergleich mit Konzepten zu Morbus Crohn

Es besteht die Annahme, dass es durch eine fehlerhafte Aktivierung der NF- κ B abhängigen T_H1 Immunantwort durch Mutation des NOD2/CARD15 Gens zu einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen im GI-Trakt kommt.¹²⁰ Makrophagen in der Lamina propria dieser Patienten produzieren große Mengen an Zytokinen wie IL-12, IL-18 und TNF- α , die eine immunologische T_H1 Antwort induzieren. Des Weiteren konnte mit INF- γ das Schlüssel-Zytokin der T_H1 Antwort in großer Zahl nachgewiesen werden¹²¹. Auch in dieser Arbeit konnte korrespondierend zu den genannten Ergebnissen durch eine deutlich größere Expression von Proteasomen-Untereinheiten bei Morbus Crohn Patienten im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine abnormal verstärkte Aktivierung des Immunsystems bestätigt werden. Vor allem die INF- γ -induzierbaren Untereinheiten des Immunproteasoms MECL-1, die in den Makrophagen von MC- Patienten signifikant vermehrt exprimiert wird, und LMP7, die in größerer Menge als ihr konstitutives Homolog beta 5 vorliegt, sprechen für eine Aktivierung des Immunsystems über T_H1 Zytokine.

Die Ergebnisse der Studie von Barnich et al.¹²² sind ebenfalls gut mit den Resultaten dieser Arbeit in Einklang zu bringen. Das signifikant höhere Vorkommen von Immunproteasomen in Morbus Crohn Patienten, das auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, erklärt sich laut Barnich et al. durch die kontinuierliche TNF- α Sekretion von Makrophagen, die durch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Darmflora entzündlich aktiviert werden. Da TNF- α zudem über TRAF und andere Signalproteine den IKK-Komplex zu aktivieren vermag, stellt es einen potenten Aktivator von NF- κ B dar. NF- κ B selbst baut wiederum zum einen I κ B ab, wodurch es über einen positiven Feedback-Mechanismus zu einer vermehrten NF- κ B Aktivierung kommt, zum anderen reguliert er die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-8.¹²³ So könnte eine T_H1

Immunantwort in Gang gehalten werden, deren typisches Zytokinmuster die Expressierung proteasomaler Untereinheiten weiter fördert.

Visekruna et al. untersuchten ebenfalls die Struktur der Proteasomen aus Darmgewebe von Crohn Patienten. Es zeigte sich eine erhöhte Expression der Untereinheit beta 2i, aber auch von beta 1i, in CED Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. In dieser Arbeit besteht ebenfalls eine signifikant höhere Expression von beta 2i in IMACs von Crohn Patienten, insbesondere in den stark entzündeten Colonabschnitten.

Zudem konnten Visekruna et al. beweisen, dass der NF- κ B Vorläufer p105 in Gegenwart von 26S Proteasomen von Crohn Patienten deutlich schneller abgebaut wird, als von den Proteasomen der Colitis Patienten bzw. der Patienten ohne CED. Durch die in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesene erhöhte Expression von Untereinheiten des 26S Proteasoms ist ebenso eine vermehrte NF- κ B Aktivierung anzunehmen, aufgrund des o. g. vermehrten Abbaus von I κ B. Zudem haben *in vitro* Versuche gezeigt, daß die Prozessierung von p105 ATP-abhängig verläuft, was nur über die 26S Proteasomen, nicht aber über die 20S Proteasomen verlaufen kann. In dieser Arbeit konnte in Darmresektaten von MC Patienten ein signifikant höherer Anteil von MECL-1 nachgewiesen werden, einer Untereinheit des 26S Proteasoms, was die Daten von Visekruna et al. bestätigt.

Ebenfalls korrespondierend zu dieser Arbeit wurde in der Mukosa von Crohn Patienten ein kombiniertes Auftreten von MECL-1 und p65, einer Untereinheit des aktivierten NF- κ B, nachweisen. Durch die Aktivierung von NF- κ B und einer darauf folgenden T_H1-vermittelten Immunantwort über frühe entzündliche Signale soll sich eine vermehrte INF- γ Produktion mit erhöhter Expression von Immunproteasomen und NF- κ B Aktivierung erklären. Dass sich in der in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbung gerade in den subepithelialen Makrophagen von Morbus Crohn Patienten besonders viele proteasomale Untereinheiten, insbesondere auch MECL-1, detektieren ließen, würde diese Theorie bestätigen.

6.4.2. Ergebnisse der Arbeit im Vergleich zu Konzepten zu Colitis ulcerosa

In dieser Arbeit zeigen Patienten, die an Colitis ulcerosa leiden, eine erhöhte Expression von allen untersuchten proteasomalen Untereinheiten. Visekruna et al. untersuchten ebenfalls die Bestandteile des Proteasoms auf ihr Vorkommen im Gewebe von CED-Patienten¹²⁴. Laut ihrer Studie besitzen MC und CU-Patienten ein charakteristisches Muster proteasomaler

Untereinheiten, das helfen könnte, zwischen den beiden Erkrankungen zu differenzieren. Die Expression von LMP7 war in allen drei Patientengruppen (M. Crohn, Colitis ulcerosa und normalen IMACs) ähnlich hoch exprimiert im Gegensatz zu beta 5, das insgesamt nur in geringen Mengen vorlag. In dieser Arbeit jedoch war in CU und MC Patienten LMP7 in signifikant höheren Mengen vorhanden als in den Kontrollen. Zudem besteht laut Visekruna et al. zwischen der MECL-1 und der beta 2 Expression in CU-Patienten ein Verhältnis von ca. 1:1 wohingegen es bei MC größer 1 ist was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt, da in den Resektaten der CU Patienten kein signifikanter Unterschied in der beta2/MECL-1 Expression besteht, wohl aber bei den MC Patienten.

Visekruna et al. kamen zu dem Schluss, dass es im humanen Gewebe nicht nur homogene konstitutive und Immun-Proteasomen gibt sondern auch heterogene Proteasomen mit beta1, beta2 und LMP7 Einheiten in größeren Mengen existieren. LMP7 scheint daher auch in gesunden Individuen vermehrt vorhanden sein. Die konstitutive Expression von LMP7 soll eine Anpassung des menschlichen Verdauungstraktes an den häufigen Kontakt mit Antigenen darstellen, da es in der Lage ist, schnell die Expression aller 3 Immuno-Untereinheiten zu induzieren, da LMP7 für das Zusammenfügen der Immunoproteasomen verantwortlich ist.¹²⁵ In dieser Arbeit konnte jedoch keine signifikant höhere Menge LMP7 bei IMACs aus nicht entzündeter Mukosa nachgewiesen werden. Vor allem LMP7 scheint aber eine wichtige Rolle bei der Präsentation von MHC I Peptiden und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu spielen¹²⁶.

Für Morbus Crohn konnte bereits gezeigt werden, daß das Zytokinmuster einer T_H1 Zell-Antwort mit seinem Marker-Zytokinen INF- γ und IL-12 für die Erkrankung charakteristisch ist, was sich auch in dieser Arbeit durch signifikant erhöhte proteasomale Untereinheiten widerspiegelt, allen voran MECL-1 und LMP7.

Murata et al. untersuchten die Produktion von proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen in Patienten mit Colitis ulcerosa und IMACs aus nicht entzündeten Därmen. Bei aktiver Colitis ulcerosa waren vor allem die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α erhöht, INF- γ hingegen erniedrig. Das am höchsten exprimierte Zytokin bei aktiver Colitis ulcerosa war jedoch das regulatorisch wirksame IL-10.¹²⁷ In dieser Arbeit war die Expression von MECL-1 bzw. LMP7 in IMACs aus Patienten mit stark aktiver CU im Vergleich zu IMACs aus CU Patienten in Remission nicht signifikant unterschiedlich. Dies könnte an dem laut Murata et al. für die Colitis ulcerosa typischen T_H2-Zytokin IL-10 liegen, das in den Entzündungsprozess regulatorisch eingreift.

6.4.3. Konstitutive vs. INF- γ induzierbare proteasomale Untereinheiten

Im direkten Vergleich der konstitutiven mit den INF- γ induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bestand bei MECL-1 vs. beta2 eine erkennbar höhere Expression von MECL-1 sowohl in entzündeter als auch in nicht entzündeter Mukosa. Im Gegensatz dazu stellt sich im Vergleich LMP7 vs. beta5 nur ein geringer Unterschied dar. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte die in verschiedenen Studien beschriebene Kernrolle für beta 5 und LMP7 beim Aufbau des Proteasoms sein.

Griffin et al. beschrieben in einer Studie, dass es in LMP7-defizienten Mäusen zu einer Akkumulation von LMP2 und MECL-1 kommt, da der Proteasomen-Aufbau ineffizient war, obwohl es insgesamt zu einer vermehrten Synthese von Untereinheiten kam. Da Präproteasomen, die bereits LMP2 und MECL-1 enthalten, den Einbau von LMP7 favorisieren, können sie nicht ausreifen, wenn nur das konstitutive Homologe beta 5 vorhanden ist. Des Weiteren zeigte sich, dass LMP7 defiziente Mäuse geringere Mengen von allen drei induzierbaren Untereinheiten aufwiesen und den ausgeprägtesten Phänotyp bezüglich mangelnder MHC Klasse I Expression hatten¹²⁸. Die oben genannte ähnliche Arbeit von Visekruna et al. beschreibt nur LMP2 und MECL-1 als INF- γ -induzierbare Untereinheiten und LMP7 als konstitutiv im Intestinum exprimiert. Möglicherweise stellt diese basale LMP7 Expression eine spezifische Anpassung des menschlichen Darms dar, um alle drei Immuno-Untereinheiten besonders rasch induzieren zu können, da laut Griffin et al. LMP7 den Aufbau des Immunproteasoms katalysieren kann.

6.5. Die neuen Erkenntnisse

Chronische Entzündungen versucht man mittlerweile im Maus-Modell durch Hemmung des Proteasoms zu lindern. Durch eine Stabilisierung von I κ B soll die Freisetzung und Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen und T-Zellen verhindert werden^{129,130}.

Die zentrale Rolle, die NF- κ B bei der Aktivierung des Immunsystems einnimmt, wurde bereits erläutert. Besonders in den Makrophagen und den Epithelzellen aus entzündeten Darmresektaten von CED Patienten konnte man NF- κ B zum einen in erhöhter Anzahl nachweisen, zum anderen lag er vermehrt in seiner aktivierten Form vor.¹³¹ Die Menge des aktiven NF- κ B korrelierte also mit dem Schweregrad der Entzündung.¹³² Die erhöhte

Expression von proteasomalen Untereinheiten in IMACs von CU und MC Patienten, die in dieser Arbeit bewiesen wurde, deckt sich mit den erhöhten aktiven NF- κ B Spiegeln, da dieser vom Proteasom in seine aktivierte Form überführt wird. In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in den entzündeten Darmabschnitten die Untereinheiten des Proteasoms in signifikant höherer Menge exprimiert wurden, was ebenfalls zu der Korrelation von NF- κ B mit dem Grad der Entzündung passt.

Die derzeit zur Behandlung von CED verwendeten Immunsuppressiva wie Steroide, Sulfasalazin, Methotrexat und anti-TNF- α -Antikörper wirken zumindest teilweise auch über eine Hemmung der NF- κ B Aktivität.^{133,134,135,136} So zeigten LPMNC von Patienten, die mit Kortison behandelt wurden, einen signifikant geringeren NF- κ B p65 Spiegel als Zellen von unbehandelten Patienten.¹³⁷ Der Versuch, NF- κ B direkt mit spezifischen p65-anti-sense-Oligonucleotiden zu hemmen, hat zu einer verminderten Zytokinproduktion von intestinalen Makrophagen bei Crohn Patienten geführt.¹³⁸

Auch Herfarth et al. konnten in Mäusen mit DSS (*dextrane sulphate sodium*)-induzierter Kolitis eine erhöhte NF- κ B Aktivität in der intestinalen Mukosa nachweisen. Nach der intraperitonealen Applikation von Gliotoxin, einem toxischen Metaboliten pathogener Pilze, der bereits als NF- κ B Inhibitor *in vitro* diskutiert wurde¹³⁹, waren sowohl die NF- κ B Aktivität als auch die Expression von TNF- α vermindert, was zu einer signifikanten Verringerung der intestinalen Entzündung führte.¹⁴⁰ Im Gegensatz zu anderen Studien, die gezeigt haben, dass eine ausschließliche bzw. zu späte Blockade von TNF- α die intestinale Entzündung im Maus-Modell nicht ausreichend verhindern kann^{141, 142, 143}, ist es jedoch möglich über eine Inaktivierung von NF- κ B sowohl die Anfänge einer Entzündungsreaktion als auch ihre Hochregulation zu verhindern. Die erhöhte Expression von Proteasomen-Untereinheiten, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, korreliert gut mit den Ergebnissen dieser Studie, da eine vermehrte proteasomale Aktivität und NF- κ B Aktivierung über einen positiven Feedback-Mechanismus eng miteinander verknüpft sind. Die intraperitoneale Verabreichung von Gliotoxin führte jedoch nicht nur zu einer lokalen sondern einer systemischen Immunsuppression, wodurch sich ein relativ enger therapeutischer Bereich ergibt.

Da die Kontrolle von NF- κ B vielversprechend schien, wurden auch spezifische Proteasomen-Hemmer entwickelt, die durch Stabilisierung von I κ B die Aktivierung von NF- κ B verhindern sollten.¹⁴⁴ Da in den intestinalen Makrophagen der CED Patienten proteasomale Untereinheiten erhöht exprimiert werden, wie in dieser Arbeit bewiesen wurde, könnte die

Behandlung mit einem Proteasomen-Inhibitor die Entzündung der Darmmukosa lindern. Diverse Studien erbrachten jedoch unterschiedliche Ergebnisse.

Naujokat et al. untersuchten die Auswirkungen einer spezifischen Inhibierung der Chymotrypsin-like Peptidase Aktivität der beta5 Untereinheit in Dendritischen Zellen, die aus humanen peripheren Blutmonozyten generiert wurden.¹⁴⁵ Eine Reihe von Basisfunktionen der Zellen wie Differenzierung und T-Zell-Stimulation waren davon betroffen, was zur Apoptose der Zellen führte. Des Weiteren wird die Translokation von NF- κ B in den Nukleus inhibiert und die Produktion von IL-12 verringert.

In einer anderen Studie untersuchten Inoue et al den Effekt von MG132 auf die experimentelle entzündliche Darmerkrankung im Mausmodell.¹⁴⁶ Verwendet wurden IL-10^{-/-} Knockout Mäuse und Mäuse mit DSS induzierter Kolitis. Die Applikation von MG132 verbesserte die Entzündung der Knockout-Mäuse deutlich u.a. durch Senkung der TNF- α Expression und durch die Hemmung der Translokation von NF- κ B p65 in den Nukleus. Die Mäuse mit DSS-Kolitis, die mit MG132 behandelt wurden, wiesen jedoch höhere histologische Entzündungsscores und TNF- α Spiegel auf als die Kontroll-Mäuse. Diese Daten zeigen, dass NF- κ B eine wichtige Rolle in der Regeneration des Epithels nach DSS-induzierten Schleimhautschäden spielt. Zusammenfassend spielt die NF- κ B Aktivierung bei chronischer intestinaler Entzündung eine andere Rolle als bei einer akuten intestinalen Entzündung. Somit hat die NF- κ B Blockade die chronische immunogen-vermittelte Kolitis verbessert, aber die Heilung der DSS-induzierten Kolitis verhindert. In anderen Studien führte die Entfernung von IKK zu einer chronischen intestinalen Entzündung und zur Apoptose des Darmepithels in Knockout Mäusen.^{147,148} NF- κ B reguliert somit nicht nur den Entzündungsvorgang sondern auch die epitheliale Intaktheit.

Zieht man die Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht, weisen die IMACs von CED Patienten eine deutlich höhere Expression von Untereinheiten des Proteasoms auf, dennoch besteht z. B. kein signifikanter Unterschied in der Expression von beta 5 und LMP7. Dies kann auch ein Hinweis darauf sein, dass diese Proteine eher eine Basisfunktion in den IMACs besitzen, die u.a. zur Regulierung von NF- κ B bei nicht-entzündlichen Prozessen beiträgt, und nicht nur als speziell bei Entzündungsreaktionen modulierbare Proteine fungieren.

Wird das Proteasom selbst an seinen aktiven Seiten gehemmt, zeigt es durchaus Adaptationsmechanismen, so dass nur eine Verringerung seiner Funktion, nicht jedoch eine komplette Hemmung eintritt, da das Proteasom einen Feedback-Mechanismus besitzt, dass ihm eine Autoregulation und somit eine Kompensation von ungenügender Proteasomen-Aktivität

erlaubt.¹⁴⁹ Nachdem man Zellen *in vitro* acht Stunden lang dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib ausgesetzt hatte, zeigten sie eine bis zu 64-fach erhöhte Expression von alpha- und beta-Untereinheiten sowie von 19S-Regulatoren. Die Zellen behielten durch die Hochregulierung der Expression von Proteasomen-Untereinheiten ihre Überlebensfähigkeit trotz der Behandlung mit letalen Konzentrationen von Proteasomen-Hemmstoffen.¹⁵⁰

Durch partielle Unterdrückung der proteasomalen Funktion durch einen Proteasomen-Inhibitor, dessen Dosis langsam gesteigert wird, könnten möglicherweise auch die Epithelzellen des Darmes auf der einen Seite geschützt werden, zum anderen die gesteigerte Expression der Untereinheiten des Immunproteasoms erfolgreich verhindert werden. Werden weniger Immunproteasomen in den IMACs geformt, würde es auch zu einer geringeren Aktivierung von NF- κ B kommen.

Nachdem die Rolle des Proteasoms bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Entzündungen beschrieben und seine erhöhte Expression in den intestinalen Makrophagen von CED Patienten bewiesen wurde, können Untersuchungen mit Proteasomen-Inhibitoren Aufschluss darüber geben, ob eine Behandlung, die auf die Supprimierung des Proteasoms abzielt, diesen Patienten Linderung verschaffen könnte.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Aderem A and Ulevitch RJ, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 2000, 406: 782-7
- (2) Aderem A and Underhill DM, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol* 1999, 17: 593-623
- (3) Fraser IP, Koziel H and Ezekowitz RA, The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity, *Semin Immunol* 1998, 10: 363-72
- (4) Janeway, C. and Travers, P., *Immunobiology*, 5th Edition, Garland Publishing, New York, 2001
- (5) Fanger MW, Shen L, Graziano RF, et al., Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG, *Immunol Today* 1989, 10:92-9
- (6) Bonta IL and Ben-Efraim S, Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity, *J Leukoc Biol* 1993, 54: 613-26
- (7) Andus T., Rogler G., Daig R., et al., The role of macrophages, *Inflammatory Bowel Disease*, Kluwer Academic Publisher, Boston, London 1995, 281-297
- (8) Todd RF, 3rd, Griffin JD, Ritz J, et al., Expression of normal monocyte - macrophage differentiation-antigens on HL60 promyelocytes undergoing differentiation induced by leukocyte-conditioned medium or phorbol diester, *Leuk Res* 1981, 5: 491-5
- (9) Clarkson S and Ory PA, CD16, Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes, *J Exp Med* 1988, 167: 408-20
- (10) Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, et al., Evidence for a CD14+ Population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa-implications for pathogenesis, *Clin Exp Immunol* 1995, 100:291-7
- (11) Mahida YR, Patel S, Gionchetti P, et al., Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum, *Gut* 1989, 30:826-34
- (12) Malizia G, Calabrese A, Cottone M, et al., Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 1991, 100:150-9

-
- (13) Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al., Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation, *Gastroenterology* 2002, 1987-2000
 - (14) Hausmann M, Spöttl T, Andus T, et al., Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH-oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages, *Clin Exp Immunol* 2001, 125:48-55
 - (15) Hausmann M, Obermeier F, Schreiter K, et al., Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages, *Clin Exp Immunol* 2004, 136: 157-67
 - (16) Havran WL and Boismenu R, Activation and function of gamma delta T cells, *Curr Opin Immunol* 1994, 6: 442-6
 - (17) Stryer, Chapter 14, *Antibodies and T-Cell Receptors*, pages 367-370
 - (18) Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, et al., Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules, *Nature* 1991, 351: 290-6
 - (19) Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, et al., The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC, *Cell* 1992, 70:1035-78
 - (20) Lehner PJ and Cresswell P, Processing and delivery of peptides presented by MHC class II molecules *Curr Opin Immunol* 1996, 8:59-67
 - (21) Madden DR, The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes, *Annu Rev Immunol* 1995 13:587-622
 - (22) Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, et al., Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides, *Science* 1996, 272:1001-4
 - (23) Stryer, Chapter 14, *Antibodies and T-Cell Receptors*, pages 372-378
 - (24) Heemels MT, Schumacher TN, Wonigeit K, Ploegh HL, *Science* 262 (1993) 2059-2063
 - (25) Janeway CA, P Travers, M Walport, JD Capra. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Publishers, 1999
 - (26) Groll M, Ditzel L, Lowe J, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution *Nature*, 1997, 3: 437 - 8

-
- (27) Djaballah H, Rowe A, Harding S, Rivett J, The multicatalytic proteinase complex (proteasome): structure and conformational changes associated with changes in proteolytic activity, *Biochem. J.* (1993) 292, 857-862
- (28) Zuhl F, Seemuller E, Golbik R, Baumeister W, Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome, *FEBS Lett*, 1997, 418: 189-94
- (29) Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, Tsukihara T, Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution, *J Biochem Tokyo*, 2002, 131: 171-3
- (30) Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 383:1–16.
- (31) B. Strehl, U. Seifert, E. Krüger, S. Heink, Interferon- γ , the functional plasticity of the ubiquitin–proteasome system and MHC class I antigen processing, *Immunological Reviews* 2005, 207: 19–30
- (32) Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ, Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits, *EMBO J.*, 1997, 16: 5363-75
- (33) Seemüller E, Lupas A, Baumeister W, *Nature* 1996, 382: 468-71
- (34) Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ, Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits, *EMBO J.*, 1997, 16: 5363-75
- (35) Mita D, Krupakar J, Elenich L, Monaco JJ, Colbert RA, beta2 Subunit Propeptides Influence Cooperative Proteasome Assembly, *J Biol Chem*, 2003, 278: 6153-9
- (36) Griffin TA, Slack JP, McCluskey TS, Monaco JJ, Colbert RA, Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly, *Mol Cell Biol Res Commun* 2000, 3: 212-7
- (37) Heinemeyer W, Ramos PC, Dohmen RJ, The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core, *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 1562-78
- (38) Ditzel L, Huber R, Mann K, Heinemeyer W, Wolf DH, Groll M, Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome, *J Mol Biol* 1998, 279: 1187-91

-
- (39) Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, Tsukihara T, Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution, *J Biochem Tokyo*, 2002, 131: 171-3
- (40) Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ, Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits, *EMBO J.*, 1997, 16: 5363-75
- (41) Griffin TA, Nandi D, Cruz M, et al., Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of Interferon gamma-inducible Subunits, *J Exp Med*, 1998, 187: 97-104
- (42) Orłowski M, Wilk S, Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex, *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383: 1-16
- (43) Kisselev AF, Akopian TN, Castillo V, Goldberg AL, Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown, *Mol Cell* 1999, 4: 395-402
- (44) Eleuteri AM, Kohanski RA, Cardozo C, Orłowski M, *J. Biol Chem* 272 (1997) 11824-11831
- (45) Glickman MH, Rubin DM; Coux O, Wefes I, Pfeifer G, A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell* 1998, 94: 615-23
- (46) Cheryl Y, Teoh and Kelvin JA, Davies, Potential roles of protein oxidation and the immunoproteasome in MHC class I antigen presentation; the PrOxI hypothesis; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423 (2004) 88-96
- (47) Jiangping Wu, On the Role of Proteasomes in Cell Biology and Proteasome Inhibition as a Novel Frontier in the Development of Immunosuppressants, *American Journal of Transplantation* 2002, 2: 904-912
- (48) JR Knowlton, SC Johnston, FG Whitby; *Nature* 390 (1997) 639-643
- (49) Aaron Ciechanover, Amir Orian, Alan L. Schwartz, The Ubiquitin-Mediated Proteolytic Pathway: Mode of Action and Clinical Implications, *Journal of Cellular Biochemistry Supplement* 34:40–51 (2000)
- (50) Tanahashi N, Yokota K, Ahn JY, Chung CH, Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation. *Genes Cells* 1997, 2(3): 195-211

-
- (51) Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002; 82:373–428.
- (52) Yao T, Cohen RE, Cyclization of polyubiquitin by the E2-25K ubiquitin conjugating enzyme, *J Biol Chem*, 2000, 275: 36862-8
- (53) Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature.* 2002;419:403–407.
- (54) Cezary Wojcik, Mario Di Napoli, Ubiquitin-Proteasome-System and Proteasome Inhibition: New Strategies in Stroke Therapy
- (55) Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC, Manning AM. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I β -phosphorylation. *J Immunol* 1995;155: 3538–45.
- (56) Rogler G, Brand K, Vogl D, Schölmerich J, et al., Nuclear Factor κ B is activated in Macrophages and Epithelial Cells of Inflamed Intestinal Mucosa
- (57) Cezary Wojcik and Mario Di Napoli, Ubiquitin-Proteasome System and Proteasome Inhibition: New Strategies in Stroke Therapy, *Stroke* 2004;35;1506-1518
- (58) Neurath MF and Schurmann G, Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases, *Chirurg* 2000 71: 30-40
- (59) Klein I, Reif S, Farbstein H, et al., Preillness non dietary factors and habits in inflammatory bowel disease, *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998, 30: 247-51
- (60) Binder V and Orholm M, Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease *Neth J Med* 1996; 48: 53-6
- (61) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 2001, 411: 599-603
- (62) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 2001, 411: 603-6
- (63) Helio T, Halme L, Lappalainen M, et al.: CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease, *Gut* 2003, 52:558-562

-
- (64) Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al.: CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002, 70: 845-875
- (65) Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, et al: CARD15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn
- (66) Vermeire S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 004;18:569–75
- (67) Rogler G and Antus T. Cytokines in inflammatory bowel disease, *World J Surg* 1998, 22: 382-9
- (68) Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, et al., Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 1995, 108: 1434-44
- (69) Andus T, Daig R, Vogl D, et al., Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist genotype 2, *Gut* 1997, 41: 651-7
- (70) Caisini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, et al, Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation, *J Immunol* 1995, 154: 2434-40
- (71) Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, et al., Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD), *Clin Exp Immunol* 1998, 112: 435-42
- (72) Jansen JH, Wientjens GJ, Figge WE, et al., Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4, *J Exp Med* 1989, 170: 577-82
- (73) Lehn M, Weiser WY, Engelhorn S et al., IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by INF-gamma, *J Immunol* 1989, 143: 3020-4
- (74) Niessner M and Volk BA, Phenotypic and immunoregulatory analysis of intestinal T-cells in patients with inflammatory bowel disease: evaluation of an in vitro model, *Eur J Clin Invest* 1995, 25: 155-64
- (75) West GA, Matruura T, Levine AD, et al., Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity, *Gastroenterology* 1996, 110: 1683-95
- (76) Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, et al., The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis, *J Gastroenterol* 1995, 30 Suppl. 8: 56-60

-
- (77) Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, et al., High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis, *Gut* 1991, 32: 1531-4
- (78) Gross V, Andus T, Caesar I, et al., Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 productions in Crohn's disease, *Gastroenterology* 1992, 102: 514-9
- (79) Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, et al., Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, *J Clin Immunol* 1996, 16: 144-50
- (80) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, et al., IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *J Immunol* 1991, 147: 3815-22
- (81) Maeda M, Watanabe N, Neda H, et al., Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease, *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992, 14: 451-61
- (82) Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, et al., Tumour necrosis factor alpha in stool as marker of intestinal inflammation, *Lancet* 1992, 339: 89-91
- (83) Andus T, Targan SR, Deem R, et al., Measurement of tumor necrosis factor alpha in small numbers of cells by quantitative polymerase chain reaction, *Reg Immunol* 1993, 5: 11-7
- (84) Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, et al., Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4+ TH1-like responses, *J Clin Invest* 1996, 98: 1010-20
- (85) Levings MK, Sangregorio R, Galbati F, et al., IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells, *J Immunol* 2001, 166: 5530-9
- (86) Waidmann M, Allemand Y, Lehmann J, et al., Microflora reactive IL-10 producing regulatory T cells are present in the colon of IL-2 deficient mice but lack efficacious inhibition of IFN-gamma and TNF-alpha production, *Gut* 2002, 50: 170-9
- (87) Das G, Augustine MM; Das J, et al., An important regulatory role for CD4+ CD8+ alpha alpha T Cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 5324-9
- (88) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, et al., Extreme TH1 bias of invariant Valpha 24JalphaQT cells in type 1 diabetes, *Nature* 1998, 391: 177-81

-
- (89) Sumida T, Sakamoto A, Murata H, et al., Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis, *J Exp Med* 1995, 182: 1163-8
- (90) Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, et al., Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers, *Gut* 1991, 32:403-7
- (91) Capobianchi MR, Fais S, Mercuri F, et al., Interferon-alpha production by human intestinal mononuclear cells. Response to virus in control subjects and in Crohn's disease. *Gut* 1992, 33: 897-901
- (92) Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, et al., Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa, *Immunology* 1993, 78: 127-31
- (93) Nielsen OH, Elmgreen J and Ahnfelt-Ronne I, Serum interferon activity in inflammatory bowel disease. Arachidonic acid release and liposygenation activated by alpha-class interferon in human neutrophils, *Inflammation* 1988, 12: 169-79
- (94) Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, et al., Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa-implications for pathogenesis, *Cin Exp Immunol* 1995, 100: 291-7
- (95) Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, et al., Alternations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997, 9: 893-9
- (96) Rogler G, Hausmann M, Spöttl T, et al., T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999, 11: 1105-11
- (97) Rogler G, Brand K, Vogl D, et al., Nuclear factor kappaB is acitvated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa, *Gastroenterology* 1998, 115: 357-69
- (98) Hausmann M, Mestermann S, Kiessling S, Spöttl T, Herfartz H, Schölmerich J, Rogler G, Toll like receptors 2 and 4 are upregulated during intestinal inflammation, *Gastroenterology* 2002, 122: 1987-2000
- (99) Hausmann M, Spöttl T, Schreiter K, Falk W, Rogler G, Schölmerich J, Induction of MIP-3alpha expression during maturation of intestinal macrophages, *J Immunol* (in Revision)
- (100) in Anlehnung an S. Jähnichen: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:TaqMan_Probes.jpg#filehistory

-
- (101) Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1997; 110:104-113
- (102) Rogler G, Hausmann M, Spottl T, et al. T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:1105-111
- (103) Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 112:1493-1505 1.
- (104) G. Rogler, M. Hausmann M, D. Vogl, E. Aschenbrenner, T. Andus, W. Falk, R. Andreesen, J. Scholmerich, V. Groß: Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 112: 205-215 (1998)
- (105) Müller O, Lightfoot S, Schroeder A; RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control; <http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/documents/Using%20RIN.pdf>
- (106) Spottl T, Hausmann M, Kreutz M, Herfarth H, et al., Intestinal epithelial cells induce differentiation of monocytes into an intestinal-like macrophage phenotype, *J Leukoc Biol* 2001, 70: 241-251
- (107) Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Rückert JC, Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases, *J Rheumatol.* 2002 Oct, 29(10):2027-30
- (108) Krause S, Kuckelkorn U, Dörner T, Burmester G.R., Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjögren's syndrome but not in other autoimmune disorders, *Ann Rheum Dis* 2006;65;1021-1027
- (109) Egerer T, Martinez-Gamboa L et al.; Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2006 May;54(5):1501-8
- (110) Krause S, Kuckelkorn U et al.; Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjögren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis* 2006 Aug;65(8):1021-7. Epub 2006 Jan 13
- (111) Subhankar Paul; Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches; *BioEssays* 30:1172-1184, 2008

-
- (112) Wang J, Maldonado MA, The Ubiquitin-Proteasome System and its Role in inflammatory and autoimmune diseases, *Cell Mol Immunol*. 2006 Aug;3(4):255-61. Review.
- (113) Fissolo N, Kraus M et al., Dual inhibition of proteasomal and lysosomal proteolysis ameliorates autoimmune central nervous system inflammation. *Eur J Immunol* 2008 Sep;38(9):2401-11
- (114) Rogler G, Andus T et al.; Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease; *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 9: 893-899 (1997)
- (115) Keller JN, Hanni KB, et al., Impaired proteasome function in Alzheimer's disease, *J Neurochem* 2000, 75:436-439
- (116) McNaught KSP, Jenner P, Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease, *Neurosci Lett* 2001, 297:191-194
- (117) Kabashi E, Agar JN, Taylor DM, et al., Focal dysfunction of amyotrophic lateral sclerosis, *J Neurochem* 2004, 89:1325-1335
- (118) Zhou H, Cao F, et al., Huntingdon forms toxic NH₂-terminal fragment complexes that are promoted by the age-dependent decrease in proteasome activity, *J Cell Biol* 2003, 163:109-118
- (119) Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, et al., Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress, *Biochem J* 1998, 335:637-642
- (120) Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease; Hugot J-P, Zouali H et al.; *Europ. Journal of Gastroenterology & Hepatology*; 2003, Vol 15 No 6
- (121) Quaglietta L, te Velde A, Staiano A, et al., Functional Consequences of NOD2/CARD15 Mutations in Crohn's Disease, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2007, 44:529-539
- (122) Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E.coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; 117:1566-1574
- (123) Nuclear Factor κ B is activated in Macrophages and epithelial Cells of Inflamed Intestinal Mucosa; Rogler G, Brand K et al.; *Gastroenterology* 1998; 115:357-369
- (124) Visekruna A, Joeris Th et al., Comparative Expression Analysis and Characterization of 20S Proteasomes in Human Intestinal Tissues: The Proteasome Pattern as Diagnostic Tool for IBD Patients; *Inflamm Bowel Dis* 2008;00:000-000

-
- (125) Alexander Visekruna, Thorsten Joeris, Daniel Seidel et al., Proteasome-mediated degradation of I κ B α and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis, *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 116 Number 12 December 2006
- (126) Palmowski MJ, Gileadi U, Salio M, et al. Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *J Immunol* 2006;177:983–990
- (127) Murata Y, Ishiguro Y et al., The role of proinflammatory and regulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis; *J Gastroenterol* 1995 Nov; 30 Suppl 8:56-60
- (128) Griffin TA, Nandi D, Cruz M, et al., Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of Interferon-gamma-inducible Subunits, *J Exp Med*, 1998, 187: 97-104
- (129) Subhankar Paul; Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches; *BioEssays* 30:1172-1184, 2008
- (130) Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL; Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease?; *Scand J Gastroenterol Suppl.* 2002; 236:37-41
- (131) Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH et al.; Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogates established experimental colitis in mice; *Nat Med* 1996; 2:998-1004
- (132) Rogler G, Brand K, Vogl D et al.; Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa; *Gastroenterology* 1998; 115:357-69
- (133) Auphan N, DiDonato JA, Rosette C et al.; Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappaB activity through induction of I kappa B synthesis; *Science* 1995; 270:286-90
- (134) Majumdar S, Aggarwal BB; Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of I kappa Balpha phosphorylation and degradation; *J Immunol* 2001; 167:2911-20
- (135) Weber CK, Liptay S, Wirth et al.; Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of I kappa B kinases alpha and beta; *Gastroenterology* 2000; 119:1209-18
- (136) Guidi L, Costanzo M, Ciarniello M et al.; Increased levels of NF-kappaB inhibitors (I kappa Balpha and I kappa Bgamma) in the intestinal mucosa of Crohn's disease patients during infliximab treatment; *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18:155-54

-
- (137) Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F et al.; Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease; *Gut* 1999; 45:693-704
- (138) Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH et al.; Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB abrogates established experimental colitis in mice; *Nat Med* 1996; 2:998-1004
- (139) Pahl HL, Krauss B et al.; The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB; *J Exp Med* 1996; 183:1829-40
- (140) Herfarth H, Brand K et al.; Nuclear factor-kappaB activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin; *Clin Exp Immunol* 2000; 120:59-65
- (141) Arai Y, Takanashi H et al.; Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice; *Cytokine* 1998; 10:890-6
- (142) Herfarth H, Böcker U et al.; Subtherapeutic corticosteroids potentiate the ability of interleukin-10 to prevent chronic inflammation in rats; *Gastroenterology* 1998; 115:1-11
- (143) Farkas S, Herfarth H et al.; In vivo fluorescence microscopy for assessment of leukocyte-endothelial interaction in the left colon in dextran sulphate sodium-induced colitis; *Gastroenterology* 1998; 114:A973
- (144) Li Q, Verma IM; NF-kappaB regulation in the immune system; *Nat Rev Immunol* 2002; 2:725-34
- (145) Naujokat C, Berges C, Höh A et al.; Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells; *Immunology* 2006; 120: 120-132
- (146) Inoue S, Nakase H, Matsuura M et al.; The effect of proteasome inhibitor MG132 on experimental inflammatory bowel disease; *Clin Exp Immunol*. 2009, Epub ahead of print
- (147) Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R et al.; Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation; *Nature* 2007; 446:557-561
- (148) Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V et al.; Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma; *Cancer Cell* 2007; 11:119-32

- (149) Naujokat C, Fuchs D, Berges C; Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition; *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(9):1389-97
- (150) Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D et al.; Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002); 14374-14379

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Monika Christine Seidl
Geburtsdatum: 02.12.1981
Geburtsort: Regensburg

Schulbildung

2002 Abitur am Goethe Gymnasium Regensburg

Hochschulstudium

2002 – 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2004 Ärztliche Vorprüfung
2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

2005 – 2009 Regulation von Proteinen des Proteasoms/Immunproteasoms bei der
Differenzierung von intestinalen Makrophagen
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler, Universitätsspital Zürich
Schweiz

Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit als Posterbeiträge

A.M. Brandl, M.C. Seidl, K. Menzel, J. Schoelmerich, W. Falk, H. Herfarth, G. Rogler, M. Hausmann. Downregulation of the ubiquitin-proteasome machinery in normal colonic lamina propria macrophages and re-induction in inflammatory bowel disease mucosa.

Digestive Disease Week (DDW), American Gastroenterological Association, Los Angeles, Mai 2006

Poster Auszeichnung mit „Poster of Distinction“

A.M. Brandl, M.C. Seidl, K. Menzel, J. Schölmerich, W. Falk, H. Herfarth, G. Rogler, M. Hausmann. Herunterregulierung der Ubiquitin-Proteasom Maschine in normalen lamina propria Makrophagen aus dem Kolon und Re-induktion in der Mukosa bei Patienten mit CED.

Bayerischer Gastroenterologentag, Rosenheim, Oktober 2006

Poster

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler für das Anvertrauen dieses interessanten Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung während des gesamten Zeitraums der Erstellung der Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Martin Hausmann, Julia Brenmoehl, Katrin Menzel und Claudia Hofmann, die im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn Fragen und Probleme auftauchten.

Meiner Familie, im Besonderen meiner Mutter, die mir meine Ausbildung ermöglicht hat und mich stets uneingeschränkt unterstützt hat, danke ich von ganzem Herzen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaters oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 08.12.2010

Monika Seidl