

Bedeutung von Gp96 für die mukosale Toleranzentwicklung und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät III-Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katja Schreiter
aus Erlangen
2005

Promotionsgesuch eingereicht am:

11. Mai 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. S. Modrow, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender	: Prof. Dr. rer. nat. Kunzelmann
1. Gutachter (1. Prüfer)	: Prof. Dr. rer. nat. S. Modrow
2. Gutachter (2. Prüfer)	: Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler
3. Prüfer	: Prof. Dr. rer. nat. J. Heinze
Ersatzperson	: Prof. Dr. rer. nat. Warth

Dissertation

durchgeführt am Institut für Innere Medizin I der Universität Regensburg
unter Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. S. Modrow

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
und

Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

für Mama

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
β-Me	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinder Serum Albumin)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
ds	Doppelsträngig
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
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)
Gp	Glycoprotein
HANK'S, HBSS	<i>Balanced salt solution</i> nach Hank
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
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
P/S	Penicillin / Streptomycin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
ss	<i>Single strand</i> (Einzelstrang)
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TANK	<i>traf associated NF-κB activator</i>
TBK	<i>TANK binding kinase</i> (TANK bindende Kinase)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	11
1.1	Das Immunsystem – ein Überblick	11
1.2	Die angeborene Immunität als älteste Form der Immunabwehr	12
1.2.1	Monozyten und Makrophagen	13
1.2.1.1	Entstehung von Makrophagen	13
1.2.1.2	Funktion von Makrophagen	14
1.2.2	Differenzierung intestinaler Makrophagen	16
1.3	Das adaptive Immunsystem	18
1.3.1	Zellen des adaptiven Immunsystems	19
1.3.1.1	Die B-Lymphozyten	19
1.3.1.2	Die T-Lymphozyten	20
1.3.1.3	Regulatorische T-Lymphozyten	24
1.3.1.3.1	CD4 ⁺ regulatorische T-Zellen	25
1.3.1.3.2	CD8 ⁺ regulatorische T-Zellen	27
1.4	Wege der Antigen-Prozessierung	30
1.4.1	Die MHC-Moleküle	30
1.4.2	Der klassische MHC Klasse I Antigenprozessierungsweg	32
1.4.3	Der klassische MHC Klasse II Antigenprozessierungsweg	35
1.4.4	Kreuzpräsentation	37
1.5	Das Hitzeschockprotein Gp96	39
1.5.1	HSP assoziierte Peptide	42
1.5.2	Rezeptoren für Gp96	44
1.6	TANK und TBK1 bei der Aktivierung von NF- κ B	46
1.7	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	50
1.7.1	Aufbau der Darmwand	50
1.7.2	Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	51
1.7.3	Störung des Gleichgewichts des intestinalen Immunsystems bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	54
1.7.4	Intestinale Makrophagen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	56
1.8	Arbeitsziele	58
2	MATERIAL	61
2.1	Herkunft von Chemikalien und Enzymen	61
2.2	Fertigkombinationen von Biochemikalien	63
2.3	Oligonukleotide	64
2.3.1	Oligonukleotide für qualitative PCR	64

2.3.2	Oligonukleotide für Real-time-PCR.....	65
2.3.3	Oligonukleotide für den k.o.-Maus-Vektor	66
2.4	Antikörper	66
2.5	Nährmedien und Antibiotika	69
2.6	Puffer	69
2.7	Organismus und Vektor.....	71
2.8	DNA-Größenstandard	71
3	METHODEN	72
3.1	Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen	72
3.1.1	Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Resektaten	72
3.1.2	Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Biopsaten.....	74
3.1.3	Magnetische Zellsortierung.....	74
3.1.4	Gewinnung und Kultivierung von Monozyten	76
3.1.5	<i>in vitro</i> Generierung von Makrophagen	77
3.1.6	Herstellung von multizellulären Sphäroiden (MZS)	77
3.2	RNA-Isolation.....	78
3.2.1	polyA mRNA-Isolation.....	78
3.2.2	Gesamt RNA-Isolation	79
3.3	Gelelektrophorese	80
3.3.1	DNA-Isolation aus Agarosegel.....	80
3.3.2	Diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	81
3.4	DNA-Klonierungen	81
3.5	Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	82
3.6	RT-PCR.....	82
3.7	Real-Time-PCR (Taqman®)	84
3.7.1	Datenanalyse.....	86
3.8	Sequenzierung und Sequenzvergleich.....	87
3.9	Durchflusszytometrie.....	87
3.10	Quantitative Messung von Protein	90
3.10.1	Proteingehaltsbestimmung	90
3.10.2	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	90
3.10.3	Luminex®	91
3.10.4	Western Blot	91
3.11	Immunhistochemische Färbemethoden.....	92
3.12	CD4⁺ CD62L⁺ Transfer-Kolitis-Modell	94
3.12.1	Stimulation mesenterialer Lymphknotenzellen	96
3.12.2	Stimulation von CD4 ⁺ CD62L ⁺ -Zellen	97

3.13	Generierung einer konditionellen Gp96-knock-out-Maus	97
4	ERGEBNISSE	106
4.1	Aufreinigung intestinaler humaner Makrophagen	106
4.2	Microarray, RT-PCR und <i>real-time-PCR</i> für Gp96	107
4.2.1	Affymetrix GeneChip® Analysen	107
4.2.2	RT-PCR	109
4.2.3	<i>Real-time-PCR</i> mit TaqMan®	109
4.3	Immunhistochemische Analyse der Gp96 Expression in multizellulären Sphäroiden (MZS).....	110
4.4	Gp96-Expression in humaner intestinaler Mukosa	112
4.4.1	Immunhistochemie.....	112
4.4.2	Immunfluoreszenz	114
4.4.3	Immunhistochemie und -fluoreszenz bei Colitis ulcerosa und Divertikulitis.....	116
4.5	Sequenzierung von Gp96 cDNA.....	117
4.6	Gp96-Expression im Transfer-Kolitis-Maus-Modell	118
4.7	Transfer-Kolitis Maus-Modell – Behandlung mit Gp96	119
4.7.1	1. Transfer	122
4.7.1.1	Gewichtsverlauf.....	123
4.7.1.2	Milzgewichte und Darmlängen	124
4.7.1.3	Histologie	124
4.7.1.4	Zytokinsekretion von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten	126
4.7.2	2. Transfer	133
4.7.2.1	Zytokinprofil der CD4 ⁺ CD62L ⁺ Donorzellen	134
4.7.2.2	Gewichtsverlauf.....	139
4.7.2.3	Milzgewichte und Darmlängen	140
4.7.2.4	Histologie	142
4.7.2.5	Zytokinsekretion von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten	144
4.7.3	3. Transfer	151
4.7.3.1	Zytokinprofil der CD4 ⁺ CD62L ⁺ -Donorzellen	152
4.7.3.2	Gewichtsverlauf.....	158
4.7.3.3	Milzgewichte und Darmlängen	160
4.7.3.4	Histologie	162
4.7.3.5	Zytokinsekretion von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten	165
4.8	Generierung einer konditionellen Gp96-Knock-out-Maus.....	173
4.8.1	PCR der einzelnen Fragmente	174
4.9	Die Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen.....	175
4.9.1	Affymetrix GeneChip® Analysen	175

4.9.2	<i>Real-time</i> -PCR mit TaqMan® zum Nachweis von TANK in intestinalen Makrophagen.....	177
4.9.3	Nachweis der TANK-Expression in LPMNZ durch Western Blot.....	179
4.9.4	Immunhistochemische Analyse der TANK-Expression in humaner intestinaler Mukosa	181
5	DISKUSSION	183
5.1	Aufreinigung intestinaler Makrophagen.....	183
5.2	Expression von Gp96 in der intestinalen Mukosa.....	183
5.3	Behandlung von Mäusen mit Gp96 im Transfer-Kolitis Maus-Modell	187
5.3.1	Behandlung der Spendertiere mit Gp96, Gp95/Pep und Gp96/denat.	188
5.3.1.1	Behandlung der Spendertiere: Histologie	190
5.3.1.2	Behandlung der Spendertiere: Zytokinsekretion	191
5.3.2	Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer.....	193
5.3.2.1	Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer: Histologie	194
5.3.2.2	Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer: Zytokinsekretion.....	195
5.3.3	Mögliche Wirkweise von Gp96 bei der Behandlung der Transfer-Kolitis.....	196
5.4	Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen	201
6	ZUSAMMENFASSUNG	203
6.1	Expression von Gp96 in intestinaler Mukosa	203
6.2	Behandlung von Mäusen mit einer durch T-Zell-Transfer induzierten Kolitis	204
6.3	Generierung einer konditionellen knock-out-Maus für Gp96.....	204
6.4	Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen	205
7	AUSBLICK.....	206
7.1	Funktionelle Bedeutung von Gp96 bei der Aufrechterhaltung der Toleranz im Darm	206
7.2	Untersuchung der Funktion von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen	207
	LITERATURVERZEICHNIS	209
	ANHANG.....	225
	DANKSAGUNG	228

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem – ein Überblick

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

Ein wesentlicher Grundstein zur Wissenschaft der Immunologie wurde vermutlich im Jahre 1798 gelegt, als Edward Jenner, ein englischer Arzt, die Pockenimpfung einführte. Er veröffentlichte seine Entdeckung („An inquiry into the causes and effects of the Variolae Vaccinae“), wobei wohl die Grundlage für einen der größten Triumphe der modernen Medizin geschaffen wurde: die im Jahr 1979 von der Weltgesundheitsorganisation bekannt gegebene Ausrottung der Pocken.

Trotz dieses Fortschritts wusste Jenner nichts von dem die Krankheit auslösenden Agens und erst Ende des 19. Jahrhundert war es Robert Koch, der beweisen konnte, dass infektiöse Krankheiten von Mikroorganismen verursacht werden. Heute kennen wir vier Kategorien von krankheitsauslösenden Mikroorganismen oder Pathogenen: Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten.

Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte Louis Pasteur mit abgetöteten *Pasteurella multocida* Bakterien eine Impfung gegen Hühnercholera und so wurde durch die damaligen Diskussionen um den Mechanismus der Impfung eine weitere Grundlage für die Entwicklung der Wissenschaft der Immunologie geschaffen.

Der Begriff „Immunsystem“ stammt von dem lateinischen Wort „immunitas“ und bedeutet eigentlich Schutz vor gesetzlicher Verfolgung, hier ist aber der Schutz des Organismus vor pathogenen Fremdkörpern gemeint.

Das Immunsystem wird in zwei große Teilbereiche gegliedert: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene System ist phylogenetisch älter und bildet eine erste Barriere gegen eindringende Pathogene. Zu diesem System gehören als „mechanische“ Barrieren eine intakte Epidermis mit dem Säureschutzmantel der Haut und eine intakte Darmmukosa, denn im Darm befinden sich natürlicherweise sehr viele potenziell Pathogene Organismen. Molekulare Mechanismen

der angeborenen Immunität sind das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme, sowie Interferone und Interleukine. Zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Monozyten bzw. Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), wobei Letztere auch bei der erworbenen Immunität eine Rolle spielen. Auf beide Teile des Immunsystems wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2 Die angeborene Immunität als älteste Form der Immunabwehr

Das System der angeborenen Immunität wurde zunächst als „unspezifisch“ bezeichnet, weil es so schien, als ob es nicht auf individuelle Pathogene antwortet, sondern unabhängig von der Art des Erregers direkt aktiv wird, ohne mit diesem Erreger vorher schon einmal in Berührung gekommen zu sein. Damit ist eine schnelle Einsatzfähigkeit gewährleistet.

Heute ist bekannt, dass das angeborene Immunsystem nicht so unspezifisch ist, wie anfangs vermutet. Es ist durchaus in der Lage zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ zu unterscheiden. Es erkennt hochkonservierte Schlüsselmoleküle auf der Oberfläche von Pathogenen, so genannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Mannane, sowie Glykane mit Hilfe von invariablen Rezeptoren, den *pattern recognition* Rezeptoren (PRRs)². 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^{3, 4}. Weitere PRRs sind Scavenger-Rezeptoren wie z.B. CD36 und CD91. Sie erkennen bestimmte anionische Polymere und acetylierte *low-density* Lipoproteine^{5, 6}.

Der russische Zoologe Elie Metschnikow (1845 - 1916) erkannte als Erster den im gesamten Tierreich verbreiteten Grundmechanismus der zellulären Infektabwehr. Er „entdeckte“ die zelluläre Immunologie, als er bei einem Spaziergang am Strand von Sizilien eine Seesternlarve aufsammlte, und einen Rosenstachel hinein drückte. Am nächsten Morgen war der Stachel mit kleinen beweglichen Zellen bedeckt, die den Fremdkörper zu verschlingen suchten⁷. Er formulierte die Rolle der mobilen Fresszellen (Phagozyten), die durch Einverleiben und Verdauen (Phagozy-

tieren) von körperfremdem Material den Organismus verteidigen. Metschnikow begründete damit die zelluläre Immunologie.

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 als so genannte Phagosomen in die Zelle einzuschließen. Einen ähnlichen Selbstverteidigungsmechanismus findet man schon bei einfachsten höheren Lebensformen⁷. Bei Einzellern erfolgen Gasaustausch, Verdauung und Selbstverteidigung zumindest teilweise durch Phagozytose, die kaum anders als bei den Makrophagen des menschlichen Körpers verläuft.

Bei Vielzellern finden sich mobile Makrophagen in Leibeshöhlen (Seestern), im Gewebe (Schwamm) oder im Blutkreislauf (Mensch). Auch die ausdifferenzierten Gewebsmakrophagen des Menschen sind noch mobil. Die intestinalen Makrophagen in der Lamina propria oder die Alveolarmakrophagen in der Lunge wandern nach Antigen-Aufnahme zu den regionalen Lymphknoten.

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 70 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 unbekannt ⁸. Ausdifferenzierte, gewebespezifische 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.

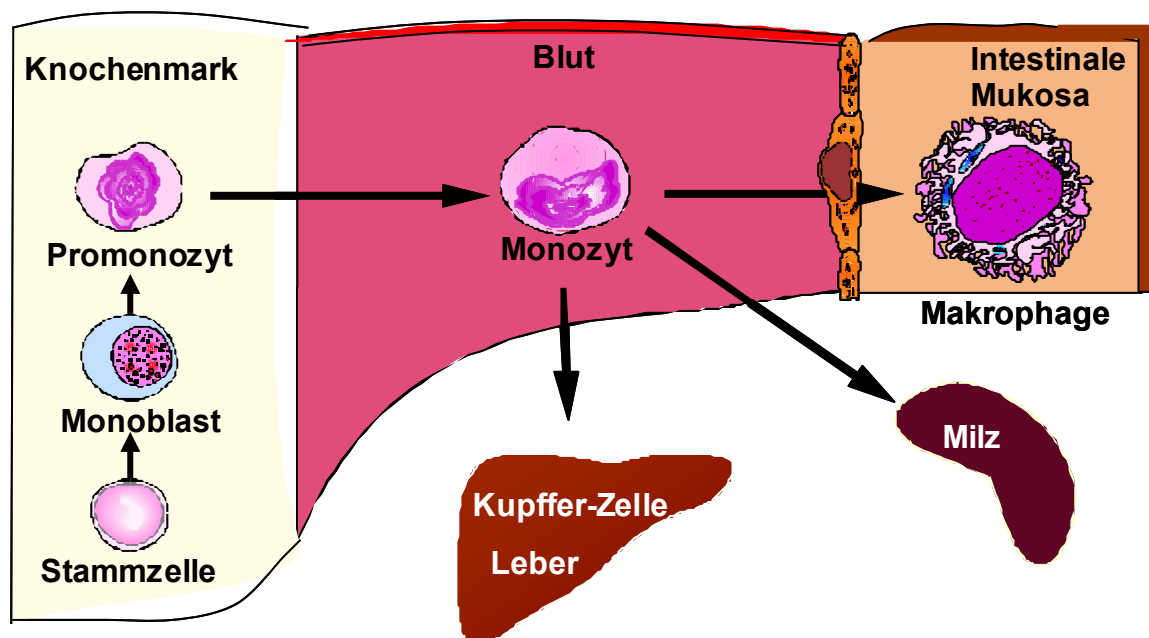


Abb.1.1: Die Entwicklung der Makrophagen: Aus den Stammzellen im Knochenmark (links) entstehen, über die Zwischenstufe des Monoblasten, die Monozyten. Diese gelangen über die Blutbahn (Mitte) in verschiedene Gewebe. Dort reifen die Monozyten, abhängig vom jeweiligen Mikromilieu, zu verschiedenen Makrophagentypen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

1.2.1.2 Funktion 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 Potenzial (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 so genannte 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 erkannt ⁸.

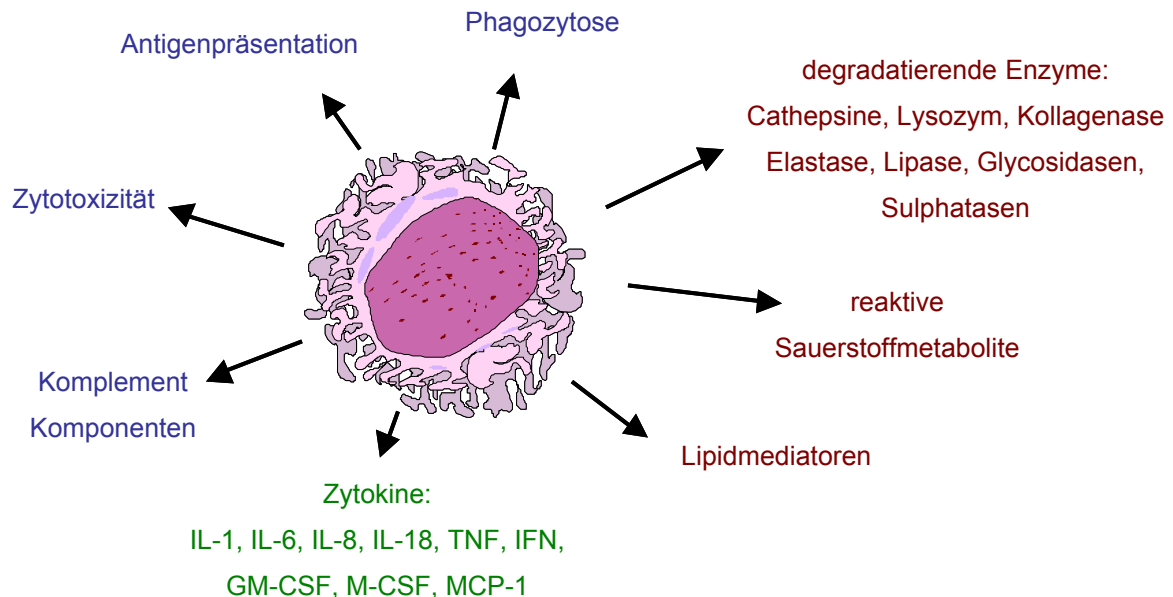


Abb.1.2: Die Funktionen und Mediatoren von Makrophagen: Aufgeführt sind charakteristische Funktionen von Makrophagen (blau), Mediatoren, die von Makrophagen sezerniert werden (grün) und Mediatoren die extra- oder intrazellulär degradierend wirken (rot).

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 so genannten Haupthistokompatibilitätskomplex (*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 ⁸.

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 Tumor Nekrose

Faktor [TNF], das Chemokin MCP-1, das Interleukin-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 ⁸.

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 Antikörper-abhängige Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet ⁹. Ein anderer Mechanismus der Zytotoxizität von Makrophagen ist die Sekretion zytotoxischer Substanzen (z.B. TNF, reaktive Sauerstoffverbindungen), deren Freisetzung zur Lyse der angegriffenen Zellen führt ¹⁰.

1.2.2 Differenzierung intestinaler Makrophagen

Intestinale Makrophagen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose, Keimtötung, Antigenpräsentation und Sekretion von immun- bzw. entzündungsmodulierenden Zytokinen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fremdanitigenen und Keimen des Darmlumens. Insgesamt sind ca. 10-20% der mononukleären Zellen des Darmes Makrophagen (Abb. 1.3). 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 ⁸. 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 Oberflächenantigene ¹¹.

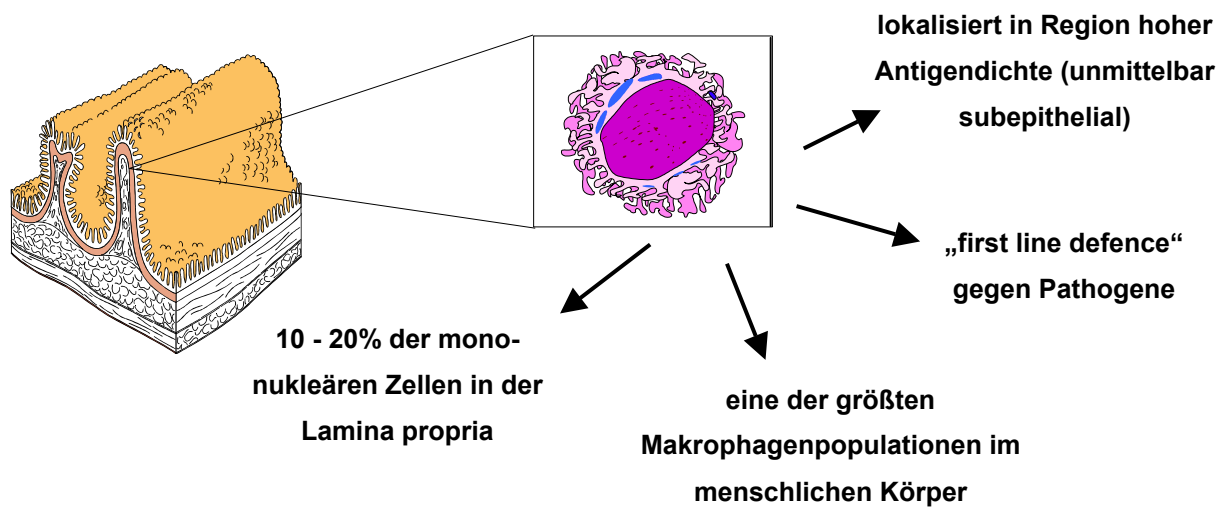


Abb.1.3: Stellung und Funktion der intestinalen Makrophagen im menschlichen Körper: Dargestellt sind einige Schleimhautfalten des Dickdarms (links) und ein Makrophage (vergrößert) aus der Lamina propria.

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 Bedeutung ¹². Zudem ist auf der Zellmembran von Monozyten der Fc γ III-Rezeptor (CD16), der Rezeptor für die Komponente C3b (CD11b) und das zur Induktion einer T-Zellantwort bei der Immunreaktion notwendige T-Zell co-stimulierende Molekül B7.2 (CD86) nachweisbar. *In vitro* differenzierte Makrophagen exprimieren wie Monozyten den LPS-Rezeptor, zeigen aber eine stärkere Expression von CD16 ¹³.

Im Gegensatz dazu lassen sich intestinale Makrophagen deutlich von Monozyten und *in vitro* differenzierten Makrophagen unterscheiden. Intestinale Makrophagen exprimieren weder den LPS-Rezeptor ¹⁴ noch den Fc γ III-Rezeptor ¹⁵. CD11b ist auf weniger als 5% der Makrophagen aus intestinalem Gewebe nachweisbar ¹⁶. 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 spielen ¹⁷. Auch Effektormoleküle, wie Cathepsin D und die NADPH Oxidase werden von intestinalen Makrophagen nicht exprimiert ^{18, 19}. 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 konnte²⁰. 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-Zell-Antwort induzieren können.

Bisher sind eine Reihe von Proteinen mit charakteristischen Makrophagenfunktionen bekannt, die auf und in intestinalen Makrophagen nicht oder nur schwach exprimiert werden. Die Expression bislang unbekannter Proteine in intestinalen Makrophagen könnte mit einer spezifischen Funktion verbunden sein. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, Proteine, die spezifisch auf oder in intestinalen Makrophagen exprimiert werden, auf ihre Funktion hin zu untersuchen.

1.3 Das adaptive Immunsystem

Die Trennung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem ist nicht immer klar zu ziehen, da das angeborene System auch an der Initiation und Steuerung des adaptiven Immunsystems beteiligt ist.

Das adaptive Immunsystem ist erstmals bei Wirbeltieren zu finden und zeichnet sich durch Antigenspezifität, einer Vielzahl an Rezeptoren, einem „Gedächtnis“ und einer Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“ aus. Die Zellen dieses Systems heißen T- und B-Lymphozyten und zeichnen sich durch jeweils antigenspezifische Rezeptoren aus, wobei jede einzelne Zelle wiederum eine andere Spezifität aufweist. Mit Hilfe dieser Rezeptoren werden molekulare Strukturen, die Antigene, erkannt. Nach Erkennung eines Antigens, kommt es zur klonalen Proliferation, die 3-5 Tage andauert. Es entstehen Effektor- und Gedächtniszellen, wobei Letztere für das immunologische Gedächtnis verantwortlich sind. Das adaptive Immunsystem kann auf diese Weise auch effizient gegen Pathogene vorgehen, die durch die angeborene Immunität nicht eliminiert werden konnten. Bei Neugeborenen ist die adaptive Immunabwehr noch nicht ausgebildet. Daher werden sie durch die über die Muttermilch

übertragenen Antikörper vor Infektionen geschützt bis das eigene Immunsystem diese Aufgabe übernehmen kann.

1.3.1 Zellen des adaptiven Immunsystems

Karl Landsteiner und Merrill Chase zeigten erstmals 1942 eine Beteiligung von Lymphozyten bei der Immunabwehr. Erst 1962 wurde aber von Frank Macfarlane Burnet gezeigt, dass es sich dabei um zwei verschiedene Zelltypen handelt, die später B- (für Bursa-Fabricsii) und T- (für Thymus) Zellen genannt wurden.

Das adaptive System gliedert sich in eine humorale (humor, lat.: Flüssigkeit) und eine zelluläre Komponente. Der humorale Zweig wird so genannt, weil die Antikörper in die Blutbahn und andere Körperflüssigkeiten sezerniert werden und dort dann in löslicher Form vorliegen. Die Zellen der humoralen Komponente heißen B-Zellen, die der zellulären Komponente T-Zellen.

Im Folgenden werden beide Zelltypen kurz beschrieben, wobei sich das Augenmerk mehr auf die T-Zellen richtet.

1.3.1.1 Die B-Lymphozyten

Aufgabe der aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten ist es, Antikörper zu produzieren. Auslöser dieses Prozesses ist die spezifische Bindung von Antigenen an die membranständigen Immunglobuline. Dieser Komplex wird in die Zelle aufgenommen (internalisiert). Im Inneren der Zelle erfolgt der Abbau der endozytierten Proteine in kleine Peptidfragmente, die auf MHC Klasse II-Moleküle (MHC = *major histocompatibility complex*) geladen werden. Der Komplex wird an die Zelloberfläche transportiert, so dass die Peptide T-Helfer-Zellen präsentiert werden können. Die T-Zellen aktivieren daraufhin die B-Zelle, welche dann in eine antikörperproduzierende Plasmazelle differenziert. Dieser Prozess wird auch „Priming“ genannt. Für das Priming der B-Zelle sind drei Signale notwendig: erstens ein Antigen, welches spezifisch an den B-Zell-Rezeptor bindet und diesen kreuzvernetzt, zweitens eine T-Helfer-Zelle, die das Peptidfragment spezifisch auf MHC II-Molekülen der B-Zelle erkennt und drittens die Bindung des CD40-Liganden (CD40L) der T-Helfer-Zelle an

das membranständige CD40 der B-Zelle, was zu einer Stimulation der T-Zelle und damit verbunden zu einer erhöhten Interleukin-4 (IL-4) Produktion führt. IL-4 bewirkt daraufhin die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle. Diese Interaktion zwischen B- und T-Zellen konnte zum ersten Mal in der 1960er Jahren von Anthony Davies, Henry Claman, Graham Mitchell und Jacques Miller gezeigt werden. Die Plasmazelle sezerniert nun lösliche Immunglobuline, bzw. Antikörper, welche die Aufgabe haben, den Fremdkörper zu neutralisieren und zu opsonieren. Opsonierung bedeutet, dass die Antikörper das Pathogen für die Phagozytose durch Makrophagen markieren, indem die Makrophagen die konstante Region der Antikörper mit Hilfe spezifischer Rezeptoren erkennen. Weiterhin wird durch die Antikörper das Komplementsystem aktiviert, wodurch ebenfalls eine Opsonierung aber auch die Lyse des Pathogens ermöglicht wird.

Die Existenz von Antikörpern wurde erstmals 1890 von Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato postuliert. Sie spritzten Serum von Tieren, die gegen eine Infektion mit *Corynebacteriae diphtheriae* (Diphtherie) resistent waren, in normale Tiere und stellten fest, dass auch diese vakzierten Tiere resistent wurden. Sie schlossen daher, dass das Serum der resistenten Tiere Antitoxine enthalten musste, die spezifisch die bakteriellen Toxine neutralisieren konnten. Karl Landsteiner prägte 1900 das Wort „Antikörper“ für diese Antitoxine und die Substanzen, die von Antikörpern erkannt wurden, wurden als Antigene bezeichnet.

1926 gelang Felton und Bailey das erste Mal die Isolation von Antikörpern. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um Proteine handelt.

Jeder B-Lymphozyt exprimiert einen spezifischen membrangebundenen Antikörpertyp und kann nach Aktivierung und Differenzierung als Plasmazelle auch nur einen spezifischen Antikörper sezernieren. Die Diversität der Antikörper beruht dabei auf der somatischen Rekombination der Immunglobulin-Gene. Erste Hinweise dafür lieferte 1975 Susumu Tonegawa – er bekam für diese Erkenntnis 1987 den Nobelpreis ²¹.

1.3.1.2 Die T-Lymphozyten

T-Lymphozyten stammen, wie die B-Zellen, aus dem Knochenmark, sie wandern aber als unreife Zellen in den Thymus um sich dort zu reifen T-Zellen weiter zu ent-

wickeln. Auf diesen Entwicklungsprozess wird weiter unten in diesem Abschnitt näher eingegangen.

Es werden zwei Arten von T-Zellen unterschieden, die $\alpha:\beta$ - (Abb. 1.4) und die $\gamma:\delta$ -T-Zellen, die sich in ihrem heterodimeren membranständigen T-Zell-Rezeptor unterscheiden. Beide T-Zell-Typen entwickeln sich dabei aus einem gemeinsamen Vorläufer.

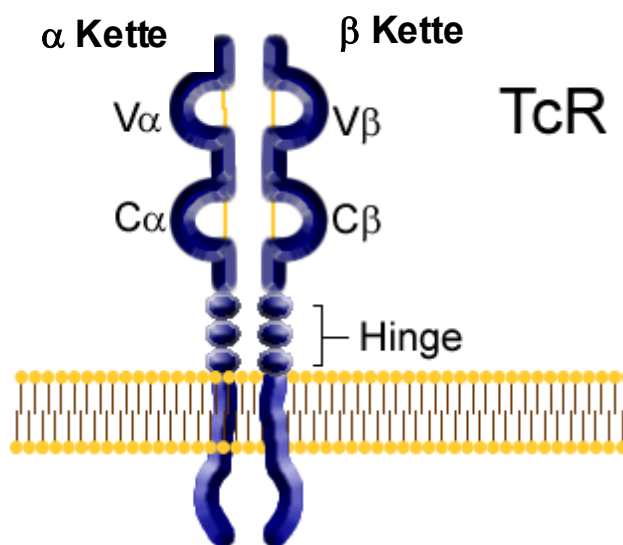


Abb. 1.4: Aufbau des $\alpha:\beta$ T-Zellrezeptors. Der Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, die beide einen zytoplasmatischen Anteil besitzen.

Von den $\gamma:\delta$ -T-Zellen weiß man bis heute sehr wenig. Man findet sie in lymphoiden und intraepithelialen Geweben und sie erkennen Liganden wie Hitzeschockproteine (HSPs), fehlerhafte MHC-Moleküle, Nucleotide und Phospholipide ²².

Die Anforderung an $\alpha:\beta$ -T-Zellen ist dagegen, dass sie körpereigene MHC-Moleküle über ihren T-Zell-Rezeptor erkennen können (Selbst-MHC-Restriktion) und dabei tolerant gegenüber MHC-gebundenen körpereigenen Peptiden sein müssen (Selbsttoleranz). Dafür durchlaufen die T-Zellen eine Selektion im Thymus, welche bei der Maus in etwa drei Wochen dauert. Dabei verlassen nur ca. 2-4% der Zellen den Thymus als reife T-Zellen.

Während der Entwicklung der $\alpha:\beta$ -T-Zellen findet im Kortex des Thymus die positive Selektion auf körpereigene MHC-Moleküle statt (Abb. 1.5). Nur wenn die T-Zellen körpereigene MHC-Moleküle erkennen, wandern sie weiter in die Medulla, wo es zur negativen Selektion kommt. Erkennen die Zellen körpereigene Peptide, werden sie durch Apoptose (programmierter Zelltod) eliminiert. Wenn nicht, verlassen sie als reife, naive $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen den Thymus. So befinden sich ca. 25 - 100 Millionen naive T-Zellklone unterschiedlicher Spezifität im menschlichen Organismus²³, wobei der Vielfalt der T-Zellen, ähnlich wie bei Antikörpern der B-Zellen, eine somatische Rekombination zugrunde liegt.

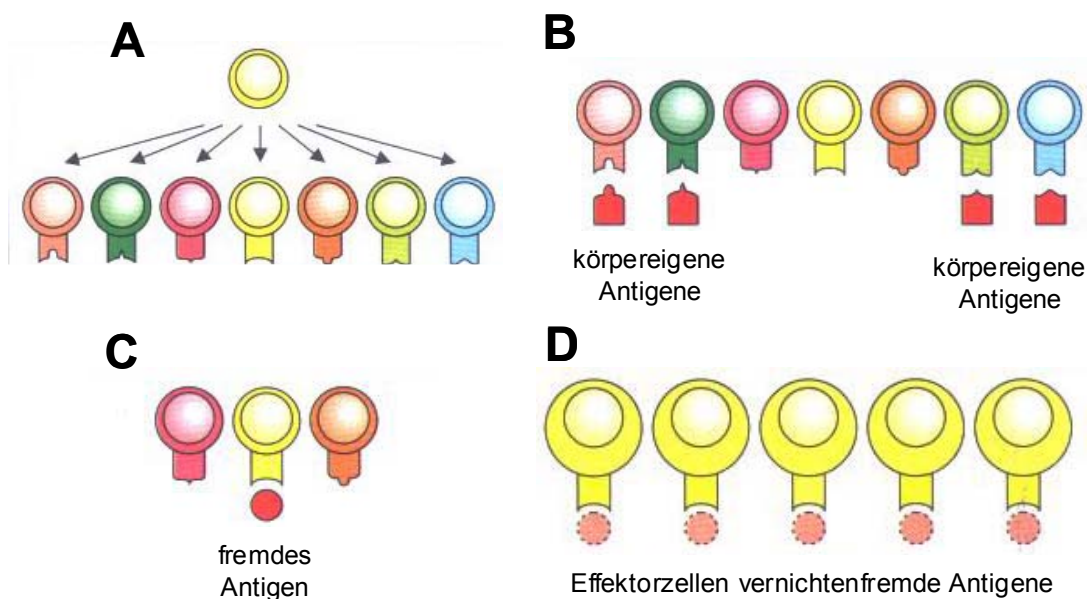


Abb.1.5: Klonale Selektion von T-Zellen: aus einer Vorläuferzelle entstehen zahlreiche Lymphozyten, die jeweils eine andere Spezifität besitzen (A). Durch klonale Selektion werden potenziell selbstreaktive Lymphozyten entfernt (B) und es entsteht die Gesamtpopulation reifer, naiver Lymphozyten (C). Nach Aktivierung der Lymphozyten durch das spezifische Antigen entstehen durch klonale Proliferation viele antigenspezifische T-Zellen⁸.

$\alpha:\beta$ -T-Zellen unterteilen sich in $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen. Zu den $CD4^+$ Zellen gehören T_H1 und T_H2 Zellen. Zu welchem Subtyp sich die $CD4^+$ -T-Zelle entwickelt, hängt vor allem von dem sie umgebenden Zytokinmilieu zum Zeitpunkt der Antigen-erkennung ab. Dabei bewirken $IFN-\gamma$ und IL-12 vor allem eine Entwicklung zur T_H1 -Zelle und IL-4 bewirkt eine T_H2 -Antwort. T_H1 - und T_H2 -Zellen unterscheiden sich in

ihrem Zytokinprofil, wobei T_H1 -Zellen vor allem $IFN-\gamma$ produzieren und über CD40L und weitere Zytokine Makrophagen aktivieren (zelluläre Immunität). T_H2 -Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IL-4 und IL-5 aus wobei sie die humorale Immunität aktivieren⁸.

CD8⁺-T-Zellen sind als zytotoxische T-Zellen für die Elimination virusinfizierter Zellen und entarteter Zellen verantwortlich. Dies erfolgt durch Perforine, die Löcher in der Zellmembran der Zielzelle hervorrufen und durch Granzyme, die als Proteasen Proteine in der Zielzelle abbauen und Apoptose induzieren. Durch die Interaktion Fas Ligand (CD95L) und Fas (CD95) wird ebenfalls Apoptose induziert.

$\alpha:\beta$ -T-Zellen zirkulieren im Blut und den peripheren lymphatischen Organen. Wenn sie in den Lymphknoten mit ihrem T-Zell-Rezeptor ein spezifisches Antigen auf einem MHC-Molekül erkennen, das dort von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) präsentiert wird, kommt es, wenn ein kostimulatorisches Signal vorhanden ist, zur Aktivierung der T-Zelle (Priming). CD8⁺-T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen dabei im Kontext des MHC Klasse I-, CD4⁺-T-Zellen im Kontext des MHC Klasse II-Moleküls. Diese MHC-Restriktion wurde erstmals 1974 von Peter Doherty und Rolf Zinkernagel gezeigt²⁴. Sie erhielten dafür 1996 den Nobelpreis.

Für das Priming der T-Zelle sind zwei Signale erforderlich: zum einen die spezifische Antigenerkennung auf dem entsprechenden MHC-Molekül, zum anderen ein kostimulatorisches Signal, welches nur von einer APC gegeben werden kann. Die Kostimulation erfolgt über die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle mit den B7-Molekülen (B7.1 = CD80 und B7.2 = CD86) auf der APC. Des Weiteren werden bei beiden Zellen Signalmoleküle, wie CD40L (T-Zelle) und CD40 (APC), hochreguliert. Dies führt zu einem weiteren Anstieg der B7- und MHC-Moleküle. Die Interaktion von CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen mit B7-Molekülen auf APCs führt zu einer Inhibition der T-Zelle, was eine Kontrolle der T-Zell-Antwort ermöglicht²⁵.

T-Zellen, die auf diese Weise geprimt wurden, treten in den Zellzyklus ein und proliferieren über mehrere Tage, wobei sie IL-2 produzieren. IL-2 induziert die Bildung des IL-2 Rezeptors und die Zelle durchläuft aufgrund der Interaktion von IL-2 mit dem Rezeptor den Zellzyklus.

Die Entwicklung zur Effektorzelle dauert in etwa vier bis fünf Tage. Für die Differenzierung von naiven CD8⁺-Zellen in zytotoxische T-Zellen ist zusätzlich eine indirekte Stimulation durch T_H1 -Zellen notwendig. Nur wenn diese gleichzeitig durch eine

CD40L/CD40 Interaktion an die APC binden, können die CD8⁺-T-Zellen geprimt werden²⁶.

Wenn eine T-Zelle einmal geprimt wurde, ist keine weitere Kostimulation mehr nötig. Jedes Zusammentreffen mit einem auf MHC gebundenen Antigen führt zu einer Immunantwort.

Die Antigenerkennung einer naiven T-Zelle ohne Kostimulation führt dagegen zur T-Zell-Toleranz - 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.

1.3.1.3 Regulatorische T-Lymphozyten

Gerade im Darm in dessen Lumen sehr viele körperfremde Stoffe vorhanden sind, ist es wichtig, dass keine unkontrollierten Immunantworten ausgelöst werden. Hierzu dient eine besondere Eigenschaft des Immunsystems: die Vermittlung von Toleranz gegenüber nicht pathogenen Antigenen. Bei einem gesunden Menschen wird, nachdem ein Pathogen aus der intestinalen Mukosa eliminiert wurde, die Immunantwort wieder herunter reguliert. Die Kontrolle dieses Mechanismus wird durch verschiedene Zellen und über verschiedene Wege erreicht. Ein Fehler in der Kontrolle dieser Mechanismen führt zur Störung der Toleranz und stellt einen Teil der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) dar²⁷. Für die Unterscheidung von harmlosen und pathogenen Antigenen ist das *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT) verantwortlich. Es vermittelt Toleranz gegenüber der eigenen intestinalen Flora^{27, 28, 29}, und Nahrungsbestandteilen. Letzteres wird als orale Toleranz bezeichnet³⁰.

Die Mechanismen, durch die diese Toleranz erreicht wird, sind sehr vielfältig, wobei sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem involviert sind. Es zählen hierzu Antigen-Elimination, veränderte Antigenpräsentation, Produktion regulatorischer Zytokine, Apoptose aktivierter Immunzellen und die aktive Suppression einer Immunantwort. Letztere wird durch verschiedene Gruppen „regulatorischer T-Zellen“ erreicht. Eine Reihe von Experimenten konnte zeigen, dass die veränderte

Regulation intestinaler T-Zell-Funktionen in chronischen Entzündungen des Darmes resultieren kann^{31, 32, 33, 34}.

Bisher wurden verschiedene Populationen von regulatorischen T-Zellen beschrieben, darunter sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen. Die meisten dieser Zellen werden durch ihren Phänotyp und die Sekretion regulatorischer Zytokine wie IL-10 und *transforming growth factor* (TGF)- β charakterisiert. Im Folgenden werden einige der bisher bekannten regulatorischen T-Zell-Typen näher beschrieben. Am Ende des Kapitels über regulatorische T-Zellen ist eine Schemazeichnung zur Funktion dieser verschiedenen Zellen zu finden (Abb. 1.6)

1.3.1.3.1 CD4⁺ regulatorische T-Zellen

Innerhalb der CD4⁺ regulatorischen T-Zell-Population gibt es verschiedene Untergruppen. Eine dieser Gruppen wurde bei Experimenten mit dem Modell der durch den Transfer von CD4⁺ CD45RB^{high} T-Zellen ausgelösten Kolitis bei Scid-Mäusen entdeckt³⁵. Einige Wochen nach dem Transfer dieser Zellen entwickeln die Tiere eine Kolitis, wobei ein Ko-Transfer von **CD4⁺ CD45RB^{low}** T-Zellen die Entstehung der Kolitis verhindert^{36, 37, 38}. Daraus schloss man, dass in dieser Gruppe von Zellen regulatorische T-Zellen enthalten sind. Der regulierende Mechanismus wird dabei über IL-10 und TGF- β vermittelt.

Eine weitere Gruppe regulatorischer T-Zellen ist durch die Fähigkeit charakterisiert hohe IL-10-Level zu sekretieren. Diese Zellen, **Tr1** genannt, können *in vitro* nach wiederholter Stimulation mit Antigen, unter Zugabe von IL-10, generiert werden. Diese Zellen wurden sowohl bei der Maus, als auch beim Menschen in der intestinalen Mukosa gefunden^{38, 39, 40}. Das Fehlen dieses Zelltyps ist wahrscheinlich mit verantwortlich für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis⁴¹. Kürzlich wurde vermutet, dass Tr1-Zellen mit Spezifität für bakterielle Antigene im Darm vorkommen, da bei Ko-Kultur von CD4⁺-T-Zellen mit APCs, die mit luminalen bakteriellen Antigenen gepulst wurden, Tr1-Zellen generiert werden konnten, wenn IL-10 zugegen war⁴². Die Entstehung von Tr1-Zellen kann bei Infektionen induziert werden, was für die Herabregulation einer Entzündung wichtig ist, wenn das Pathogen eliminiert wurde. Dies geschieht z.B. bei einer intestinalen Infektion mit *Helicobacter hepaticus*, so dass die intestinale Homöostase durch die Produktion von

IL-10 aufrecht erhalten wird⁴³. Bei IL-10 defizienten Mäusen fehlen Tr1-Zellen. Diese Tiere entwickeln spontan eine Kolitis, so dass vermutet wird, dass Tr1-Zellen gerade im Darm eine wichtige Funktion in der Regulation der Immunantwort gegenüber der luminalen Flora ausüben. So konnten Groux und Mitarbeiter als erste zeigen, dass Tr1-Zellen den Ausbruch einer Kolitis im Transfer-Modell der Kolitis bei Mäusen verhindern können³⁹. Bisher gibt es keine Daten über das immunsuppressive Potenzial von Tr1-Zellen beim Menschen. Auch die Behandlung von CED-Patienten mit rekombinantem IL-10 war eher enttäuschend, obwohl im Mausmodell damit sehr gute Erfolge erzielt wurden⁴⁴.

Eine weitere Gruppe regulatorischer CD4⁺-T-Zellen sind die **CD4⁺ Th3**-Zellen. Sie wurden 2001 von Weiner und Mitarbeitern im Zusammenhang mit oraler Toleranz identifiziert⁴⁵. Dieser Zelltyp übt seine regulatorische Funktion über die Sekretion von TGF- β aus, welches die Aktivierung der T_H1- und der T_H2-Antwort unterdrückt und B-Zellen anregt einen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM nach IgA zu vollziehen. CD4⁺ Th3-Zellen wurden sowohl in der intestinalen Mukosa von Mäusen, als auch in der von Menschen gefunden, wobei der Mechanismus, der die Entstehung dieser Zellen fördert, bislang nicht geklärt ist⁴⁵. Bei der 2,4,6-Trinitrobenzen Sulfon-Säure induzierten Kolitis bei Mäusen wurden TGF- β -produzierende CD4⁺ Th3-Zellen gefunden. TGF- β reguliert die Entstehung dieser Art der Kolitis, so dass vermutete wurde, dass diese Zellen eine protektive Rolle bei der Entstehung unkontrollierter intestinaler Entzündungen spielen. Bisher gibt es aber keine Daten zur Rolle von CD4⁺ Th3-Zellen bei CED im Menschen.

Die bisher wohl bekannteste Art der regulatorischen CD4⁺-T-Zellen sind wohl die **CD4⁺ CD25⁺ T reg**. CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors und wird von diesem Zelltyp konstitutiv exprimiert. Diese Art der regulatorischen T-Zellen wird in der Maus und beim Menschen in peripherem Blut gefunden^{46, 47}. Dieser Zelltyp ist für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber selbst-Antigenen verantwortlich. Beim Fehlen dieser Zellen kommt es bei der Maus zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Gastritis und Thyroiditis, die verhindert werden können, wenn den Tieren CD4⁺ CD25⁺ Zellen appliziert werden⁴⁸. Da diese Zellen durch die orale Gabe von Antigenen aktiviert werden können, wird vermutet, dass sie auch bei der oralen Toleranz eine Rolle spielen. Die Wirkung der CD4⁺ CD25⁺ T reg wird vermutlich über IL-10 und TGF- β vermittelt⁴⁹. CD4⁺ CD25⁺ T reg können im Scid-Transfer-Kolitis-Modell

die Entstehung einer Kolitis verhindern, so dass sie wahrscheinlich auch bei der Vermittlung von Toleranz gegenüber der mikrobiellen Flora des Darms involviert sind⁵⁰. $CD4^+ CD25^+$ T reg werden zum einen im Thymus gebildet und dann als „natürliche“ $CD4^+ CD25^+$ T reg bezeichnet. Sie entstehen dort wahrscheinlich durch Selektion nach Erkennung von körpereigenen Antigenen⁵¹. Sie können aber auch in der Peripherie generiert werden, nachdem sie das für sie spezifische Antigen erkannt haben. Bisher wurde der Transkriptionsfaktor FoxP3 als relativ spezifischer Marker für diese Art der regulatorischen T-Zellen beschrieben^{52, 53, 54}.

1.3.1.3.2 $CD8^+$ regulatorische T-Zellen

Auch innerhalb der $CD8^+$ -T-Zell-Population gibt es regulatorische Zellen. Frisch aus der Lamina propria eines Patienten ohne CED isolierte $CD8^+$ -T-Zellen üben Suppressor-Funktionen aus, wohingegen dieser Zelltyp, isoliert aus Patienten mit CED dies nicht tut, so dass vermutet werden kann, dass bei CED eine Fehlfunktion in der Aktivierung von $CD8^+$ regulatorischen T-Zellen vorliegt⁵⁵. $CD8^+$ regulatorische T-Zellen inhibieren die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen. Ihnen fehlt CD28, der Ligand für die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf APCs^{56, 57, 58}. Damit **$CD8^+ CD28^-$** T-Zellen ihren suppressiven Effekt ausüben können benötigen sie Zell-Zell-Kontakte, wobei dieser Kontakt u.a. die CD40-abhängige Induktion von kostimulatorischen Molekülen (CD80 und CD86) auf Dendritischen Zellen unterdrückt⁵⁹. Diese Veränderung der Dendritischen Zellen führt dazu, dass $CD4^+$ T_H -Zellen nicht proliferieren, sondern anerg werden^{60, 61}. Ob $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen in der intestinalen Mukosa vorkommen, konnte bisher noch nicht zufriedenstellend geklärt werden.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass $CD8^+$ regulatorischen Zellen bei der Induktion oraler Toleranz involviert sind^{62, 63, 64}. In diesem Zusammenhang wurden sie erstmals in einem Ratten-EAE-Modell beschrieben, wobei sie TGF- β sezernierten^{62, 65}. Aber auch bei der Maus wurden $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen beschrieben, die vor der Entwicklung einer EAE schützten, wobei die Zellen hier, wie oben beschrieben, durch Zell-Zell-Interaktion wirkten und die Hochregulation von CD80, CD86 und CD40 auf APCs unterdrückten, so dass die Expansion von spezifischen $CD4^+$ - T_H1 Zellen verhindert wurde⁶⁶.

Weitere Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass intraepitheliale Lymphozyten (IEL) in der Prävention von spontanen intestinalen Entzündungen eine Rolle spielen könnten. Die regulatorischen Zellen innerhalb der IEL exprimieren den CD8 $\alpha\alpha$ -Ko-Rezeptor. Dass diese Zellen regulatorische Funktionen bei der intestinalen Entzündung ausüben, wurde durch Experimente mit dem Scid-Transfer-Kolitis-Modell untersucht. Wenn die Scid-Tiere vor dem Transfer von CD4⁺ CD45RB^{high}-Zellen intraepitheliale TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ β ⁻-T-Zellen erhalten hatten, waren sie vor der Entstehung einer Kolitis geschützt. Dieser Prozess war IL-10-abhängig ⁶⁷. CD8 $\alpha\alpha$ ⁺-Zellen repräsentieren in der murinen Mukosa eine einzigartige Zellpopulation, und viele dieser Zellen exprimieren einen hochaffinen, selbst-spezifischen TCR ⁶⁸.

Eine weitere CD8⁺ regulatorische T-Zell-Population stellen die so genannten **CD8⁺ TrE** Zellen dar. Auch diese Zellen sind CD28⁻, aber sie exprimieren zudem CD101 und CD103. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass diese Zellen regulatorische Eigenschaften besitzen und dass sie mit einem Komplex aus gp180 und CD1d interagieren, wobei der regulatorische Mechanismus noch nicht genau geklärt werden konnte ⁵⁵. CD8⁺ TrE Zellen könnten eine Rolle in der Kontrolle von intestinaler Immunität gegenüber luminalen Antigenen spielen, da eine defekte Expression des gp180/CD1d Komplexes bei CED gezeigt wurde ⁶⁹.

Natürliche regulatorische T-Zelle

Induzierbare regulatorische T-Zellen

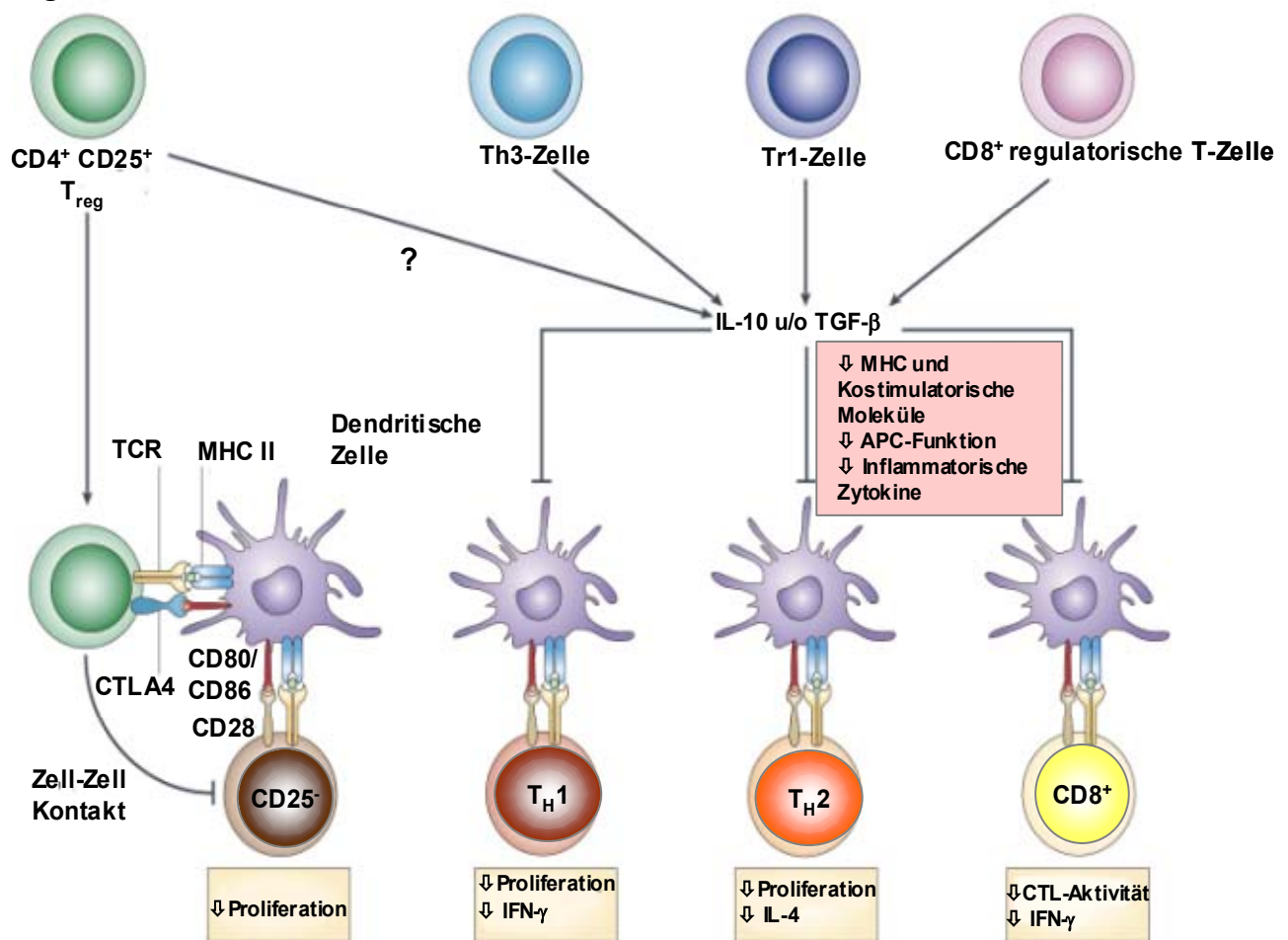


Abb. 1.6 Mechanismus der Suppression von regulatorischen T-Zellen. CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} inhibieren über Zell-Zell-Kontakte die Proliferation von CD25⁻ T-Zellen. Über den Kontakt von CTLA4 mit CD80/CD86 wird die Aktivierung von T-Zellen unterdrückt. Möglicherweise üben die CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} auch über IL-10 und/oder TGF-β einen Suppressor-Effekt aus. Die induzierbaren Th3, Tr1 und CD8⁺ regulatorischen T-Zellen produzieren IL-10 und TGF-β, wodurch die Proliferation und Zytokinsekretion von Effektor-T-Zellen, wie T_{H1}-, T_{H2}- und zytotoxischen T-Zellen inhibiert wird - dies geschieht entweder direkt durch die regulatorischen T-Zellen, oder durch APCs, die durch die regulatorischen T-Zellen inaktiviert wurden. TCR: T-Zell-Rezeptor⁷⁰.

1.4 Wege der Antigen-Prozessierung

1.4.1 Die MHC-Moleküle

1936 wurden die MHC-Moleküle der Maus von Peter Gorer entdeckt, der sich v.a. für Gene interessierte, die das Tumorstadium kontrollieren. George Snell nannte sie H2- (*Histocompatibility-2*) Moleküle. Der Begriff MHC für *Major Histocompatibility Complex* entstand erst viel später. Die MHC-Moleküle des Menschen wurden erstmals 1958 von Jean Dausset und 1962 von Jon van Rood und Rose Payne beschrieben, wobei Letztere ihnen den Namen HLA (*Human Leukocyte Antigen*) gab.

MHC-Moleküle besitzen ein gebundenes Peptid als integralen Bestandteil ihrer Struktur. So wird verhindert, dass leere MHC-Moleküle auf die Zelloberfläche gelangen können und dort extrazelluläre Peptide binden ⁷¹.

Die ca. 200 Gene des HLA-Komplexes befinden sich auf Chromosom 6. Dabei zeichnen sie sich durch einen hohen Polymorphismus aus, so dass für jedes Gen multiple Allele existieren. Es wurden teilweise über 100 Allele pro Locus im Menschen und in der Maus gefunden, jedes Individuum hat aber nur bis zu 6 verschiedene Klasse I und 12 verschiedene Klasse II Allele ^{72, 73}. Dieser Polymorphismus trägt dazu bei, dass in einer großen Population höchstwahrscheinlich immer einige Individuen ein passendes MHC-Molekül tragen, um eine Immunantwort gegen neu aufgetretene Pathogene initiieren zu können. Zudem wird es Pathogenen erschwert, durch Mutation ihrer Struktur gene einer Präsentation über MHC-Moleküle zu entgehen. Zusätzlich zu den Genen der MHC-Moleküle liegen in diesem Bereich auch Gene anderer immunologisch bedeutsamer Proteine wie TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*), MICA und MICB (*MHC-class I chain genes A und B*) sowie auch einiger Hitzeschockproteine ^{74, 75}.

Hauptaufgabe der MHC-Moleküle ist die Antigen-Präsentation, d.h. das Präsentieren von Antigenen in Form von Peptiden, die an membranständige MHC-Moleküle gebunden sind, an T-Zellen. Um die Antigene präsentieren zu können, ist zunächst eine Antigen-Prozessierung notwendig. Dabei werden Proteine in Peptide zerlegt, um an MHC-Moleküle gebunden zu werden. Die gebundenen Peptide werden dann T-Zellen präsentiert und T-Zell-Epitop genannt, wenn ein an ein MHC-Molekül gebundenes Peptid von T-Zellen erkannt wird. Eine Antigenprozessierung

findet in allen Zellen, die MHC-Moleküle besitzen, statt, aber eine Immunantwort wird normalerweise nur durch APCs wie B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) ausgelöst.

Aufgrund von Struktur und Peptidbindungseigenschaften wird zwischen den Molekülen der Klasse I und denen der Klasse II unterschieden. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren v.a. Antigene, die in der Zelle selbst entstanden sind, wie virale oder tumorspezifische Proteine, an $CD8^+$ -T-Zellen, während MHC Klasse II-Moleküle hauptsächlich Antigene präsentieren, die von einer APC aus dem Extrazellulärraum in die Endosomen aufgenommen wurden (z.B. bakterielle Proteine, Proteine von Pilzen) und $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert werden.

Das MHC Klasse I-Molekül ist ein Heterodimer aus zwei Polypeptidketten. Die schwere, oder auch α -Kette, ist ein membrangebundenes Glykoprotein und besteht aus den drei Domänen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$. Sie ist im MHC-Locus codiert. Die kleinere Kette, ein $\beta 2$ -Mikroglobulin, wird nichtkovalent angelagert und hat keine Transmembrandomäne (Abb. 1.7). Sie ist nicht im MHC-Locus codiert. Die $\alpha 3$ -Domäne und das $\beta 2$ -Mikroglobulin haben eine gefaltete Struktur, die stark einer Immunglobulindomäne ähnelt. Die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bilden zusammen eine Tasche an der Oberfläche des Moleküls, in dem kurze Peptide von 8 - 10 Aminosäuren binden. Diese Peptide lagern sich über relativ invariante Verankerungsreste an die MHC-Moleküle an. Man kann somit für jedes MHC-Molekül ein allelspezifisches Bindungsmotiv finden. Die meisten MHC Klasse I-Liganden haben einen Verankerungsrest am Carboxylende des Peptids^{76, 77, 78}.

Alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC Klasse I-Moleküle und binden im klassischen Modell der Antigen-Präsentation bevorzugt Peptide endogener Proteine.⁷⁹

Die MHC Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei Transmembran-Glycoproteinketten (α und β). Jede Kette besteht dabei aus zwei Domänen, wobei die Domänen $\alpha 1$ und $\beta 1$ den peptidbindenden Spalt bilden (Abb. 1.7). Dieser Spalt ist hier weiter geöffnet als bei den MHC Klasse I-Molekülen und die bindenden Peptide sind meist 13 - 17 Aminosäuren lang, wobei sie durchaus auch länger sein können. Die Peptide besitzen, wie die MHC Klasse I-Peptide, ebenfalls einen so genannten Bindungsanker. Genauso wie MHC Klasse I-Moleküle sind auch MHC Klasse II-Moleküle ohne gebundenes Peptid instabil.^{80, 81, 78, 82}

Es gibt vier potenzielle MHC Klasse II-Loci, nämlich HLA-DR, -DP, -DQ und -DM. MHC Klasse II-Moleküle werden ausschließlich auf APCs, B-Zellen, aktivierten T-Zellen und Epithelzellen des Thymus exprimiert, sie können aber auch bei einigen anderen Zellen durch IFN- γ induziert werden⁸³. Im klassischen Modell der Antigen-Präsentation binden sie v.a. Peptide exogener Proteine⁸⁴.

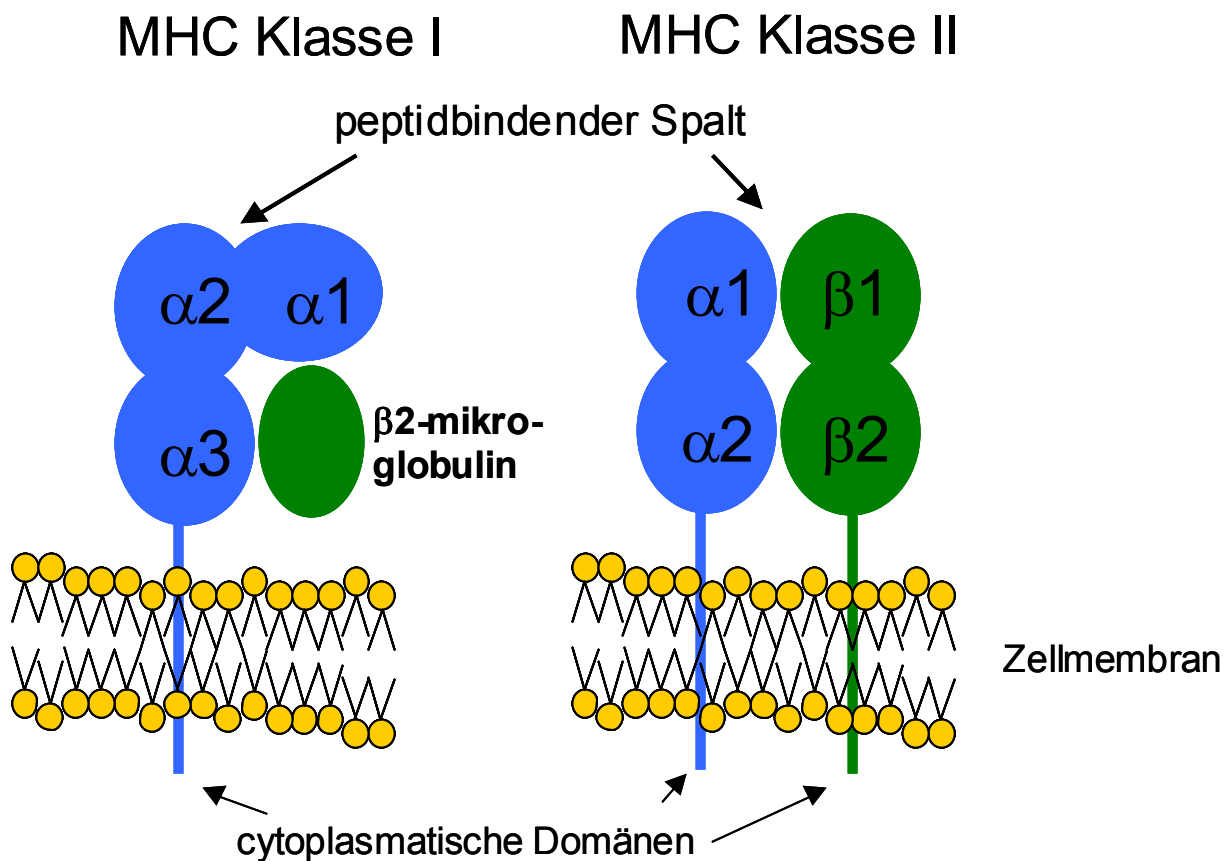


Abb.1.7: Schematische Darstellung der MHC Klasse I- und Klasse II-Moleküle. MHC Klasse I besteht aus einer transmembranen α -Kette und dem nicht kovalent angelagerten $\beta2$ -Mikroglobulin, MHC Klasse II besteht aus den transmembranen α - und β -Ketten.

1.4.2 Der klassische MHC Klasse I Antigenprozessierungsweg

Peptide für eine Präsentation auf MHC Klasse I-Molekülen entstammen Proteinen, die im Zytosol zu Peptiden abgebaut werden. Dies geschieht v.a. durch das Proteasom, einem multikatalytischen Enzymkomplex. Als Quelle dienen zum einen gealterte Proteine, aber auch zu ca. 30% neue, jedoch fehlerhaft synthetisierte Proteine

(DriPs: *defective ribosomal products*). Dadurch können T-Zellen schon sehr früh über eine mögliche Virusinfektion oder Entartung der Zelle informiert werden ^{85, 86}.

Das eukaryotische Proteasom ist ein 770 kD Proteinkomplex, bestehend aus 28 Untereinheiten, die vier Ringe aus jeweils sieben Untereinheiten formen. Die äußeren α -Ringe sind proteolytisch inaktiv, während die inneren β -Ringe die drei proteolytischen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ (Delta, MECL-1, MB1) enthalten. Es handelt sich dabei um Threonin-Proteasen. Durch IFN- γ kann die Synthese der alternativen proteolytischen Untereinheiten $i\beta 1$, $i\beta 2$ und $i\beta 5$ induziert werden. Dadurch entsteht das so genannte Immunproteasom, welches eine andere proteolytische Spezifität aufweist ⁸⁷.

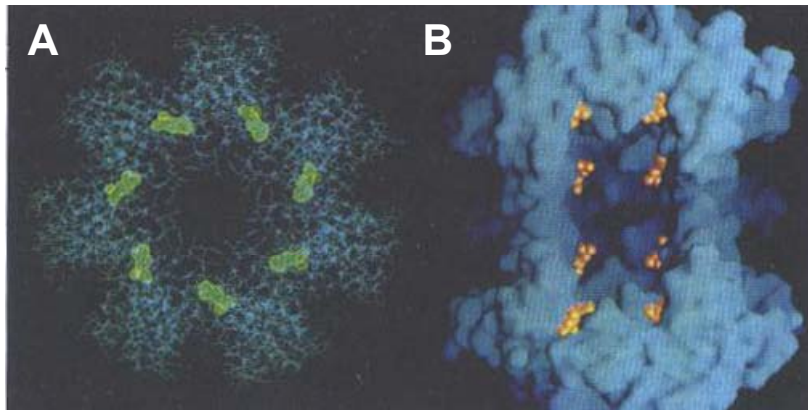


Abb. 1.8: Aufbau des Proteasoms eines Archaeobakteriums. A: horizontaler Querschnitt mit der Anordnung der sieben Untereinheiten pro Ring, grün: proteolytisch aktive Stellen. B: Längsschnitt, gelb: proteolytisch aktive Stellen ⁸.

Des Weiteren kann das 20S Proteasom an seinen außenstehenden α -Ringen um ein oder zwei endständige 19S-Kappen (PA700-Regulator) zum 26S Proteasom erweitert werden. So kann es ubiquitinylierte Proteine erkennen und abbauen, wobei sich die proteolytische Spezifität dabei ändert ⁸⁸. Massenspektrometrische Studien zeigten, dass das Proteasom in vielen Fällen lediglich den korrekten C-Terminus eines Epitops generiert, wobei der N-terminus von anderen Proteasen prozessiert wird ⁷¹.

Einige der Peptide werden nicht vollständig abgebaut und werden mit Hilfe des so genannten TAP-Transporters ins ER transportiert. Dieser Transport erfolgt spezifisch und ATP-abhängig. Ein Vergleich von freien und an Hitzeschockproteine

(HSPs) gebundenen Peptiden zeigte, dass im Falle der Assoziation an HSPs eine effektivere Präsentation auf MHC Klasse I-Molekülen erfolgt ⁸⁹. Dies ist ein Hinweis darauf, dass im Zytosol lokalisierte Chaperone, zu denen u.a. die HSPs gehören, möglicherweise eine wichtige Rolle in der Antigen-Prozessierung einnehmen (Relay Line Hypothese) ⁹⁰.

Der TAP-Transporter ist ein Heterodimer und besteht aus den zwei Untereinheiten TAP-1 und TAP-2, welche beide in der MHC-Genregion kodiert sind. Jede Untereinheit besteht aus zwei Domänen, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer ATP-bindenden Kassettdomäne. Die Bindung der Peptide an den TAP-Transporter erfolgt ATP-unabhängig, wobei der Transport des Peptids in das ER-Lumen ATP-abhängig erfolgt. Der TAP-Transporter bindet im humanen System bevorzugt Peptide mit acht oder mehr Aminosäuren, wobei hierbei solche Peptide mit basischen oder hydrophoben Aminosäure-Resten am Carboxylende bevorzugt werden. Darin spiegeln sich die Kriterien der MHC Klasse I-Peptide wider. In der Maus werden bevorzugt Peptide mit einem hydrophoben C-Terminus gebunden ⁹¹.

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 gefaltetem Zustand im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor. Anschließend bindet das β 2-Mikroglobulin und das so entstandene Heterodimer dissoziiert vom Calnexin-Molekül ab. Es lagert sich anschließend an einen Protein-Komplex, bestehend aus Calreticulin und Tapasin, an, bis ein Peptid bindet. Nach Bindung eines Peptids löst sich das MHC-Molekül von diesem Proteinkomplex ab und wird als vollständig gefaltetes MHC Klasse I-Molekül über Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 1.9).

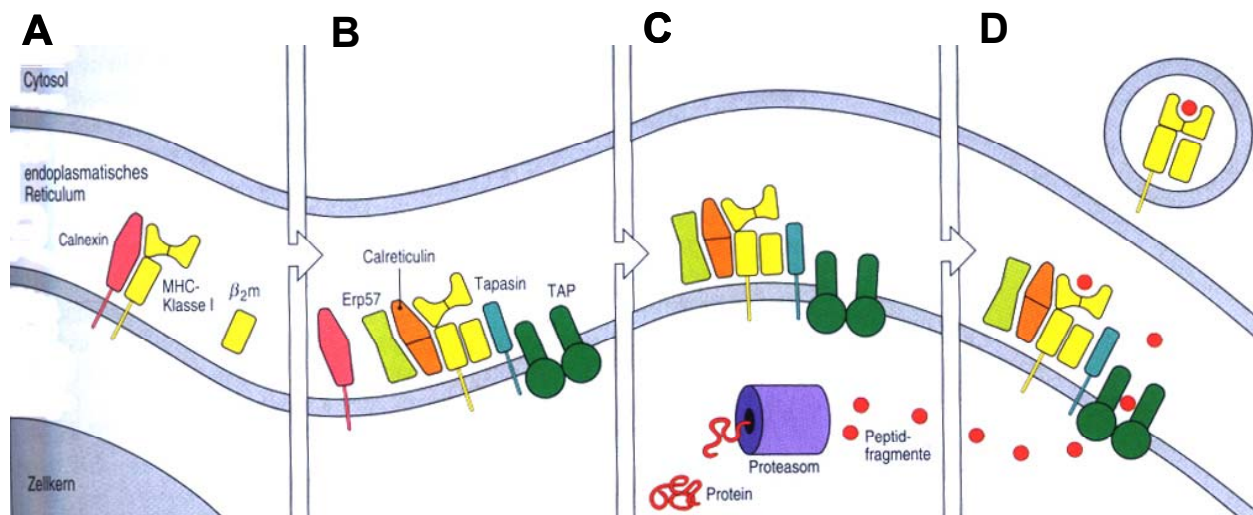


Abb.1.9: Beladung von MHC Klasse I mit Peptiden im Endoplasmatischen Retikulum (ER): partiell gefaltete MHC I α -Ketten binden an Calnexin bis β_2 -Mikroglobulin bindet (A). Der vollständige MHC I-Komplex löst sich von Calnexin, bindet einen Komplex von Chaperonproteinen (Calreticulin) und über Tapasin 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) ⁸.

1.4.3 Der klassische MHC Klasse II Antigenprozessierungsweg

APCs nehmen exogene Antigene v.a. durch Phagozytose, rezeptor-vermittelte Endozytose und Makropinozytose auf, wobei die Antigene über frühe und späte Endosomen in Lysosomen gelangen, in denen sie enzymatisch zu Peptiden abgebaut werden. Für MHC Klasse II-Moleküle, deren α - und β -Kette im ER synthetisiert werden, die aber Peptide aus intrazellulären, endosomalen Vesikeln präsentieren, ist eine Blockierung der Peptidbeladung im ER notwendig. Hierfür ist die mit dem MHC Klasse II-Molekül assoziierte invariante Kette (Ii) verantwortlich. Mit Hilfe von Chaperonen wie z.B. Calnexin bilden sich Trimere aus drei MHC Klasse II- $\alpha\beta$ -Heterodimeren und drei Ii, wobei jeweils ein Ii ein $\alpha\beta$ -Heterodimer nichtkovalent bindet. Da ein Teil der Ii-Polypeptidkette in der Peptidbindungsfurche zu Liegen kommt, wird die Bindungsfurche blockiert, und die Anlagerung von Peptiden, oder partiell gefalteten Proteinen, wird verhindert. Ein weiterer Teil der Ii enthält eine Signalsequenz, die den aus neun Ketten bestehenden Komplex zu den sauren Vesikeln der

Endozytose führt. Dort werden die Ii durch Proteasen, wie Cathepsine S und L verdaut und nur ein kleiner Teil der Ii bleibt als CLIP-Fragment (*Class II associated invariant chain peptide*) gebunden. Der Abbau der Ii findet vermutlich in MIIC (MHC-II-Kompartiment) genannten Kompartimenten statt^{92, 93}.

Beim Menschen katalysiert HLA-DM (Maus: H-2M), ein nicht klassisches MHC Klasse II-Molekül, anschließend die Freisetzung von CLIP und die Bindung eines Peptids aus diesem Kompartiment, das zuvor durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose wie z.B. über B-Zell-Rezeptoren aufgenommen wurde⁹⁴. HLA-DM ist darüber hinaus für die Selektion von stabil gebundenen Peptiden zuständig, ein Prozess der als „*peptide editing*“ bezeichnet wird (Abb. 1.10). Dabei werden schwach gebundene Peptide durch andere Peptide ersetzt. Es besteht ein negativer Regulationsmechanismus durch ein anderes nicht klassisches MHC-Molekül, dem HLA-DO, das in Epithelialzellen des Thymus und in B-Zellen produziert wird. Im Gegensatz zum HLA-DM ist jedoch die Expression der HLA-DO- β -Kette nicht durch IFN- γ induzierbar, so dass bei einer Entzündung die Hochregulation von HLA-DM überwiegt.

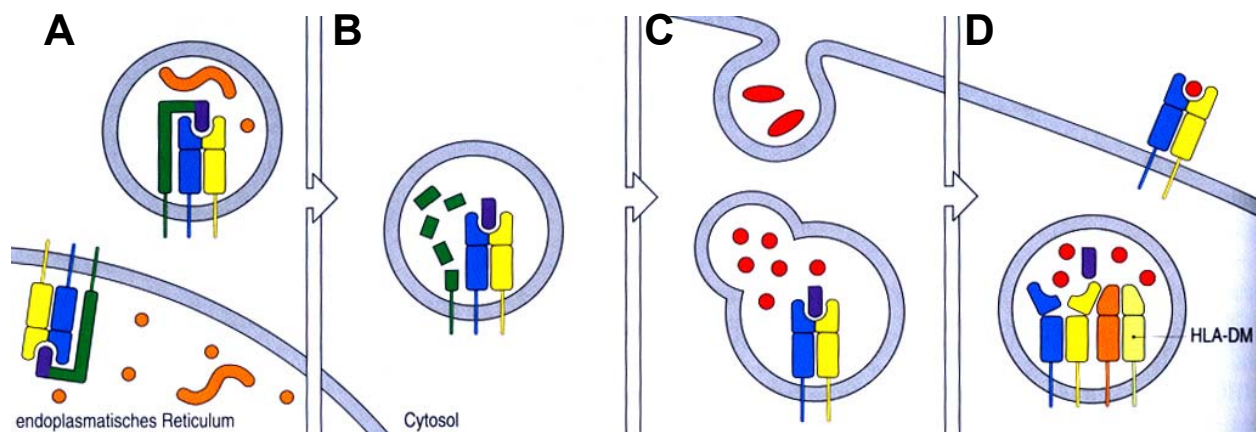


Abb.1.10: Beladung von MHC Klasse II mit Peptiden aus Endosomen: die invariante Kette (Ii) bildet einen Komplex mit MHC II und blockiert die Bindung von Peptiden und falsch gefalteten Proteinen (A). Ii wird in einem angesäuerten Endosom so geschnitten, dass ein kurzes Fragment (CLIP) am MHC II-Molekül gebunden bleibt (B). In Endosomen werden durch Endocytose aufgenommene Antigene abgebaut, wobei das CLIP-Fragment die Bindung von Peptiden an MHC II verhindert (C). HLA-DM bindet an MHC II, CLIP wird frei, und es wird ermöglicht, dass Peptide binden. Das MHC II-Molekül wird an die Oberfläche von APCs transportiert (D)⁸.

1.4.4 Kreuzpräsentation

Der klassische Weg der Antigenprozessierung bedeutet somit, dass endogene Peptide über MHC Klasse I-Moleküle an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden und exogene Peptide auf MHC Klasse II-Moleküle übertragen werden, um CD4⁺-T-Zellen präsentiert werden zu können. Diese Trennung hat den Sinn, dass so virusinfizierte Zellen durch zytotoxische T-Zellen eliminiert werden können, während Zellen, die z.B. viralen Zellschutt durch Endozytose aufgenommen haben, von zytotoxischen T-Zellen verschont bleiben. Jedoch ist für das Priming der T-Zellen zusätzlich eine Kostimulation durch APCs erforderlich. Damit dieses System funktioniert, müssten also alle Viren auch APCs infizieren. Es gibt Viren, wie z.B. das humane Papillomavirus (HPV), das ausschließlich epitheliale Zellen infiziert ⁹⁵. Trotzdem wurden aber natürliche HPV-zytotoxische-T-Zell-Epitope identifiziert ⁹⁶. Es muss also ein Transport von den infizierten epithelialen Zellen zu den APCs existieren, so dass die APCs die Antigene aufnehmen, prozessieren und auf MHC Klasse I-Molekülen präsentieren können. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen etlicher Studien, in denen wiederholt gezeigt wurde, dass es einen alternativen Weg der Antigen-Prozessierung gibt, in dem auch exogene Antigene über MHC Klasse I-Moleküle an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden können ^{97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 84}.

Ursprünglich wurde der Begriff „*Cross-Priming*“ von Michael Bevan eingeführt, der zeigte, dass Minor-H-Antigene auf APCs eines anderen Empfängers mit verschiedenem MHC-Haplotyp transferiert werden und dort spezifisch CTLs primen konnten. Er nannte diesen Vorgang *Cross-Priming*, um den Unterschied zu einer direkten T-Zell-Aktivierung durch die Zellen, die ursprünglich die Minor-H-Antigene exprimierten, deutlich zu machen ^{105, 106}. So umfasste Kreuzpräsentation ursprünglich zellassoziierte Klasse I und Klasse II restringierte Antigene, während das Wort heute nur für die der Klasse I verwendet wird. Kreuzpräsentation meint also einen alternativen Aktivierungsweg zytotoxischer T-Zellen durch exogene Antigene, die vorher von APCs aufgenommen, prozessiert und präsentiert wurden ¹⁰⁷. Dies stellt einen eigenen Prozessierungsweg dar, der es APCs ermöglicht zytotoxische T-Zellen mit Antigenen zu primen, die ursprünglich aus einer anderen Zelle stammen. Damit können sie virusspezifische zytotoxische T-Zellen induzieren, ohne selbst infiziert zu sein. Für Viren, die ausschließlich nicht-hämatopoetische Zellen infizieren, scheint sogar

Kreuzpräsentation durch APCs essenziell für die Auslösung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort zu sein ¹⁰⁸ (Abb.1.11).

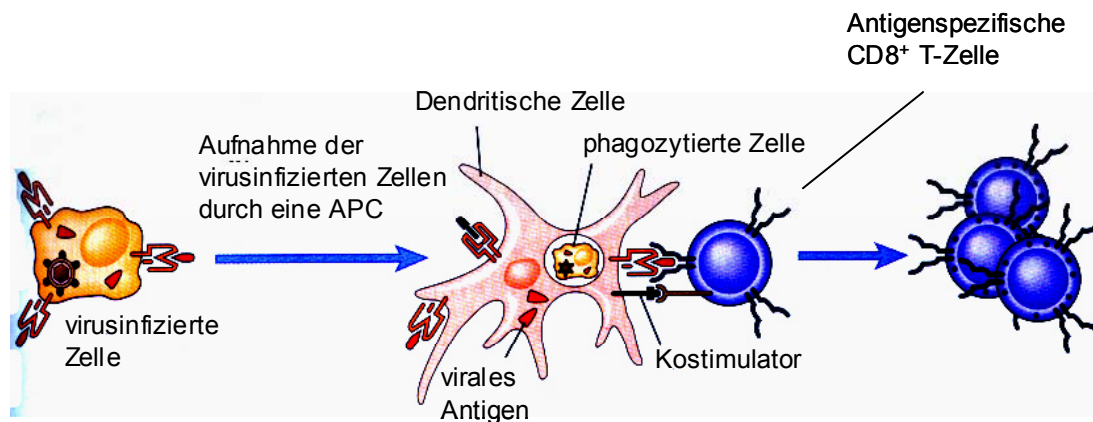


Abb. 1.11: Kreuzpräsentation von Antigenen an CD8⁺-T-Zellen. Virusinfizierte Zellen werden durch APCs aufgenommen und die mikrobiellen Proteine werden zu Peptiden abgebaut und an T-Zellen präsentiert ¹⁰⁹.

Über den eigentlichen Mechanismus dieses Weges ist relativ wenig bekannt. Erste Versuche zur Präsentation exogener löslicher Antigene auf MHC Klasse I-Molekülen führten zu einer Gruppe von APCs, deren Ursprung im Knochenmark lag, als wichtige Mediatoren von Kreuzpräsentation und *Cross-Priming* ¹¹⁰. Verschiedene *in vitro* Studien zeigten, dass DCs ¹¹¹, Makrophagen ¹¹² und B-Zellen ¹¹³ in der Lage sind, exogene Antigene auf MHC Klasse I-Molekülen zu präsentieren. In weiteren Versuchen wurde v.a. mit der Aufnahme von apoptotischen Zellen durch DCs ¹¹⁴ und Makrophagen ¹¹⁵ und der nachfolgenden Kreuzpräsentation der Antigene, die in diesen Zellen enthalten waren, experimentiert. Man glaubt heute mehrheitlich, dass nur DCs zelluläres Antigen kreuzpräsentieren können, auch wenn diese Auffassung nach wie vor umstritten ist.

Kreuzpräsentation kann sowohl zur T-Zell-Aktivierung („*cross-priming*“) als auch zur T-Zell-Toleranz („*cross-tolerance*“) führen ^{116, 117}. DCs und Makrophagen besitzen einen Rezeptor für Phosphatidylserin. Phosphatidylserin gelangt bei einer apoptotischen Zelle von der Innenseite der Zellmembran nach außen ¹¹⁸. So ist eine Unterscheidung zwischen Zelltod durch Apoptose, der im Rahmen des normalen Zelluntergangs geschieht, und dem durch Nekrose im Rahmen einer Entzündung

oder Tumornekrose möglich. Es bestehen Hinweise, dass die Aufnahme nekrotischer Zellen durch DCs die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle induziert, womit eine T-Zell-Aktivierung möglich ist, während dies bei Antigenaufnahme von apoptotischen Zellen nicht der Fall ist ^{119, 120}. Apoptotische Zellen führen zur Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β ¹¹⁸. Des Weiteren führen sie zur Inaktivierung bzw. Toleranzentwicklung von T-Zellen.

Diesbezüglich gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Kotera und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen ^{121, 122} DCs aktivieren können. Auch molekulare Chaperone und HSPs (siehe dazu Kapitel 1.5), die z.B. durch nekrotisierende Zellen freigesetzt werden ¹²³, können über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden und eine zytotoxische T-Zell-Antwort ^{124, 125, 126} oder Toleranz induzieren ^{127, 128}. Diesem Thema ist ein eigenes Kapitel gewidmet (siehe dazu 1.5). Zudem kann Kreuzpräsentation auch im Rahmen der Notwendigkeit der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen eine Rolle spielen. Zusätzlich zur Selektion der T-Zellen im Thymus wurde eine CD95-vermittelte Apoptose autoreaktiver Zellen in der Peripherie durch Kreuzpräsentation beobachtet ¹²⁹.

1.5 Das Hitzeschockprotein Gp96

Die Gruppe der Hitzeschockproteine ist nach ihrem molekularen Gewicht in sechs Subfamilien unterteilt: small HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100. Immunologische Relevanz besitzen dabei nur die HSP60-, die HSP70- und die HSP90-Familie. Im Weiteren wird hauptsächlich auf die HSP90-Familie eingegangen und innerhalb dieser Familie v.a. auf das Glykoprotein 96 (Gp96), da es das bislang am besten untersuchte immunologisch relevante HSP ist.

Das Hitzeschockprotein Gp96, auch bekannt als Glukose-regulierendes Protein (Grp94), ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 94 - 96 kDA. Es gehört zur HSP90-Familie und besitzt eine 47%ige Homologie zu zytosolischem Hsp90. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass Gp96 eventuell durch Genduplikation von Hsp90 entstanden ist ¹³⁰. Wie alle Mitglieder der HSP90-Familie wird auch Gp96 in sämtlichen Metazoen exprimiert und ist hochkonserviert. Die Homologie von humanem bzw. murinem Gp96 zu *Xenopus laevis* beträgt 75% ¹³¹. HSPs werden in

der Zelle konstitutiv exprimiert, wobei die Expression durch Zellstress wie Hitze, Glukose-Mangel oder Virusinfektionen induziert werden kann.

Gp96 ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und besitzt eine aminoterminal Signalsequenz, welche das Protein in das Lumen des ER dirigiert. Außerdem enthält es eine C-terminale ER-Retentionssequenz (KDEL-Motiv). Es wurden aber auch schon kleinere Mengen Gp96 an der Zelloberfläche von Tumor- und nichttransformierten Zellen gefunden^{132, 133}. Der Grund hierfür und die funktionellen Konsequenzen sind jedoch unbekannt.

Hauptaufgabe von HSPs ist die Unterstützung einer korrekten Protein-Faltung. Dazu binden sie an vollständig oder teilweise denaturierte Proteine und verhindern die Aggregation durch Unterstützung der Renaturierung, oder sie initiieren den proteolytischen Abbau bei irreparabler Schädigung.

Immunologisch bedeutsam ist im Falle des Gp96 jedoch besonders die Bindung von Peptiden im ER. Gp96 gilt dabei neben Proteindisulfidomerase (PDI) und Calreticulin als Peptidakzeptator TAP-translozierter Peptide. Aber auch andere Peptide können von Gp96 gebunden werden^{134, 125}. Eine direkte und essenziell wichtige Beteiligung von Gp96 an der Beladung von MHC Klasse I-Molekülen erscheint jedoch unwahrscheinlich, da in Zellen, in denen die Gp96-Expression unterdrückt wurde, keine Veränderung in der Antigenpräsentation festgestellt werden konnte¹³⁵.

Es gibt bis heute keine Röntgen-Kristallstruktur von Gp96. Daher konnten bisher nur, ausgehend von der bekannten Struktur der bei der HSP90- Familie hoch konservierten N-terminalen Domäne des Hsp90 Homologs Hsp82 der Hefe, Rückschlüsse auf Struktur und Funktion von Gp96 gezogen werden¹³⁶. Demnach ist Gp96 wahrscheinlich in der Lage zu dimerisieren, was eine Peptidbindungsfurche zur Folge hätte, in der Peptide von ca. neun AS aufgenommen werden können. Diese Annahme wird durch Beobachtungen von Qu und Mitarbeitern unterstützt, dass Hsp90 und auch kleinere Mengen von Gp96 in der Zelle als Dimere vorliegen¹³⁷. Linderoth und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Peptidbindungstasche von Gp96 am C-Terminus lokalisiert ist (Abb.1.12). Dort grenzt auch die Dimerisierungsstelle an

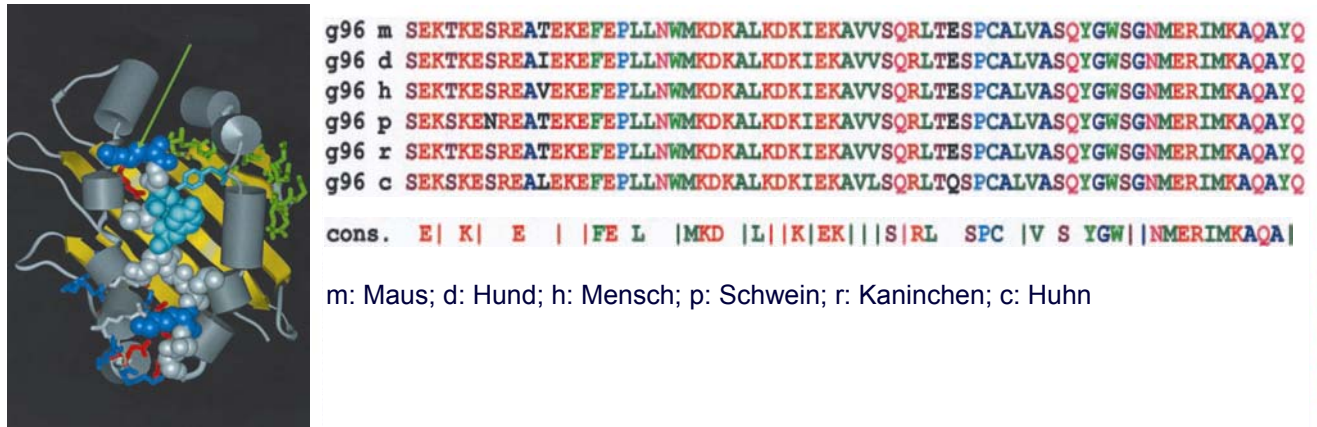


Abb. 1.12: Modell und Sequenz der Gp96-Bindungstasche. Das Modell (links) zeigt die Anordnung der α -Helices und der β -Faltblattstruktur an der Peptid-Bindetasche von Gp96. Die Tasche hat große Ähnlichkeit mit der Peptidbindefurche des MHC Klasse I-Moleküls. Rechts ist die Aminosäure-Sequenz der Bindetasche dargestellt. Zwischen den Arten ist die Homologie sehr groß¹³⁸.

Es konnte auch eine Art Peptidbindungsmotiv für Gp96 durch Kreuzvernetzungsversuche ermittelt werden. Danach bindet Gp96 bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8 - 20 Aminosäuren und 9er Peptide mit ungeladenen Resten an den Positionen 2 und 9¹³⁹.

Zudem fungiert Gp96 unter Umständen auch als schwache Aminopeptidase, indem es am N-Terminus erweiterte Peptidvorläufer so schneiden kann, dass sie von MHC Klasse I-Molekülen gebunden werden können¹⁴⁰.

Auf den immunogenen Charakter von Gp96 stieß man durch die Beobachtung, dass Vakzinierungen von Mäusen mit Gp96, welches aus Tumorzellen isoliert wurde, zu einem Schutz der Mäuse vor den Tumorzellen führten, aus denen das Gp96 stammte^{141, 142, 143, 144, 145}. Dabei wurde durch Gp96 eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort ausgelöst¹⁴⁶. Eine derartige Vakzinierung bei Tumoren, die chemisch und physikalisch induziert sein konnten, führte zu Tumormunität, verlangsamt Tumorwachstum bestehender Tumoren, Rückgang von Metastasen sowie zu einer verlängerten Überlebenszeit¹⁴⁴.

Heute wird Gp96 auch im Zusammenhang mit der Induktion von T-Zell-Toleranz diskutiert. Chandawarkar und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Gp96, wenn es in sehr hohen Dosierungen zur Vakzinierung benutzt wird (10x höher als die im-

munisierende Dosis), keineswegs Immunität, sondern Toleranz gegen den Tumor induziert, aus dem es isoliert wurde ¹²⁷. Dieselbe Gruppe konnte zeigen, dass mit diesen hohen Dosierungen eine *myelin basic protein* oder eine Proteolipid Protein induzierte Autoimmun-Encephalomyelitis in SJL-Mäusen und der Beginn eines Diabetes in *non-obese* Mäusen verhindert werden kann ¹²⁸.

Es stellt sich die Frage, warum gerade extrazelluläre HSPs, im speziellen Gp96, immunogen wirken können, während es auch andere Peptid-bindende Proteine gibt, die, wie z.B. das ER-Protein Proteinindisulfidomerase (PDI), Peptide mit einer viel größeren Affinität binden können. Mit solchen Proteinen konnten aber bislang keine erfolgreichen Immunisierungen gezeigt werden.

Das spezifische Phänomen der Immunogenität wird zur Zeit auf vier Eigenschaften der HSPs zurückgeführt. Sie haben erstens die Fähigkeit Peptide zu binden, zweitens haben sie die Möglichkeit rezeptorvermittelt durch APCs endozytiert zu werden, drittens sind sie in der Lage die Zytokinproduktion in APCs zu induzieren und viertens haben sie, vor allem im Fall des Gp96, Einfluss auf die Reifung von DCs ^{147, 148}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten Gp96 binden können, was zur Folge hat, dass Gp96 nicht mehr zur Verfügung steht um eine Reifung von DCs zu bewirken ¹⁴⁹. Vor kurzem wurde eine Aktivierung von polymorphonukleären Neutrophilen und Monozyten mit daraus resultierender verstärkter phagozytischen Aktivität beobachtet ¹⁵⁰.

1.5.1 HSP assoziierte Peptide

Da die Immunogenität von Hitzeschockproteinen weder auf unterschiedliche HSP-Varianten zurückgeführt werden konnte, da ihnen eine monomorphe Kodierung zugrunde liegt, noch tumor- oder virusspezifische Mutationen in Hsp90 oder Gp96 cDNAs gefunden wurden ¹⁵¹, stieß man letztendlich auf die an HSPs gebundenen Peptide als Ursache der spezifischen Immunität.

Gp96-Präparationen aus mit dem β -Galactosidase-Gen (β -gal) transfizierten Zellen induzierten eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort gegen ein L^d-restringiertes β -gal-Epitop. Im Gegensatz dazu war dies nicht der Fall bei Gp96-Präparationen aus identischen, aber nicht transfizierten Zellen ¹⁴⁶. Der MHC-Haplotyp der HSP-Donorzelle spielt dabei keine Rolle, da die HSPs im Unterschied

zu den MHC-Molekülen nicht polymorph sind. Jedes HSP-Gen besitzt nur ein Allel. So konnten im Rahmen klassischer *Cross-Priming*-Experimente HSP-Peptid-Komplexe auch eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen Minor-H-Antigene bei einer Maus eines anderen Haplotyps auslösen^{106, 146}. Wenn Gp96 oder HSP70 *in vitro* mit Peptiden beladen werden, kann ebenfalls eine spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort gegen das entsprechende Peptid hervorgerufen werden¹⁵², wobei keine Immunantwort ausgelöst werden konnte, wenn man die HSP-assoziierten Peptide entfernte¹⁵³. Zudem wurde nachgewiesen, dass weder HSPs allein noch die einzelnen Peptide in der Lage waren, eine Immunreaktion auszulösen. Des Weiteren führten Peptidkomplexe mit anderen, nicht zur HSP-Familie gehörenden Proteinen, wie z.B. mit dem peptidbindenden Serumprotein Albumin, nicht zu einer Immunantwort. Gp96-Präparationen aus virusinfizierten Zellen führen ebenfalls zu einer Immunität gegen das Virus. So konnte Gp96 aus VSV (*vesicular stomatitis virus*)-infizierten EL-4-Zellen eine VSV8 (RGYVYQGL)-spezifische zytotxische T-Zell-Antwort induzieren¹⁵⁴. Gp96 aus virusinfizierten Zellen war dabei mit bekannten viralen Peptiden assoziiert, während diese bei Gp96 aus nicht infizierten Zellen nicht gefunden werden konnten. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man mit HSPs im Rahmen von SV40-transformierten Zellen¹⁵⁵, im Influenza-System¹⁵⁶ oder mit LCMV-Epitopen¹⁵⁷. Bis heute ist der genaue Übertragungsweg der Peptide von Gp96 auf MHC Klasse I nicht genau aufgeklärt. Abb.1.13 zeigt schematisch zwei mögliche Wege der Peptidübertragung auf MHC Klasse I, nachdem Gp96-Peptid-Komplexe internalisiert wurden.

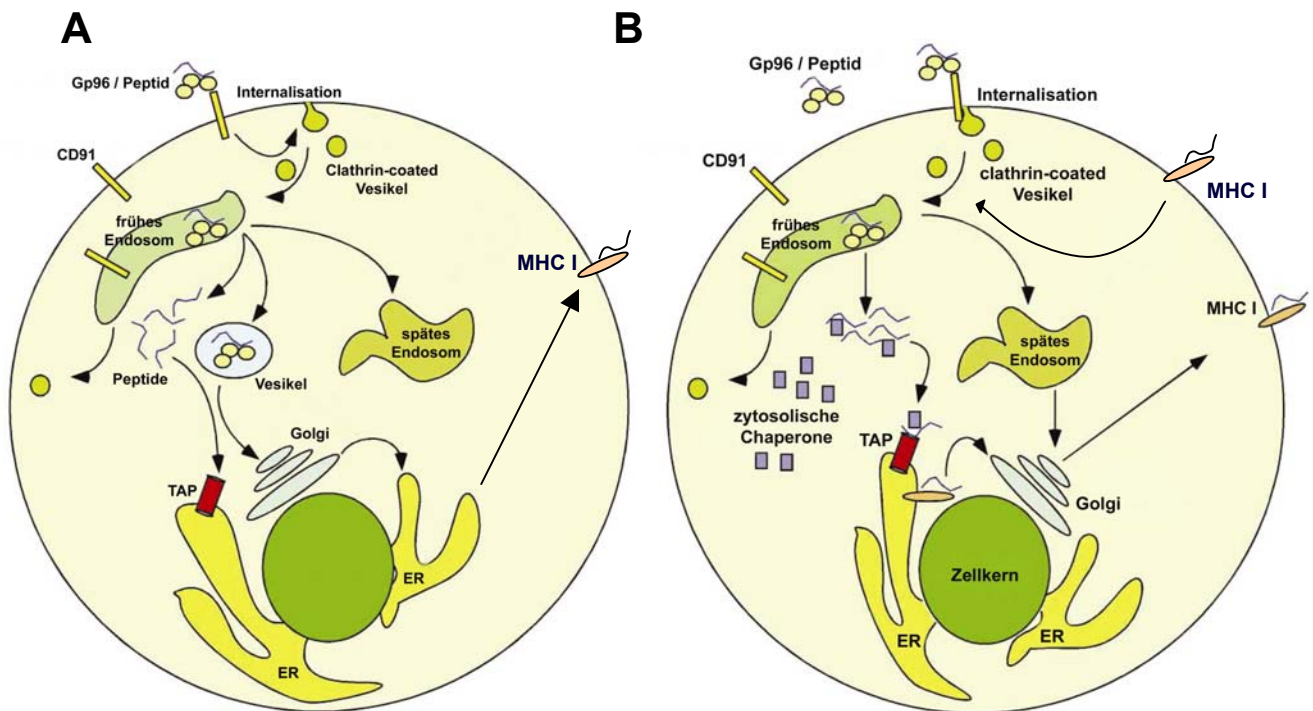


Abb. 1.13: Mögliche Wege der Peptidübertragung auf MHC Klasse I bei der Kreuzpräsentation: Nach der Internalisation des Gp96-Peptid-Komplexes gelangt der Komplex in ein frühes Endosom. Von dort wird er über verschiedene Vesikel in den Golgi-Apparat transportiert und wegen des KDEL-Motivs von Gp96 schließlich ins ER übertragen, wo die Peptide auf MHC Klasse I übertragen werden. Alternativ könnte der Komplex oder die Peptide allein aus den Endosomen ins Cytosol der Zelle gelangen und von dort durch Transport mittels des TAP-Transporters ins ER-Lumen gebracht werden (A). Nach Internalisation könnte der Gp96-Peptid-Komplex auch in ein Kompartiment gelangen in dem sich auch zu recycelnde MHC Klasse I-Moleküle befinden. Ein niedriger pH-Wert könnte die Peptidübertragung begünstigen, wobei auch der Abbau von Gp96 denkbar wäre. Die neu beladenen MHC Klasse I-Moleküle werden dann auf die Zelloberfläche transportiert (B) ¹⁵⁸.

1.5.2 Rezeptoren für Gp96

Da nur geringe Mengen an HSP-Peptid-Komplexen ausreichend für eine effiziente T-Zell-Antwort sind, wurden schon bald spezifische Rezeptoren für HSPs auf der Oberfläche von APCs postuliert ⁹⁰. Folgendes Modell wurde vorgeschlagen: Die Lyse virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen, aber auch Nekrose, führt zur Freisetzung von HSPs mit anschließender Aufnahme der HSP-Peptid-Komplexe durch CD91 auf

APCs. Dadurch kann das an HSPs assoziierte Peptid in den endogenen MHC Klasse I-Weg eingeschleust werden und folglich über MHC Klasse I-Moleküle an der Oberfläche den CD8-Zellen präsentiert werden (Abb.1.14).

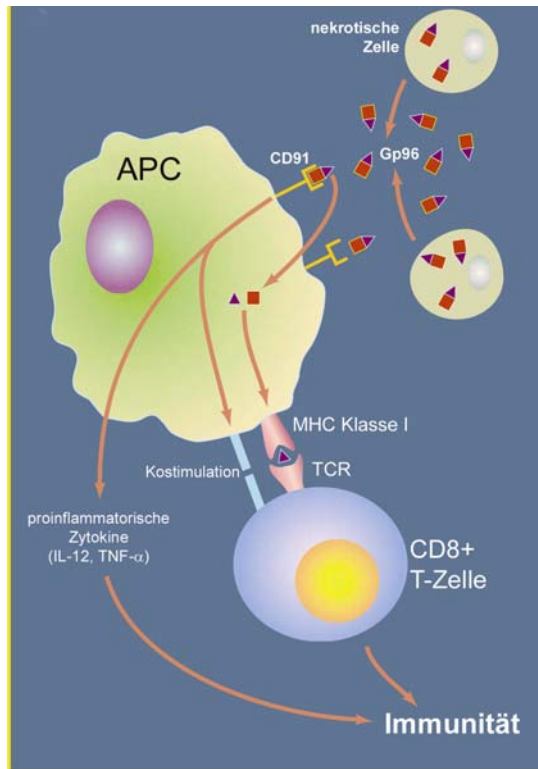


Abb.1.14: Gp96 wird durch Lyse virusinfizierter Zellen und bei Nekrose freigesetzt. Es bindet dann an CD91 auf APCs, wird internalisiert, das Peptid wird auf ein MHC-Klasse I-Molekül übertragen und es kommt zu einer CD8⁺-T-Zell-Antwort¹.

In elektronenmikroskopischen Bindungsstudien mit gold-markiertem Hsp70 und Gp96 wurde eine spezifische Bindung der HSPs an Clathrin-reiche Oberflächenregionen (*clathrin coated pits*) von Makrophagen und Monozyten beobachtet¹⁵⁹. Des Weiteren wurde die spezifische Gp96-Bindung auf APCs wie Makrophagen, B-Zellen und DCs gezeigt. T-Zellen dagegen konnten kein Gp96 binden. Nur eine rezeptor-vermittelte Endozytose von Gp96 durch die APCs führte zu Kolo-kalisation mit MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Molekülen in endosomalen Kompartimenten und zur Kreuzpräsentation der assoziierten Peptide¹²⁶. Durch chemischen *cross-link* von Gp96 mit Plasmamembranfraktionen von Makrophagen und anschließender Sequenzierung der gebundenen Proteine konnte CD91, bislang nur bekannt als Rezeptor für α 2-Makroglobulin und *low density lipoprotein* (LDL), als erster Rezeptor für Gp96 identifiziert werden¹⁶⁰. Jedoch wurde vor kurzem auch eine CD91-unabhängige Kreuzpräsentation von Gp96-assozierten Peptiden bei Makrophagen

beobachtet¹⁶¹. Als weitere Rezeptoren für Gp96 wurden die *toll-like*-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 identifiziert. Dabei kommt es in DCs durch die Bindung von Gp96 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, wobei die Aktivierung der DCs dabei nur erfolgt, wenn Gp96 endocytiiert wird. Dies spricht dafür, dass CD91 bei diesem Prozess eine Rolle spielt^{162, 163}. Mit dieser Beobachtung können die TLRs nicht mehr ausschließlich mit PAMPs assoziiert werden, da Gp96 in Bakterien oder Pilzen nicht exprimiert wird, und somit einen nicht-pathogenen Liganden der TLRs 2 und 4 darstellt.

Insgesamt gilt, dass eine rezeptorvermittelte Endozytose für eine Kreuzpräsentation der an HSP assoziierten Peptide essenziell ist, eine unspezifische Endozytose oder Makropinozytose führen nicht dazu.

Da Gp96 intrazelluläre Peptide bindet und über CD91 in APCs gelangt, um dort die gebundenen Peptide in den MHC Klasse I-Weg einzuschleusen, es gleichzeitig die APC aktiviert, indem kostimulatorische Moleküle hochreguliert werden, und da es die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-12 und TNF, induziert, wird Gp96 zu einem potenziellen Messenger für nekrotische Zellen, der das Immunsystem in Alarmbereitschaft versetzen kann¹.

1.6 TANK und TBK1 bei der Aktivierung von NF- κ B

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch sequenzspezifische Bindung an regulatorische Promotor- und Enhancer-Einheiten der DNA die Transkription von Genen regulieren können. Es existieren zellspezifische Transkriptionsfaktoren, oder solche, die nur zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiviert sind, sowie ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, die durch zahlreiche unterschiedliche Stimuli aktiviert werden können. Unter Letzteren findet sich der *nuclear factor- κ B* (NF- κ B). Die Proteine der NF- κ B-Transkriptionsfaktorfamilie stellen ein spezialisiertes System eines pluripotenten Aktivierungsfaktors für eine zelluläre Antwort auf Veränderungen in der Umwelt dar. Erste beschrieben Sen und Baltimore 1986 NF- κ B als Transkriptionsfaktor am *kappa*-Leichtketten-Enhancer, einer spezifischen DNA-Region in reifen B-Lymphozyten der Maus¹⁶⁴. Des Weiteren wurde NF- κ B in vielen Zellpopulationen, wie z. B. Keratinozyten, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten, En-

dothelzellen, Fibroblasten und Neuronen, sowie in Viren entdeckt und mit Immun- und Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht.

In seiner aktiven Form liegt NF- κ B beim Menschen als Homo- oder Heterodimer vor. Am häufigsten findet man NF- κ B, das aus den Untereinheiten p50 und p65 besteht, aber auch andere Untereinheiten wie rel, relB, v-rel oder p52 können Teil des aktiven NF- κ B-Proteins sein. Die unterschiedlichen NF- κ B-Dimere aktivieren dabei wahrscheinlich unterschiedliche Zielgene.

Das zytoplasmatisch gebundene und somit inaktivierte NF- κ B kann durch verschiedene Signalwege sofort aktiviert werden (z. B. durch elektromagnetische Wellen, immunologische Reaktionen oder UV-Licht). Eine Vielzahl von unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren spielen dabei eine Rolle. NF- κ B wird auf einen solchen Stimulus hin von seinem spezifischen Inhibitorprotein I κ B freigesetzt. Es kommt zu einer Phosphorylierung von I κ B- α durch spezifische Kinasen an den Aminosäuren Ser 32 und Ser 36^{165, 166} und einer anschließenden Ubiquitinilierung an Lysin 21 und Lysin 22¹⁶⁷, auf die der Abbau durch das 26S-Proteasom folgt. Daraufhin liegt das NF- κ B-Protein ungebunden und somit aktiviert vor.

Freigesetztem NF- κ B ist es möglich, in den Zellkern zu wandern, wo es an genomischer DNA sequenzspezifische DNA-Erkennungsmotive in der Promotorregion besetzt und so zu einer Initiierung oder Verstärkung der Gentranskription an verschiedenen Zielgenen führen kann¹⁶⁸. Auf diese Weise können Proteine der NF- κ B-Familie bei vielen inflammatorischen und immunologisch vermittelten Reaktionen regulierend eingreifen (z. B. auch durch die Regulation der Apoptose).

Die Stimuli, welche NF- κ B aktivieren, reichen von physikalischem Stress (ionisierende Strahlung, UV-Licht) über infektiöse Agenzien (wie Viren, Bakterien, Parasiten und ihre Produkte), bis hin zu biochemischen Reizen und zellulären Botenstoffen wie Zytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren¹⁶⁹.

Der Vielfalt an Stimuli, die NF- κ B aktivieren können, steht eine nicht minder große Anzahl an Genen gegenüber, die durch NF- κ B reguliert werden. Darunter finden sich z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stress-Proteine, immunmodulierende Moleküle oder Haupthistokompatibilitätsantigene¹⁶⁹.

Die Zelle muss auf äußere Noxen reagieren, um das Gleichgewicht des Gewebeverbandes durch Reparaturvorgänge, oder Initiation einer Entzündungsreaktion und Immunantwort zu erhalten. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B nimmt durch seine

schnelle Einflussnahme und sein breites Aktivierungsmuster von proinflammatorisch und proliferativ wirksamen Genen, sowie durch seine antiapoptotische Wirkung diesbezüglich eine Schlüsselposition ein. Wird eine Zelle Stimuli ausgesetzt, die NF- κ B aktivieren, so ist I κ B schon nach wenigen Minuten nicht mehr nachweisbar und erscheint *de novo* erst wieder nach etwa 30 Minuten¹⁷⁰. Diese *de-novo*-Synthese wird durch NF- κ B selbst induziert, da I κ B-Gene in ihrer Promotorregion eine κ B-Erkennungssequenz besitzen^{171, 172}. Das Wiedererscheinen des Inhibitorproteins I κ B- α beendet wiederum die NF- κ B-Aktivierung, da es an NF- κ B bindet und der Komplex wieder ins Zytoplasma übertritt. Es handelt sich hierbei also um einen autoregulatorischen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus¹⁷³.

Die signalinduzierte Phosphorylierung von I κ B wird durch den I κ B-Kinase-Komplex (IKK) vermittelt. Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten, wobei zwei davon Kinase-Aktivität besitzen (IKK α und IKK β). Die dritte Untereinheit, NEMO (NF- κ B *essential modulator*) ist für die Phosphorylierung und Aktivierung durch *upstream*-Kinasen notwendig^{174, 175, 176}. Der IKK-Komplex wird durch Signale von TNF (Tumor Nekrose Faktor), der Toll- / IL-1-Familie, durch CD3 / CD28 Kostimulation von T-Zellen und durch das LMP1-Signal-Protein des Epstein-Barr-Virus aktiviert¹⁷⁷ und setzt die Aktivierung der NIK-Kinase und anderer MAP3-Kinasen (MEKK1, 2 und 3) voraus^{178, 179, 180, 181, 182}. NIK ist ein sehr potenter Aktivator des IKK-Komplexes und bindet bzw. aktiviert sowohl IKK α als auch IKK β ^{183, 184, 185}.

Rezeptor-Oligomerisation nach Bindung eines Liganden führt über Adaptor-Proteine der TRAF-Familie zur Aktivierung der NIK-IKK-Kaskade¹⁸⁶. Die TRAFs können dabei direkt an cytoplasmatische Domänen des Rezeptors binden, wie bei CD40, CD30, CD27, LMP-1 und TNF-Rezeptor 2, oder sie binden über Adaptorproteine, die ihrerseits an bestimmte Domänen des Rezeptors binden, wie z.B. an TRADD oder RIP beim TNF-Rezeptor 1 oder MyD88 und IRAK beim IL-1 Rezeptor. Für die TRAFs 2, 5 und 6 konnte eine Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden^{187, 188, 189, 190}, und alle drei können direkt mit NIK interagieren¹⁹⁰.

TANK (*TRAF associated NF- κ B activator*) ist ein TRAF-bindendes Protein mit sowohl aktivierenden als auch inhibierenden Eigenschaften^{191, 192}. Für die aktivierende Eigenschaft ist der N-Terminus und eine zentrale Region, mit der TANK an TRAF2 binden kann, erforderlich¹⁹¹. Da TANK an TRAFs (unter anderem an TRAF2) binden kann, wurde zunächst angenommen, dass TANK als Konkurrenzmolekül zur

TRAF-bindenden cytoplasmatischen Rezeptordomänen fungiert. So könnte TANK in hohen Konzentrationen die Liganden-abhängige Rekrutierung von TRAFs an den Rezeptor verhindern, wodurch dann die Aktivierung von NIK und damit von NF- κ B unterbunden würde. Des Weiteren hat der C-Terminus von TANK inhibitorische Aktivität, was zu der Schlussfolgerung führte, dass auch diese Eigenschaft für die Inhibition des TRAF-vermittelten Signalweges eine Rolle spielen könnte^{191, 192, 193}. Unklar war aber, wie TANK ebenso als positiver Kofaktor von TRAFs fungieren konnte, denn es war bekannt, dass TANK dazu beitrug NF- κ B durch TRAF2 zu aktivieren, wenn wenig TRAF2 vorliegt¹⁹¹. Durch die Identifizierung von TBK 1 (*TANK binding kinase 1*) schloss man, dass TANK in den TNF, IL-1 und CD40 Signalpfaden ausschließlich eine inhibitorische Rolle spielt, und dass TBK1 die stimulierende Aktivität, die man fälschlicherweise TANK zuschrieb, vermittelt¹⁹⁴. Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird TBK1 an den schon bestehenden Komplex aus TANK und TRAF2 rekrutiert und es bildet sich ein aktiver ternärer Komplex, der in der NIK-IKK-Kaskade mündet (Abb.1.15)¹⁹⁴. Dass TANK und TRAF2 in unstimulierten Zellen assoziiert vorliegen, konnte 1996 durch Rothe und Mitarbeiter gezeigt werden¹⁹². Es ist allerdings noch nicht klar, ob TBK1 aus einem bestehenden Depot rekrutiert wird, oder ob es sich um neu synthetisiertes Protein handelt. Eine weitere Möglichkeit der NF- κ B-Aktivierung im Zusammenhang mit diesem Komplex wurde 2000 von Numura und Mitarbeitern beschrieben. Sie identifizierten IKK-i (*inducible I κ B kinase*) und zeigten, dass IKK-i in der Lage ist TANK im TANK/TRAF2 zu phosphorylieren, wodurch TRAF2 freigesetzt wird und so NF- κ B aktivieren kann^{195,196}.

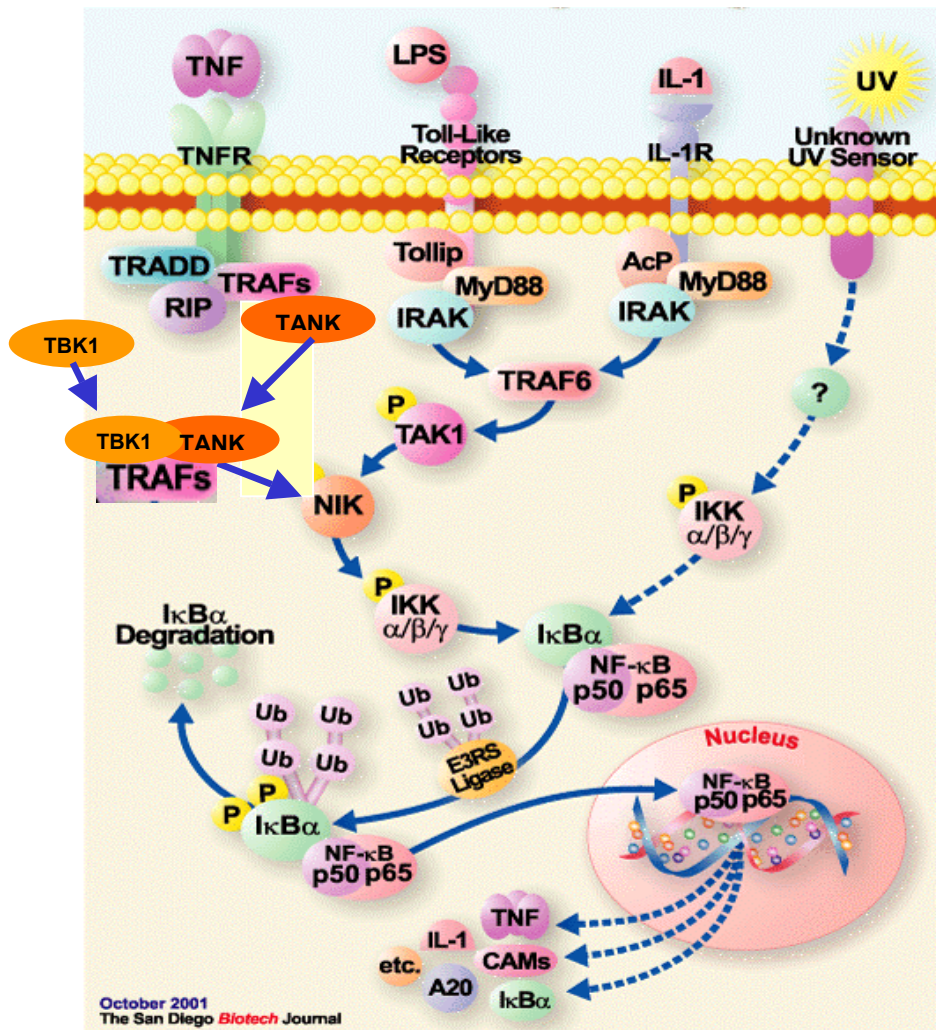


Abb.1.15: NF- κ B Signalwege (Quelle: The San Diego Biotech Journal, 2001)

1.7 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.7.1 Aufbau der Darmwand

Die Mukosa des Darms wird von der Epithelzellschicht (Abb.1.16) bedeckt. Die schleimbedeckten Epithelzellen sind auf einer Basalmembran fixiert und kleiden die unregelmäßigen Gewebserhebungen, die Zotten, und die zwischen den Zotten liegenden Gewebseinsenkungen, die Krypten, aus. Das Gewebe unter der Epithelzellschicht, die *Lamina propria*, wird von Lymphgefäßen, Blutgefäßen und Nervenbahnen durchzogen. Im Bindegewebe der *Lamina propria* finden sich hauptsächlich

Myofibroblasten, Lymphozyten und Makrophagen. Das vorherrschende Gewebsprotein im Darm ist Kollagen, das von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen produziert wird.

Die *Lamina propria* wird durch die *Muscularis mucosae* von der Submukosa getrennt. Die *Muscularis mucosae* ist eine etwa fünf Zellen dicke Schicht von glatten Muskelzellen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Darmmotilität.

Die Submukosa ist ein loses Maschenwerk von dünnen Kollagenfibrillen. Diese verbinden die Mukosa mit der *Muscularis propria*. Die Submukosa wird von Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen.

Lateral der Submukosa schließt sich eine Schicht aus Ringmuskulatur und eine Schicht aus Längsmuskulatur an. Die Darmwand wird durch die Serosa begrenzt, die beim Dünndarm durch das Mesenterium an der hinteren Bauchwand befestigt ist.

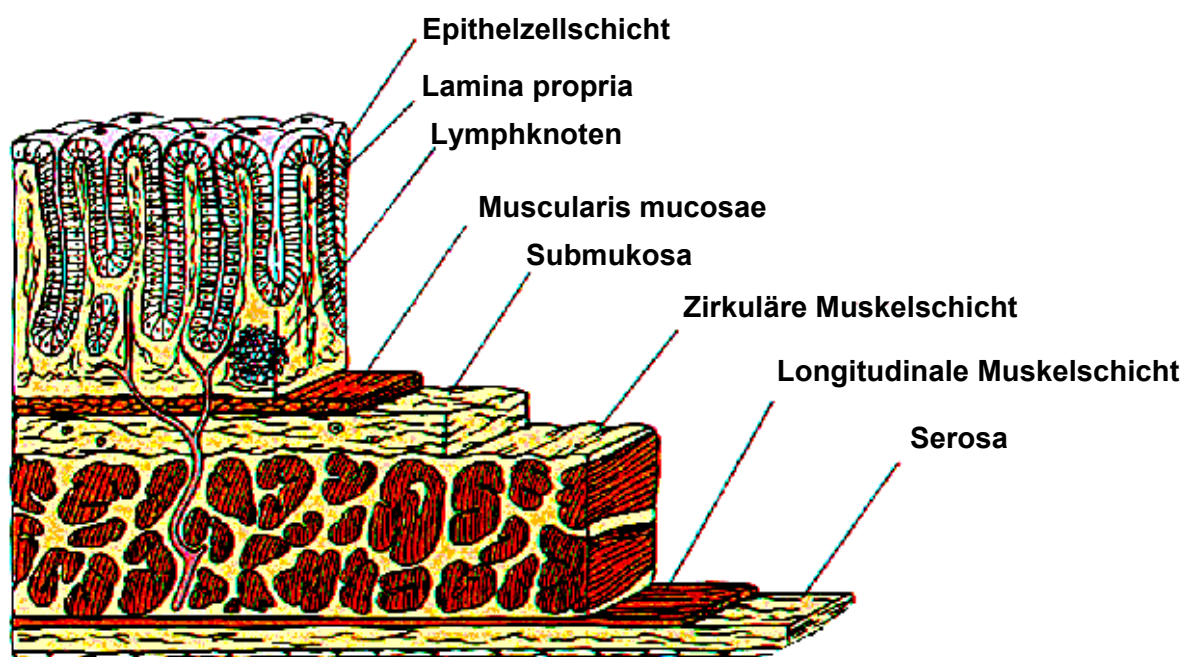


Abb.1.16: Aufbau der Darmwand (nach Boland, 1992, S.16)

1.7.2 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa sind chronisch entzündliche Erkrankungen des Darmes, deren Ätiologie und Pathogenese bislang nicht geklärt ist¹⁹⁷. Epidemiologischen Studien zufolge liegt die jährliche Neuerkrankungsrate des Morbus

Crohn bei 2 - 4 und der Colitis ulcerosa bei 3 - 9 Personen pro 100.000 Einwohner. In Deutschland schätzt man die Zahl der Erkrankten auf über 300.000. Die Erkrankungsgipfel beider Krankheiten liegen meist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr.

Ätiopathogenetische Faktoren, die für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen verantwortlich sein könnten, werden zur Zeit neu diskutiert. Es gilt als sicher, dass ein polygenetischer Hintergrund vorliegt, der zur familiären Häufung von Morbus Crohn beiträgt. Aus familiären Untersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingen kann auf eine genetische Prädisposition für Morbus Crohn geschlossen werden. Monozygote Geschwister haben bei Erkrankung ihrer Geschwister ein im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung 15 - 35-fach erhöhtes Risiko an Morbus Crohn zu erkranken^{198, 199}. Durch Kopplungsanalysen ist es gelungen Risikoregionen auf den Chromosomen 12 und 16, sowie weitere potenzielle Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 11 zu identifizieren²⁰⁰. Neueren Untersuchungen zufolge könnten Mutationen im NOD2/CARD15-Gen auf Chromosom 16 eine wichtige ätiopathogenetische Rolle bei Morbus Crohn spielen^{201, 202}.

Umwelteinflüsse wie Ernährungsgewohnheiten, Infektionen und Rauchen scheinen ebenfalls an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmkrankheiten mitzuwirken^{199, 203, 204}. Rauchen ist ein wichtiger Risikofaktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und das postoperative Rezidiv bei Morbus Crohn. Interessanterweise hatte dagegen bei der Colitis ulcerosa das Rauchen in mehreren Studien einen protektiven Effekt auf die Krankheitsmanifestation¹⁹⁹. Wahrscheinlich müssen genetische Faktoren mit epigenetischen Komponenten (Umwelt) zusammentreffen, damit sich chronisch entzündliche Darmerkrankungen manifestieren.

Klinisch zeigen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa viele Gemeinsamkeiten. Beide können abdominelle Schmerzen und Diarrhöen, mit bis zu fünfzehn Stuhlgängen am Tag, verursachen. Zudem können beide Erkrankungen häufig zu Gewichtsabnahme und Mangelernährung führen. Verlauf, Ausdehnung und Schweregrad der Erkrankung sind sehr variabel und nicht vorhersehbar. In der Mehrzahl der Fälle werden mehr oder minder lange Remissionsphasen von akuten Schüben unterbrochen. Bei etwa 20 - 30% der Patienten lässt sich ein chronisch aktiver Verlauf feststellen.

Der Morbus Crohn ist eine entzündliche Erkrankung aller Schichten der Darmwand. Er ist charakterisiert durch einen diskontinuierlichen Befall der Schleimhaut (Abb.1.17). Sämtliche Abschnitte des Magen-Darm-Trakts vom Mund bis zum

Enddarm können betroffen sein. Beim Morbus Crohn handelt es sich insgesamt um ein komplexes Krankheitsbild, das durch verschiedene intestinale (Fisteln, Abszesse, Stenosen des Darmlumens mit Gefahr der Ileusentwicklung) und extraintestinale Manifestationen (Arthralgien, Arthritiden, *Erythema nodosum*, Iridozyklitis) gekennzeichnet ist. Eine medikamentöse und chirurgische Heilung der Erkrankung gelingt bisher nicht. Die Therapie zielt vielmehr unspezifisch auf eine Reduktion des Entzündungsgeschehens ab.

Morbus Crohn - Befallsmuster



Abb1.17.: Morbus Crohn - Befallsmuster (Quelle: www.hdm-stuttgart.de)

Die Colitis ulcerosa ist eine Erkrankung der Kolonmukosa. Sie beginnt im Rektum, breitet sich kontinuierlich nach proximal aus und befällt in etwa 18% der Fälle das gesamte Kolon (Abb.1.18). Gefürchtete Komplikationen der Colitis Ulcerosa sind das toxische Megakolon und die Entwicklung eines Kolonkarzinoms. Die Erkrankung ist nur durch eine totale Kolektomie, d.h. durch operative Entfernung des Dickdarms heilbar.

Colitis ulcerosa - Befallsmuster

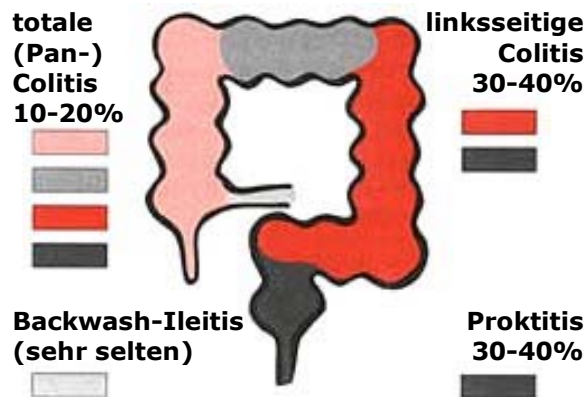


Abb. 1.18: Colitis ulcerosa – Befallsmuster (Quelle: www.hdm-stuttgart.de)

Eine spezifische medikamentöse Therapie mit dem Ziel der Heilung ist für beide Erkrankungen nicht bekannt. Nach wie vor sind Aminosalicylate, Glukokortikoide, sowie die klassischen Immunsuppressiva Azathioprin und Ciclosporin, die wichtigsten Arzneimittel zur symptomatischen Behandlung eines akuten Schubes und der Remissionserhaltung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ²⁰⁵.

1.7.3 Störung des Gleichgewichts des intestinalen Immunsystems bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Das intestinale Immunsystem hat für den Körper eine zentrale Bedeutung. An der Stelle der höchsten Antigen- und Pathogendichte, nämlich dem Darmlumen, muss es den Körper vor der Invasion von Pathogenen durch eine kontrollierte Immunantwort bewahren. Gleichzeitig muss aber eine überschießende Immunantwort, die zu einer permanenten Entzündungsreaktion führen würde, verhindert werden. Nahrungsbestandteile dürfen nicht als fremd erkannt werden, andererseits muss frühzeitig auf potenzielle Noxen reagiert werden.

Zu den wichtigen 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, in-

testinale 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) ²⁰⁶ und anti-entzündlichen (z.B. IL-10, IL-4) ²⁰⁷ Faktoren. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist dieses Gleichgewicht zwischen pro-entzündlichen und anti-entzündlichen Zytokinen gestört, ein Überwiegen der entzündungsfördernden Mechanismen wurde beschrieben ^{208, 209, 210}.

IL-4 und IL-13 sind Makrophagen-inhibierende T_H2-Zytokine ^{211, 212, 109}. Im Zusammenhang mit chronischen Darmentzündungen gelten sie als antiinflammatorisch. Vor allem IL-4 spielt im Immunsystems des Darmes eine entscheidende Rolle ²¹³. 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 sind ²¹⁴.

IL-6 ist ein proinflammatorisches T_H1-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 ^{215, 216, 217, 218}.

IL-10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin und unterdrückt die Zytokinfreisetzung von T_H1-Zellen und Makrophagen, bei letzteren besonders die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF und IL-12 ^{219, 109}. 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 ³².

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 ^{220, 221, 222}. Im Kolitis-Modell mit IL-10 defizienten Mäusen wurde ebenfalls eine erhöhte TNF-Expression in Kulturen aus Darmzellen festgestellt ²²³.

IFN- γ wird u.a. von T_H1-Zellen exprimiert. Es aktiviert Makrophagen, indem es ihre Fähigkeit zur Zerstörung intrazellulärer Erreger erhöht. Des Weiteren triggert IFN- 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 IFN- γ von verschiedenen Populationen regulatorischer T-Zellen gebildet wird^{224, 225, 226, 227, 228}. Bei MC ist IFN- γ in der intestinalen Mukosa vermehrt vorhanden^{229, 230, 231}, wobei keine Erhöhung im Serum festgestellt werden kann²³².

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 Gewebsschädigung führen.

Die Rolle der intestinalen Myofibroblasten und glatten Muskelzellen ist bisher wenig untersucht. Ihre mögliche Bedeutung für das intestinale Immunsystem wird durch die Fähigkeit, Akutphase-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 schließlich darin überein, dass alle auslösenden Faktoren schließlich in die genannte Überaktivierung des intestinalen Immunsystems münden.

1.7.4 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 nachweisen¹⁴. In der Entzündung sind etwa 30-40% der Mukosa-Makrophagen CD14 positiv²³³. Mahida und Mitarbeiter konnten die Präsenz des Fc γ III-Rezeptors bei CED mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und an isolierten Zellen nachweisen¹⁵. Die entzündungsassoziierte 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 sind ²³⁴.

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 B ²³⁵. Des Weiteren wird in intestinalen Makrophagen während der Entzündung vermehrt Cathepsin D exprimiert und es ist eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität nachzuweisen ^{19, 18}.

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

1.8 Arbeitsziele

Die spezifische Differenzierung der Makrophagen im Intestinum bringt einen besonderen Phänotyp hervor, der in dieser Form noch in keinem anderen Organ des Menschen beschrieben wurde (1.2.2). Intestinale Makrophagen aus normaler Mukosa sind negativ für die mit der Zellaktivierung assoziierten Oberflächenantigene CD14, CD16 und CD11b, aber auch für TLR2 und 4, sowie für die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Ihnen fehlt zudem die NADPH-Oxidase und sie exprimieren kein Cathepsin D.

In Vorarbeiten wurden durch subtraktive Hybridisierung zwei Gene identifiziert, die in intestinalen Makrophagen, im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen, exprimiert werden: Gp96 und TANK. Bisher wurden in der Literatur nur Gene beschrieben, die in intestinalen Makrophagen herunterreguliert sind. Die einzige Ausnahme bildet das Chemokin Mip-3 α , welches ebenfalls in intestinalen Makrophagen heraufreguliert ist, und vermutlich eine Rolle bei der Rekrutierung von CD45RO⁺ memory-T-Zellen in die Lamina propria spielt. Die Rolle von Gp96 und TANK in intestinalen Makrophagen sollte durch die Beantwortung verschiedener Fragen geklärt werden.

1. Wird die Gp96-mRNA in intestinalen Makrophagen exprimiert? Dafür war es zunächst nötig mRNA aus intestinalen Makrophagen verschiedener Patienten mit und ohne intestinale Entzündung (MC und CU) zu isolieren, um damit RT-PCR und quantitative *real-time*-PCR-Versuche (TaqMan[®]) durchführen zu können.
2. Wird das Gp96-Protein in intestinalen Makrophagen exprimiert? Gibt es dabei Unterschiede zwischen nicht entzündeter Mukosa und der Mukosa mit unterschiedlichen entzündlichen Veränderungen (MC, CU, Divertikulitis)? Dies kann auf Gewebeschnitten des humanen Darmes mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen untersucht werden. Dabei soll auf einem Schnitt sowohl Gp96 als auch CD68, ein spezifischer Makrophagen-Marker, markiert und durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden.

3. Ist die Expression von Gp96 differenzierungsspezifisch für intestinale Makrophagen? Im Sphäroid-Modell wandern frisch elutrierte Blutmonozyten in Sphäroide aus HT-29-Zellen ein und differenzieren dabei zu Makrophagen, die in der Expression verschiedener Gene intestinalen Makrophagen entsprechen. Durch Immunhistochemie kann Gp96 in den eingewanderten Monozyten / Makrophagen nachgewiesen werden. Weiterhin sollte die Gp96-mRNA-Expression von Monozyten und *in vitro* differenzierten Makrophagen mittels quantitativer PCR (TaqMan®) untersucht werden.
4. Wird Gp96-Protein in intestinalen Makrophagen der Maus exprimiert? Gibt es dabei Unterschiede, wenn eine durch T-Zell-Transfer ausgelöste Kolitis besteht? An Gewebeschnitten des Darmes von Mäusen mit und ohne intestinale Entzündung galt es immunhistochemische Untersuchungen durchzuführen. So wird festgestellt, ob das Gp96-Protein bei Mensch und Maus in gleicher Weise exprimiert ist.
5. Untersuchungen zur Funktion von Gp96 im Zusammenhang mit intestinalen Entzündungen sollten im Transfer-Kolitis-Maus-Modell durch Behandlung von Scid-Tieren mit Gp96 nach T-Zell-Transfer und durch Vorbehandlung der Spendertiere mit Gp96 durchgeführt werden.
6. Eine konditionelle Gp96-knock-out-Maus wird hergestellt. Dafür werden die benötigten Gp96-Genfragmente mittels PCR aus genomischer DNA der Maus amplifiziert und zusammen mit einer Neomycin-Resistenz, lox p-Elementen (für die *cre*-Rekombinase) und *frt*-Stellen (für die Flippase) in den pSL301-Targeting-Vektor kloniert. Die Gesamtgröße der Vektors wird in etwa 13 kb betragen.
7. Welche weiteren Gene werden in intestinalen Makrophagen im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen exprimiert? Dafür wird das Expressionsprofil intestinaler Makrophagen und *in vitro* differenzierter Makrophagen durch Affymetrix GeneChip® Analysen ermittelt, und miteinander verglichen.

In intestinalen Makrophagen liegt der Transkriptionsfaktor NF- κ B in gebundener und somit inaktiver Form im Zytoplasma vor. Es kommt nicht zur Aktivierung NF- κ B-abhängiger Gene. Diese Inaktivität kann durch das Fehlen von Rezeptoren, wie TLR2 und 4, deren Bindung an Lipopolysaccharid und Peptidoglykan in der Aktivierung von NF- κ B münden, erklärt werden. Die Hybridisierungsversuche deuten aber auf einen weiteren intrazellulären Mechanismus hin: TANK ist in intestinalen Makrophagen im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen exprimiert. Dies lässt vermuten, dass ein weiterer zellinterner Mechanismus die Aktivierung von NF- κ B zusätzlich unterbindet. Ein solcher Mechanismus kann durch die Interaktion von TANK mit TRAF2, bei gleichzeitigem Fehlen von TBK1, gegeben sein. Dies ist ein Hinweis, dass dieser Mechanismus in intestinalen Makrophagen genutzt wird.

1. Durch quantitative PCR (TaqMan[®]) mit cDNA intestinaler Makrophagen, Monozyten und *in vitro* differenzierter Makrophagen sollte die Induktion von TANK in intestinalen Makrophagen bestätigt und die von TBK1, als Gegenspieler von TANK, ermittelt werden. Das Expressionsprofil von intestinalen Makrophagen wurde durch Affymetrix GeneChip[®] Analysen ermittelt. Es gilt die Induktion von TANK zu bestätigen. Gleichzeitig sollte durch die Affymetrix GeneChip[®] Analysen die Expression von TBK1 in intestinalen Makrophagen untersucht werden.
2. Die Expression von TANK- und TBK1-Protein kann in Makrophagen der intestinalen Mukosa durch immunhistochemische Färbungen, wie auch schon bei Gp96, und durch Western Blot bestätigt werden.

2 Material

2.1 Herkunft von Chemikalien und Enzymen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind mit deren Bezugsquellen in folgender Tabelle zusammengefasst, wenn nicht anders vermerkt stammten sie von der Firma Merck (Darmstadt):

Material für die Zellkultur:

Agar	Difco, Detroit, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bacto Trypton	Difco, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DMEM Kulturmedium	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Gewebe-Kulturflasche	Greiner, Solingen
<i>Hank's buffered salt solution</i> (HBSS)	Biochrom, Berlin
IL-2, rekombinant	Chiron, München
Multiwell-Kulturplatten 96-, 6-well	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Nicht essenzielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Polystyrenröhrchen 15, 50ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
RPMI-1640 Kulturmedium	Biochrom, Berlin
Trypsin mit EDTA	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Vitamine (MEM-Vitamine)	Biochrom, Berlin
Yeast Extract	Difco, Detroit, USA

Geräte für die Zellkultur:

Brutschrank Heraeus 6000	Sepatech, Osterode
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Sterilbank LaminAir HSB 2472 S	Sepatech , Osterode

Materialien und Geräte für die Durchflusszytometrie:

Durchflusszytometer Coulter® EPICS® XL - MCL™	Coulter, Immunotech, Krefeld
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Polystyren Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit Isoton® II	Coulter, Immunotech, Krefeld

Sonstige Materialien:

0,5 ml PCR Tubes	Biozym, hess. Oldendorf
1,5 ml Schraubdeckelgefäße	Eppendorf, Hamburg
LS Separationssäule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>bicinchonic acid solution</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BioMax™ ML Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Cu^{2+} (<i>copper (II) sulfat pentahydrate solution</i>)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
dNTP Mix	PeqLab, Erlangen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ficoll-Paque®	Pharmacia, Freiburg
Filterpapier	Whatman, Biometra, Göttingen
Gp96, rekombinant, endotoxinfrei	Immatics Biotechnologies, Tübingen
Gp96 peptidbeladen	Immatics Biotechnologies, Tübingen
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kollagenase Typ I	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Peptide (<i>E.coli putative outer membrane lipoprotein</i> Wza, Acc. Nr. Q9X4B7, AAD21562) : VYVTTAPLV und GFLSGCTII	Immatics Biotechnologies, Tübingen
Petrischalen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Sonstige Geräte:

Analysenwaage, sartorius analytic A120 S	Sartorius, Göttingen
Biofuge15 Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Megafuge Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
pH-Meter	wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	pmf, Köln
SuperMACS Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen
Waage Sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen

2.2 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 2.3 zusammengefasst:

Dynabeads® mRNA DIRECT Kit	Dynal®, Hamburg
Gene Checker™ Kit (A)	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
Micro Beads (MACS Beads)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
TOPO™ TA Cloning® Kit (B)	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
Reverse Transkription System	Promega, Mannheim

HotStartTaq® Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Taqman® Universal Master Mix	PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Beadlyte® Mouse Multi-Cytokine Flex Kit (Luminex®)	Upstate (Vertrieb über Biomol, Hamburg)

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Oligonukleotide für qualitative PCR

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aus Fertigkombinationen (2.2) von Biochemikalien sind in folgender Tabelle zusammengefasst und mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Die jeweiligen Kits sind unter 2.2 zusammengefasst:

(A) GAPDH (1)	5' TTA GCA CCC CTG GCC AAG G 3'
(A) GAPDH (2)	5' CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG 3'
(A) 5' Actin (1)	5' GCT CAC CAT GGA TGA TGA TAT CGC 3'
(A) 5' Actin (2)	5' GGA GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC 3'
(A) 3' Actin (1)	5' GAA GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC 3'
(A) 3' Actin (2)	5' CTG GTC TCA AGT CAG TGT ACA GG 3'
(A) 6K Clathrin (1)	5' GAC AGT GCC ATC ATG AAT CC 3'
(A) 6K Clathrin (2)	5' TTT GTG CTT CTG GAG GAA AGA A 3'
(A) 2K Clathrin (1)	5' GCT CAC ATG GGA ATG TTC AC 3'
(A) 2K Clathrin (2)	5' ATG TTG TCA AAG TTG TCA TAA G 3'
(B) M13 forward Primer	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'
(B) M13 reverse Primer	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Selbst konstruierte Primer sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

gp96 for	5' GGG TGT GGT GGA CTC AGA TG 3'
gp96 rev	5' GTT GCC AGA CCA TCC GTA CT 3'
TBK1 for	5' CCG GGA ACC TCT GAA TAC CAT AG 3'
TBK1 rev	5'CCA TGC GTC TGC CAG TGA TC 3'
TANK V1 for	5' TGG CTG TGT TCC TCT GCT TGA 3'
TANK V1 rev	5' AAC CTC AGC CTT TAT TTT ACT TG 3'
TANK V2 for	5' ATG GCT GTG TTC CTC TGC TTG 3'
TANK V2 rev	5' CCA GCA GAT CAC TTC AGA AAA AT 3'

2.3.2 Oligonukleotide für Real-time-PCR

Gp96 for	5' CCC GAA TTT GAT GGG AAG AG 3'
Gp96 rev	5' TCC TTA GTT TTC TCA CTT TCA TCG AA 3'
Gp96 Probe	5'–FAM–TTC CAG AAT GTT GCC AAG GAA GGA GTG A– TAMRA–3'
TANK V1 for	5' GGA CCC ATC TGA TGC ACC TT 3'
TANK V1 rev	5' TGT GGT CCT CGG ATT GCT TT 3'
TANK V1 Probe	5'–FAM–TCC CTC ACT CGA TTC CCC GGG–TAMRA–3'
TANK V2 for	5' TCT GCA GAA AGC AGC ATT TAA 3'
TANK V2 rev	5' CAG CAG ATC ACT TCA GAA AAA TAA AA 3'
TANK V2 Probe	5'–FAM–TGCTGATGCGTGACATAGCTTCCTC–TAMRA–3'

2.3.3 Oligonukleotide für den k.o.-Maus-Vektor

Bei den unterstrichenen Sequenzabschnitten handelt es sich um die zur Klonierung benötigten und an die Primer angehängten Restriktionsschnittstellen.

Martin do	5' GCA GAA CTT GAA AAC ACA TAC 3'
Martin up	5' AAT TCC CAG TTT GTG TTA TG 3'
k.o. Xba fl	5' <u>TCT AGA</u> AGC ACT GAG TAT TTG GGA TC 3'
k.o. Kpn rl	5' <u>GGT ACC</u> TCG GGT GTA ACA GCA GGG AC 3'
k.o. Kpn fl	5' <u>GGT ACC</u> CGA GGT TAC AGG TGA GGC A 3'
k.o. Nru rll	5' <u>TCG CGA</u> TCG CTG CAA AGA GAG GCC CAT 3'
k.o. Xho f III	5' <u>CTC GAG</u> CAG CTA AAG ACA AGA GTT CC 3'
k.o. Sfi r III	5' <u>GGC CCA CGT GGC</u> CTT TTC CTG CCC TAT GTG 3'
lox p for (Sal I)	5' GTC <u>AGT CGA</u> CGA AAA GCG CCT CCC CTA C 3'
lox p rev (Sal I)	5' CTA <u>GGT CGA</u> CCG CTG CCT CTG CTT GCT G 3'
lox frt neo frt f (Xho I)	5' CAG <u>TCT CGA</u> GCT AGA TAT CGA TGG CCA TAG 3'
lox frt neo frt r (Sal I)	5' TTA <u>TGT CGA</u> CTC TAG GGC C 3'

2.4 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	MicroBeads	Maus IgG ₁ monoklonal	P67.6	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-Maus IgG ₁	PE	Ziege	keine Angabe	Caltag, Hamburg
Goat IgG	PE	Ziege	keine Angabe	Caltag, Hamburg

anti-rabbit	FITC	Schwein	keine Angabe	Dako, Hamburg
anti-CD68	ohne	Maus IgG	KP-1	Dako, Hamburg
anti-Grp94 (monoklonal)	ohne	Ratte IgG2a	9G10	Stressgen Biotechnologies, Victoria, Kanada
anti-Grp94 (polyklonal)	ohne	Kaninchen	keine Angabe	Stressgen Biotechnologies, Victoria, Kanada
anti-TANK/I-TRAF	ohne	Kaninchen IgG	Keine Angabe	Biozol, Eching bei München
anti-TBK1	ohne	Maus	108A429	BD Pharmingen, Heidelberg
Rat IgG 2a	ohne	Ratte IgG2a	keine Angabe	Cymbus Biotechnology LTD, Hampshire, UK
Rabbit anti-rat	Biotin	Kaninchen	keine Angabe	Dako, Hamburg
anti-Maus IgG	Biotin	Ziege	keine Angabe	Jackson, Dianova, Hamburg
Maus IgG1 κ	ohne	Maus	keine Angabe	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Rabbit anti-goat	Biotin	Kaninchen	keine Angabe	Dako, Hamburg
Goat anti-rabbit	Biotin	Ziege	keine Angabe	Dako, Hamburg
Amdex Goat anti-rabbit	HRP	Ziege	keine Angabe	Amersham, Freiburg
Alexa Fluor [®] 488 chicken anti-mouse IgG (H+L)	Alexa-Fluor [®] 488	Huhn	keine Angabe	Molecular Probes Europe BV, The Netherlands
Alexa Fluor [®] 594 goat anti-rat IgG	Alexa Fluor [®] 594	Ziege	keine Angabe	Molecular Probes Europe BV, The Netherlands
Rabbit Immunglobulin Fraction	ohne	Kaninchen	keine Angabe	Dako, Hamburg
Goat Serum	ohne	Ziege	keine Angabe	Dako, Hamburg

Kaninchen Serum	ohne	Kaninchen	keine Angabe	Dako, Hamburg
Anti-Rabbit	HRP	Ziege	keine Angabe	Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK
Anti-Maus-CD45R	ohne	Ratte	B220	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus-CD11b	ohne	Ratte	M1/70	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus-CD8	ohne	Ratte	2C11	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus MHC II	ohne	Ratte	2G9	BD Pharmingen, Heidelberg
Goat anti-rat	Magnetische Beads	Ziege	keine Angabe	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-Maus-CD62L	Magnetische Beads		keine Angabe	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4	FITC	Ratte	RM4-5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD8	FITC	Ratte	53-6.1	BD Pharmingen, Heidelberg
MHC Klasse II	FITC	Ratte	2G9	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45R	FITC	Ratte	RA3-6B2	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45RB	PE	Ratte	C363.16A	BD Pharmingen, Heidelberg
CD62L	PE	Ratte	MEL-14	BD Pharmingen, Heidelberg
CD25	PE	Ratte	PC61	BD Pharmingen, Heidelberg
CD103	PE	Ratte	M290	BD Pharmingen, Heidelberg

2.5 Nährmedien und Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien für die Bakterienkultur sind in folgender Tabelle aufgeführt:

LB ₀ (Luria broth)	Bacto Trypton (Difco, Detroit, USA)	10 g
	Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	Mit 1 N NaOH pH 7,2 einstellen	
	Für LB ₀ -Platten: Agar (Difco, Detroit, USA) zugeben, autoklavieren	12 g
Ampicillin	100 µg/ml	
Kanamycin	50 µg/ml	

2.6 Puffer

Lösungen für die Makrophagenisolation:

PBS (10 x)	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.	

Lösungen und Zubehör für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA–Auftrennung):

TAE (50 x)	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM
Ladepuffer	Glycerin	5,47 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	Xylencyanol	25 mg
	EDTA (0,5 M)	2 ml
	H ₂ O	ad 10 ml
DNA–Agarosegel	Agarose	1–2 % (w/v)
	gelöst in TAE (1 x)	
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	0,04 %
E-Gel [®] 0,8% oder 1,2%	Invitrogen, Karlsruhe	
Agarose (GP)		

Lösungen und Zubehör für Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE):

NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE [™] 12% Bis-Tris Gel 1mm x 10 well	Invitrogen, Karlsruhe

Sonstige Puffer:

Waschpuffer für Western Blot	500 ml PBS
	1 ml TWEEN 100
Blockierlösung für Western Blot	50 ml PBS
	2,5 g Magermilchpulver

2.7 Organismus und Vektor

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus und der Vektor stammt aus dem TO-PO™ TA Cloning®-Kit (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande, 2.2).

Organismus : *E. coli* **TOP10** $F^-mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15$
 $\Delta lacX74 recA1 deoR araD139 \Delta(ara-leu)7696 galU galK rpsL$
 $(Str^R) endA1 nupG$

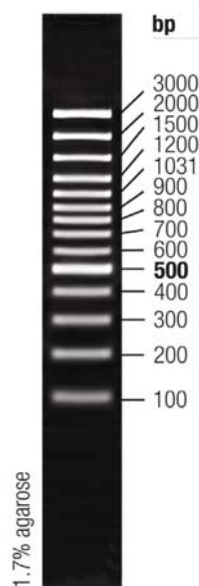
Vektor : pCR® II–TOPO (3,9 kb)

Vektor für Gp96-knock-out-Maus: pSL301 (3,2 kb) (Invitrogen, Karlsruhe)

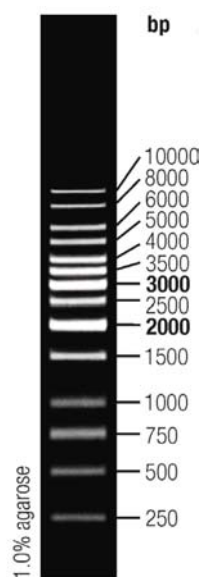
2.8 DNA-Größenstandard

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

100 bp DNA Ladder Plus



1kb DNA Ladder:



3 Methoden

3.1 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 (3.1.1) und aus Darmbiopsaten (3.1.2). *In vitro* differenzierte Makrophagen (3.1.5) wurden aus leukapheretisch gewonnenen Monozyten (3.1.4) generiert.

3.1.1 Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Resektaten

Humane Lamina propria mononukleäre Zellen (LPMNZ) wurden aus chirurgischen Darmresektaten nach einem modifizierten Protokoll von Bull ²³⁶ gewonnen. Anschließend wurden aus den LPMNZ mittels magnetischer Zellsortierung (3.1.3) 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 (Abb.3.1). 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* (HBSS, Biochrom, Berlin) heftig geschüttelt und gevortext. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt und der Erfolg mikroskopisch kontrolliert.

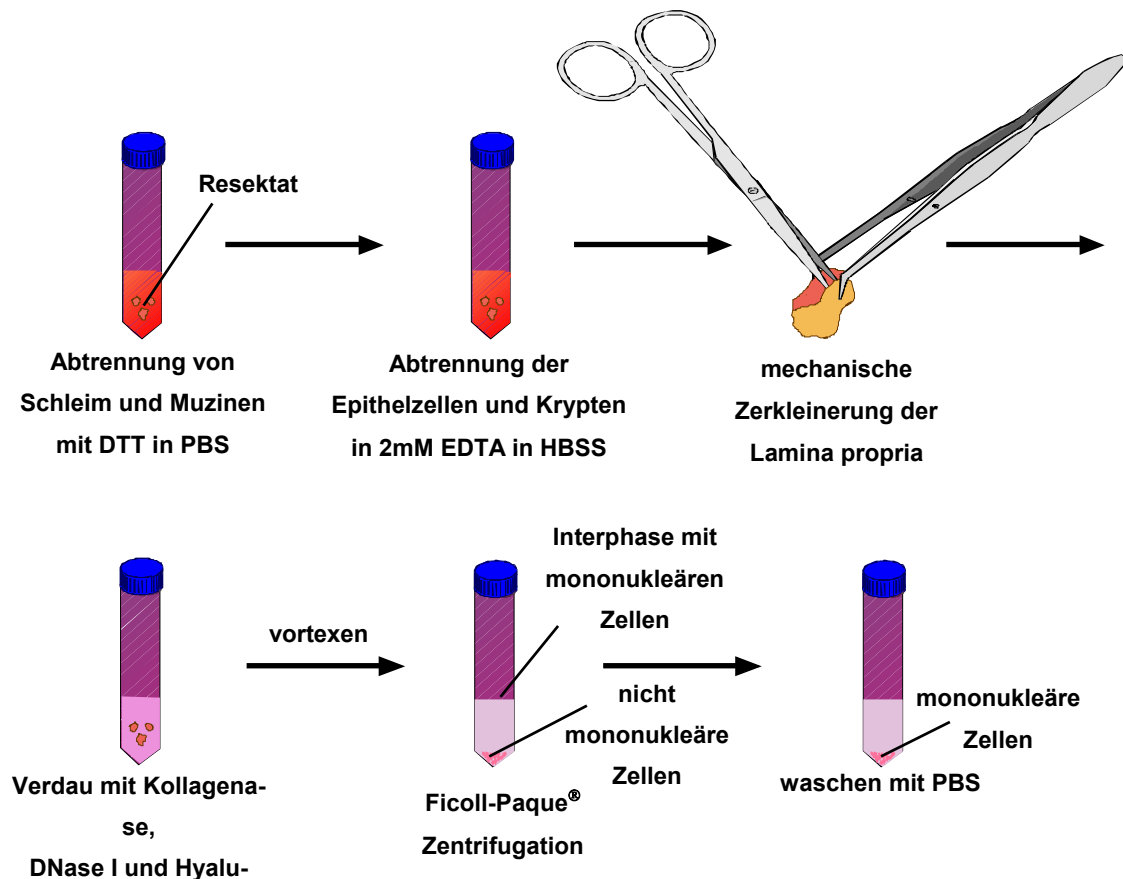


Abb.3.1: Darstellung der Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Darmresektaten. Nach der Abtrennung von Schleim, Epithelzellen und Krypten wurde die Lamina propria mechanisch zerkleinert und verdaut. Mononukleäre Zellen wurden über Ficoll-Paque® abgetrennt und mit PBS gewaschen.

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 Desoxyribonuklease (DNase I, Boehringer, Mannheim) und 0.2 mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) in geeigneter Menge PBS für 1 h 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-Paque® (Pharmacia, Freiburg) Zentrifugation von nicht mononukleären Zellen (Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) abgetrennt. Die Zellen wurden in 15 ml

Makrophagenmedium (2.5) aufgenommen, über 15 ml Ficoll geschichtet und in einer Heraeus Zentrifuge bei 2000 rpm, bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die mononukleären Zellen in der Interphase wurden mit PBS gewaschen. Aus den gewonnenen LPMNZ wurden mit Hilfe magnetischer Zellsortierung (3.1.3) Makrophagen isoliert.

3.1.2 Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Biopsaten

Die Isolation humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Darmbiopsaten entsprach prinzipiell der Isolation aus Resektaten (3.1.1). Die wesentlich geringere Ausbeute an LPMNZ wurde in der Durchflusszytometrie (3.9) eingesetzt. Die Isolation der LPMNZ aus Biopsaten beinhaltet den enzymatischen Aufschluss der *Lamina propria* und das physikalische Abtrennen der nicht mononukleären Zellen.

Vier bis sechs Darmbiopsate wurden, entsprechend dem Protokoll zur Isolation aus Resektaten, in 10 ml HBSS gereinigt und die Epithelzellen mit 2mM EDTA abgetrennt. Der enzymatische Aufschluss erfolgte in einem Volumen von 2 ml für 30 min bei 37 °C. Die Zellen wurden mit einer 21 gauge und einer 23 gauge Kanüle einzelt und entsprechend der Anleitung für die Isolation aus Resektaten über Ficoll-Paque® zentrifugiert. Die mononukleären Zellen in der Interphase wurden abschließend mit PBS gewaschen und in der Durchflusszytometrie (3.9) eingesetzt.

3.1.3 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 (3.2.1) oder in der Durchflusszytometrie (3.9) eingesetzt.

LPMNZ wurden, zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen, in 200 µl MACS Puffer (0) 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 AS Separationssäule (Miltenyi Biotec, Bergisch Glad-

bach) 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 (Abb.3.2). MicroBeads markierte Makrophagen, die im magnetischen Feld am Säulenmaterial verblieben, wurden mit 1 ml MACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Separationssäule aus dem Magnetfeld entfernt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Spritze entgegen der ursprünglichen Flussrichtung in das Reservoir der Säule zurückgespült. Nach erneutem Einbringen in das magnetische Feld wurde die Zellsuspension aus dem Reservoir wieder auf die Säule gelassen und mit 1 ml MACS Puffer gespült. Außerhalb des Magnetfeldes wurden die Zellen mit 4 ml MACS Puffer eluiert.

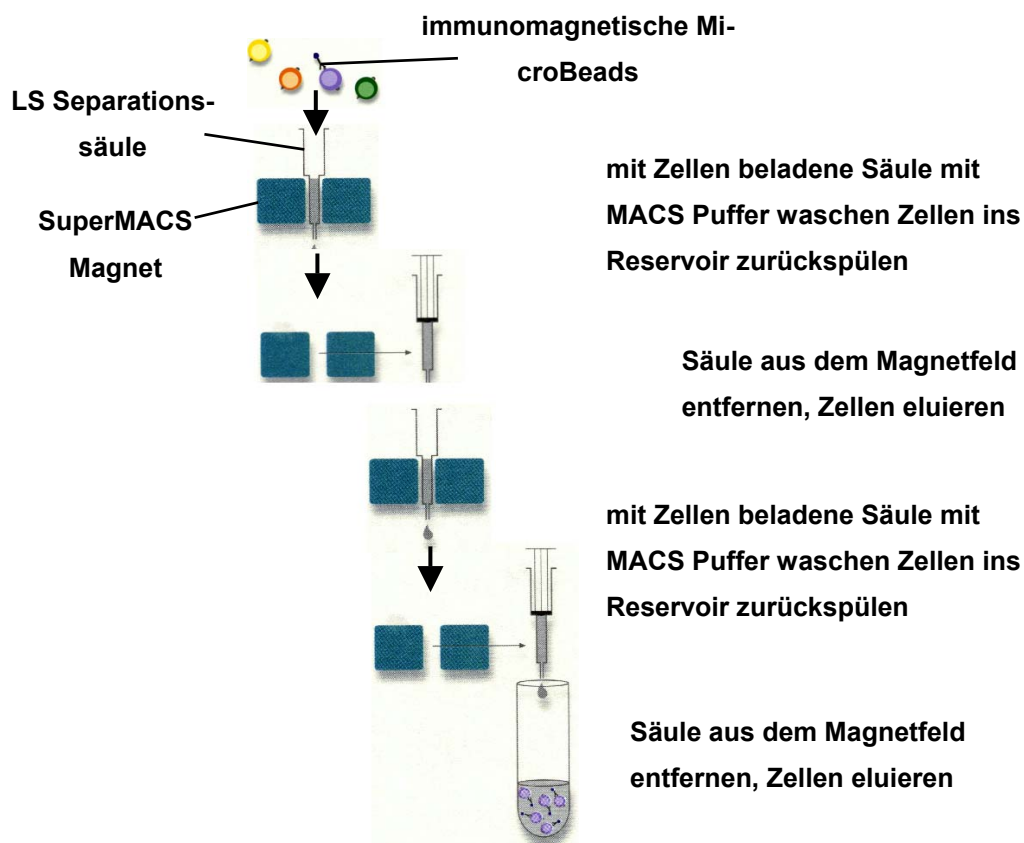


Abb.3.2: Darstellung der magnetischen Zellsortierung mit Hilfe von MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in Anlehnung an das „user manual“. Mit anti-CD33 Antikörpern markierte LPMNZ werden auf eine Separationssäule geladen und in das Feld des SuperMACS Magneten gebracht. Markierte Zellen (Makrophagen) 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 AS Separationssäule gereinigt. Das Makrophageneluat der zweiten Säule wurde zur polyA mRNA-Isolierung (3.2.1) oder in der Durchflusszytometrie (3.9) eingesetzt.

3.1.4 Gewinnung und Kultivierung von Monozyten

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 die Monozyten für die Differenzierungsversuche im Sphäroid-Modell eingesetzt.

Gesunden Spendern zwischen 20 und 40 Jahren wurden mit Hilfe einer Leukapherese Leukozyten aus dem Blut entnommen ²³⁷. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque[®] (Pharmacia, Freiburg) wurden die mononukleären Zellen (MNZ) von den restlichen Leukozyten abgetrennt und dreimal in PBS gewaschen ²³⁸. Die so isolierten MNZ beinhalten Monozyten und Lymphozyten mit geringen Anteilen Thrombozyten und Erythrozyten.

Die Aufreinigung der Monozyten erfolgte durch eine Gegenstromzentrifugation (Elutriation ²³⁹). $1-10 \times 10^9$ 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 (3.9) bestimmt und lag bei 85 - 95%. Aus den so gewonnenen Monozyten wurden *in vitro* Makrophagen generiert (3.1.5), oder sie wurden für Differenzierungsversuche im Sphäroid-Modell eingesetzt.

3.1.5 *in vitro* Generierung von Makrophagen

Makrophagen wurden von Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Regensburg generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Durch Leukapherese und Elutriation (3.1.4) 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 sieben Tage wurden aus den Monozyten Makrophagen generiert²⁴⁰. Makrophagen adhärieren auf hydrophober Teflonfolie nur schwach. Durch Inkubation bei 4 °C für 30 min wurden die Zellen abgelöst. Die Makrophagen wurden für RT-PCR und Taqman-Versuche eingesetzt.

3.1.6 Herstellung von multizellulären Sphäroiden (MZS)

MZS wurden nach dem Protokoll der *liquid overlay* Kultur hergestellt²⁴¹. Zunächst wurde in alle Vertiefungen einer 96-Well Platte jeweils 50 µl 1%ige Agarose pipettiert. Die Agarose musste etwa 20 Minuten abkühlen um auszuhärten. Es wurden 4×10^3 HT-29 Zellen in 200 µl Medium pro Well in die mit Agarose beschichteten Vertiefungen eingebracht. Die Zellen wurden bei 37°C und 10% CO₂ für sieben Tage inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aus den Zellen dreidimensionale kugelige Sphäroide aus und es konnten nun Monozyten dazu gegeben werden.

Die Sphäroide wurden zweimal mit Medium (ohne FCS) gewaschen. Es wurden anschließend wieder 100 µl Medium zu den Sphäroiden gegeben. Desweiteren wurden 4×10^5 frisch elutrierte Monozyten in 100 µl Medium zu jeweils einem Sphäroid gegeben und es erfolgte Inkubation bei 37 °C und 10% CO₂ für 24 h, drei und sieben Tage. Nach der Ernte wurden die Sphäroide in Paraffin oder *TissueTek* eingebettet und bei RT bzw. -80 °C gelagert bis sie für Immunhistochemische Untersuchungen herangezogen wurden.

3.2 RNA-Isolation

3.2.1 polyA mRNA-Isolation

Die Isolation von polyA mRNA aus limitierten Zellmengen (5×10^4 – 5×10^5 Zellen) erfolgte mit dem Dynabeads[®] mRNA DIRECT Kit (Dyna[®], Hamburg). Aus magnetisch sortierten Zellen (Makrophagen, 3.1.3) wurde mit Dynabeads[®] (magnetische Beads an einem (dT)₂₅ Schwanz) polyA mRNA isoliert (Abb.3.3). Die polyA mRNA wurde anschließend in einer RT-PCR eingesetzt.

Bei der Dynabeads[®] polyA mRNA-Isolation wurden magnetsortierte Makrophagen (3.1.3) mit 1 ml *lysis/binding buffer* lysiert. Um die Viskosität des Lysats zu reduzieren, wurden die Zellen wiederholt durch eine 21 gauge Kanüle gedrückt. 250 µl Dynabeads Oligo (dT)₂₅ wurden mit *lysis/binding buffer* gewaschen und mit dem Zelllysate vereint. Die Hybridisierung der Dynabeads Oligo (dT)₂₅ an den polyA Schwanz der mRNA erfolgte unter moderatem Schütteln für drei bis fünf min bei Raumtemperatur. Zur Abtrennung der mRNA wurde das Lysat für zwei min im MPC[®] inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die mRNA zweimal mit 1 ml *washing buffer with LiDS* und einmal mit 1 ml *washing buffer* gewaschen.

Zum Abschmelzen der Dynabeads Oligo (dT)₂₅ wurde die mRNA in 10 µl Elution solution aufgenommen, für zwei min bei 65 °C inkubiert und in den MPC[®] überführt. Der Überstand mit der eluierten mRNA wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Mit dem Dynabeads[®] mRNA DIRECT Kit isolierte mRNA wurde anschließend für RT-PCR oder Taqman-Versuche eingesetzt.

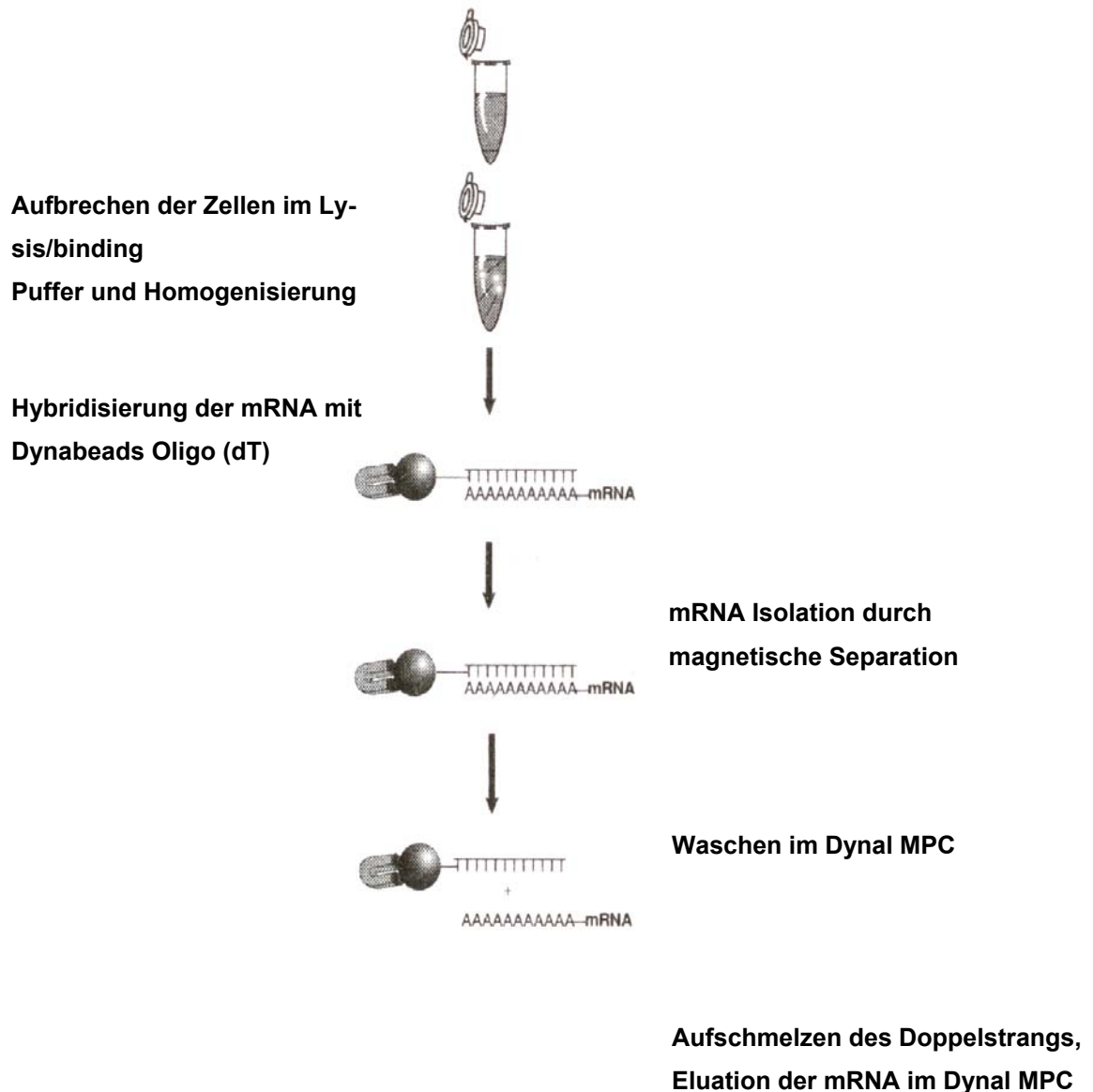


Abb.3.3: Darstellung der polyA mRNA-Isolation mit Hilfe von Dynabeads® (Dynal®, Hamburg) in Anlehnung an das „user manual“.

3.2.2 Gesamt RNA-Isolation

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

Zunächst wurden etwa 8×10^6 Zellen in je 350 µl RLT-Puffer (mit β -Me) aufgenommen und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren lysiert. Die Zelllysate konnten nun bis zur eigentlichen RNA-Isolation bei -80°C gelagert werden.

Um die RNA zu isolieren wurden die Lysate aufgetaut und zur Homogenisation mehrmals durch eine Spritzenkanüle aufgezogen. Anschließend gab man 350 µl 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. Der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen wurden 700 µl Puffer RW1 auf die Säulen gegeben und es wurde nochmals bei 8000 g für 15 Sekunden 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 min 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.

3.3 Gelelektrophorese

3.3.1 DNA-Isolation aus Agarosegel

In Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des QIAEX II Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert und zur Klonierung (3.4) eingesetzt.

Bei der Isolation wurde der relevante Bereich mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Das Gelstück wurde mit 1 ml Puffer QX 1, 10 µl QIAEX II versetzt und bei 50 °C geschmolzen. Anschließend wurde das QIAEX II abzentrifugiert, einmal mit 0,5 ml Puffer QX 1 und zweimal mit 0,5 ml Puffer PE gewaschen. Das QIAEX II Pellet wurde 15 min luftgetrocknet, in 20 µl H₂O resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und zur Klonierung (3.4) eingesetzt.

3.3.2 Diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 12% SDS-PAGE-Gele der Firma Invitrogen verwendet.

Die aufzutragenden Proben wurden mit 6x-Lämmli-Proben-Puffer (120 mM Tris-HCl pH 8,8; 6% SDS; 2% β -ME 50% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) gemischt und fünf min bei 94 °C aufgeköcht. Nach anschließendem Abkühlen, wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für etwa 1,5 h (EI9001-XCELL II™ Mini Cell, Novex, San Diego, CA, USA).

3.4 DNA-Klonierungen

Mit Hilfe der Klonierung wurden DNA-Fragmente in Vektoren (Plasmide) eingefügt. Zur Vervielfältigung wurden Bakterien mit den Plasmiden transformiert. Plasmid-DNA wurde anschließend aus Bakterienkulturen isoliert (3.5).

Die Ligation wurde mit dem TOPO™ TA Cloning®-Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande, 2.2) durchgeführt. Bei der Ligation wurden in einem ultradünnen 0,5 ml PCR Tube 5–20 ng PCR-Produkt und 1 μ l pCR®-TOPO Vektor mit sterilem Wasser auf 5 μ l aufgefüllt und bei Raumtemperatur für fünf min inkubiert. Kompetente Zellen (*One Shot*™) wurden auf Eis aufgetaut und 2 μ l des Ligationsansatzes wurden auf die Zellen überführt und diese für 30 min auf Eis inkubiert. Transformation durch Hitzeschock erfolgte für 30 sec im 42 °C - Wasserbad. Die transformierten Zellen wurden für zwei min auf Eis überführt und anschließend in vorgewärmtem SOC-Medium für 60 min bei 37 °C geschüttelt. 50 und 100 μ l der Zellsuspension wurden auf LB_{Amp}/X-Gal- oder LB_{Kan}/X-Gal-Nährmedium (2.5) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Auswahl resistenter (transformierter) Klone, die das gewünschte PCR-Produkt im Vektor tragen, erfolgte durch blau/weiß-Selektion. Geeignete Klone wurden in fünf ml LB_{Amp} oder Kan_N-Medium (2.5) angeimpft und 14 - 16 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Der Vektor wurde anschließend aus der Bakterienkultur isoliert (3.5). Das Insert wurde sequenziert.

3.5 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien (3.4) wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Bakterien (3 ml Übernachtskultur) wurden in 250 µl *Buffer P1* aufgenommen und mit 250 µl *Buffer P2* versetzt. Nach Zugabe von 350 µl *Buffer N3* wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und die Plasmid-DNA auf das Filtersäulchen übertragen und zentrifugiert. Die an der Matrix verbleibende Plasmid-DNA wurde zweimal mit *Buffer PE* gewaschen, getrocknet und mit 50 µl H₂O eluiert. Das Insert des Vektors wurde zur Kontrolle sequenziert (3.9).

3.6 RT-PCR

Zum Nachweis spezifischer mRNA in intestinalen Makrophagen wurde nach der mRNA-Isolation aus den Zellen (3.3.1) eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Dies geschah mit dem *Reverse Transkription System* von Promega. Pro Probe wurden 9,5 µl der erhaltenen mRNA in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz für die reverse Transkription 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(dTs)	1 µl

Die mRNA wurde zunächst ohne die anderen Komponenten für zehn min 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.

Die erhaltene cDNA wurde auf ihre Integrität mit Hilfe des *Gene Checker™* Kits untersucht. Es wurden dabei fünf Komponenten von drei Haushaltsgenen he-

rangezogen: Aktin 5', Aktin 3', Clathrin 2K, Clathrin 6K und GAPDH. Der PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

HotStartTaq [®] Master Mix Kit (Qiagen)	10 µl
Primer forward	2 µl
Primer reverse	2 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	5 µl

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

15 min	95°C	
30 Sek	95°C	} 35-40x
30 Sek	55°C	
1 min	72°C	
10 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:

GAPDH: 540 bp
5' Aktin: 1000 bp
3'Aktin: 720 bp
Clathrin 6K: 570 bp
Clathrin 2K: 550 bp

Zum Nachweis der cDNA von Gp96 wurde folgende PCR mit folgendem Programm angesetzt:

HotStartTaq [®] Master Mix Kit (Qiagen)	10 µl
Primer forward	2 µl
Primer reverse	2 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	5 µl

Programm:	15 min	95 °C	
	30 Sek	95 °C	} 35-40x
	30 Sek	62 °C	
	1 min	72 °C	
	10 min	72 °C	
		4 °C	

Auch diese PCR-Ansätze wurden zur Kontrolle vollständig auf ein 1,2%iges Agarose-Gel (Invitrogen) aufgetragen und unter UV-Licht fotografiert. Die Größe des amplifizierten DNA-Stücks betrug 670 bp.

3.7 Real-Time-PCR (Taqman[®])

Die Gp96- und TANK-DNA-Fragmente wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert (2.4.2). Innerhalb der Primer lag der Bindebereich einer genspezifischen Sonde, die an ihrem 5' Ende kovalent an einen Reporter-Farbstoff gebunden war: Für Gp96 und TANK 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 (Erbersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Primer für GAPDH

wurden durch die Firma PE Applied Biosystems hergestellt. Der Taqman-Mix wurde 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-Mix	10 µl
Primer for (18 µM)	1 µl
Primer rev (18 µM)	1 µl
Sonde (5 µM)	1 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	6 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:

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

Das Prinzip des Taqman[®] ist Folgendes (Abb.3.4): Die beiden Primer und die dazwischenliegende Sonde binden spezifisch an einen DNA-Abschnitt der cDNA. Der 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.

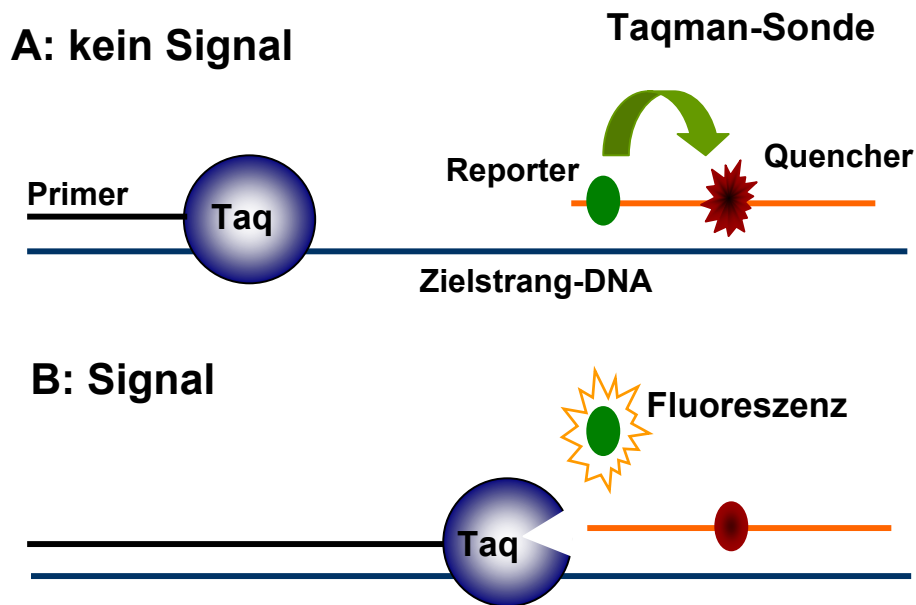


Abb.3.4: Das Taqman-Prinzip. Durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der Polymerase wird der Quencher räumlich vom Farbstoff getrennt, die Fluoreszenz des Reporters wird messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an.

3.7.1 Datenanalyse

Die während der 40 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.

3.8 Sequenzierung und Sequenzvergleich

Insert-DNA von Vektoren transformierter Bakterien (3.4) wurde sequenziert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierarbeiten wurden von der Firma Geneart (Regensburg, Deutschland) durchgeführt.

Die erhaltene Basenfolge wurden mit den Sequenzen bekannter Klone verglichen. Die Adresse im *world wide web* zum Zugriff auf Nukleinsäuresequenzen und Proteinsequenzen in der *Nucleotide Sequence Bank* des *Entrez* Browser des National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA) ist: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>.

3.9 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/sec) 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.3.5 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 Strahlenangang 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 5 [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.

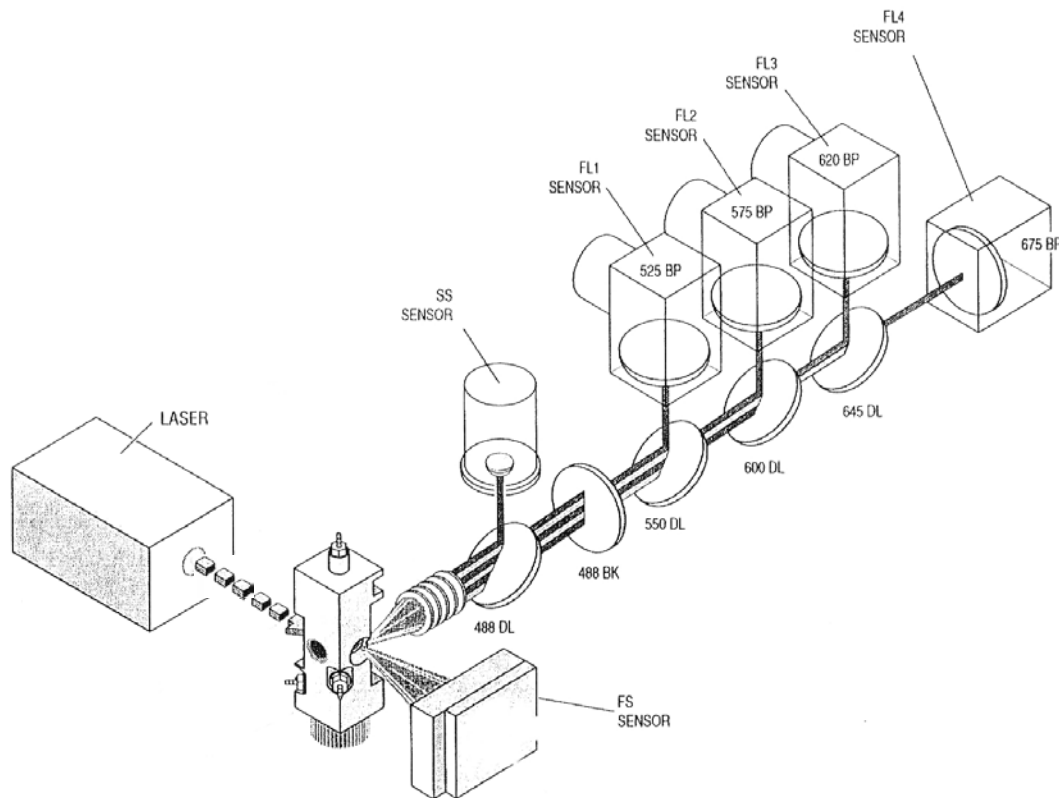


Abb.3.5: Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter® EPICS® XL-MCL™ in Anlehnung an das „user manual“ von Coulter, Immunotech (Krefeld). Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Sensormessbereich in nm (BP).

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 1:500-Verdünnung Ziegen Serum für 30 min auf Eis. Die Makrophagen wurden anschließend auf zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße 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 entweder sofort gemessen oder sie wurden in einer 2%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert und zu einem späteren Zeitpunkt gemessen.

Des Weiteren erfolgte eine Durchflusszytometrische Untersuchung der CD4⁺ CD62L⁺ Zellen, die für das Transfer-Kolitis-Maus-Modell isoliert wurden. Untersucht wurde die Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8, MHC Klasse II, CD45R, CD45RB, CD62L, CD25 und CD103. Die Markierung erfolgte mit jeweils 10 µg/ml Antikörper für 30 min auf Eis.

3.10 Quantitative Messung von Protein

3.10.1 Proteingehaltsbestimmung

Bei der Proteingehaltsbestimmung 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.

3.10.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA, Endogen, Biozol, Eching bei München) wurde $\text{IFN-}\gamma$ aus Überständen der Lymphknotenzellkultur und der CD4^+ CD62L^+ Zellkultur quantitativ erfasst.

Bei der Messung wurde in jede Vertiefung einer 96 well Platte 50 μl der Probe in Duplikaten vorgelegt. Die Platte wurde bei RT für zwei h inkubiert. In jede Vertiefung wurden 50 μl des biotinylierten Antikörper Reagenz gegeben und es wurde gut gemischt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für eine h bei RT. Die Platte wurde anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zu jeder Probe wurden 100 μl der Streptavidin-HRP-Lösung gegeben und die Platte wurde für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 μl der TMB-Substrat-Lösung zugegeben und es erfolgte eine weitere 30 minütige Inkubation bei RT. Die Reaktion wurde mit 100 μl *stop-solution* abgebrochen. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend mit einem Absorptionsspektrometer (ELISA-Reader, Emax precision

microplate reader, Molecular Devices Corp.) bei 450 nm vermessen. Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software *Softmax for Windows* (Version 2.35) durchgeführt.

3.10.3 Luminex®

Die Zytokine IL-4, 6, 10, 12, 13 und TNF α wurden mittels der Luminex®-Technologie in Zellkulturüberständen ermittelt. Dazu wurde der *Beadlyte® Mouse Multi-Cytokine Flex* Kit der Firma Upstate (Vertrieb über Biomol, Hamburg) verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Protokolls B folgendermaßen:

Jeweils 50 μ l Probe bzw. 50 μ l der Standardverdünnungen werden in jeweils eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Dazu werden je 25 μ l der Beadsolution gegeben und es erfolgt Inkubation bei 4 °C über Nacht. Die Platte wird einmal mit *Assay-Buffer* gewaschen, anschließend werden 75 μ l *Assay-Buffer* in jede Vertiefung pipetiert. Des Weiteren werden 25 μ l *Reporter-Solution* in jede Vertiefung gegeben und es erfolgt eine 1,5 stündige Inkubation bei RT im Dunkeln. Nach Zugabe von jeweils 25 μ l Streptavidin-Phycoerythrin-*Solution* und einer weiteren Inkubation für 30 min bei RT, ebenfalls im Dunkeln, werden in jede Vertiefung 25 μ l der *stop-solution* pipetiert. Die Inkubation erfolgt für fünf min im Dunkeln bei RT. Nachdem die Überstände abgesaugt und jeweils 125 μ l Assay-Buffer in die Vertiefungen pipettiert wurde, erfolgt die Messung der Proben im Luminex® 100™.

3.10.4 Western Blot

Zunächst wurden die, durch die Gelelektrophorese aufgetrennten, Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgte in einem Halbtrocken-Transferapparat (Biometra Fastblott B44, Biometra, Göttingen) mit 1,5 mA/cm² für 1,5 h. Die Membran konnte nun trocken gelagert werden oder gleich für einen Protein-Nachweis verwendet werden. Dazu wurde die Membran für eine h mit PBS / 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Der erste Antikörper wurde daraufhin in einer Konzentration von 4 μ g/ml (anti-

TANK, MBL) direkt in die Blockierlösung gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer (PBS / 0,2% Tween 100) gewaschen, und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (anti-Rabbit, Amersham) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS / 5% Magermilchpulver zugegeben. Die Inkubation erfolgte eine h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die eigentliche Nachweisreaktion mit dem ECL-Reagenz.

3.11 Immunhistochemische Färbemethoden

Zum Nachweis der Expression zellulärer Oberflächenmarker und intrazellulärer Chemokine und Enzyme wurden Dünnschnitte von intestinaler Mukosa von Patienten mit oder ohne chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. 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® NovaRed™ (Linaris) ergab einen roten Farbton. Die Färbung mit dem Reagenz Benzidin Dihydrochlorid (BDHC) und Natrium-Nitroprussid ergab einen blauen Farbton.

Für den immunhistochemischen Nachweis gewebespezifischer Antigene wurden fünf µm dicke Schnitte der gesamten Darmschleimhaut bei -25°C im Kryotom angefertigt und auf unbeschichtete Objektträger überführt. Die Schnitte wurden für zehn min luftgetrocknet und anschließend für vier min in eiskaltem Aceton fixiert. Die Objektträger wurden kurz in PBS gespült und die Schnitte anschließend bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die immunhistochemische Färbung erfolgte direkt im Anschluss.

Alle folgenden Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die Aktivität der endogenen Peroxidasen der Zellen im Gewebeschnitt zu senken wurde der Objektträger für 30 min in 0,3%iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte dreimal für fünf min in 1x PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte in 1% BSA/PBS Blockierlösung für eine h inkubiert. Der gewebespezifische Primär-Antikörper wurde in 1%iger

BSA/PBS Lösung verdünnt. 100 µl Primär-Antikörperlösung wurden auf den Gewebeschnitt pipettiert und für eine h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Antikörper-Isotypenkontrolle. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal für fünf min in 1x PBS gewaschen.

Das Gewebe wurde anschließend mit einem biotinylierten Zweitantikörper, der gegen den gewebespezifischen Primär-Antikörper gerichtet war, in 1%iger BSA/PBS Lösung für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal für fünf min in 1x PBS gewaschen und mit 100 µl der vorbereiteten Streptavidin-Peroxidase-Lösung (ABC-Kit, Vector) weitere 30 min inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte 3dreimal für fünf min in 1x PBS gewaschen.

Anschließend wurde das Gewebe mit 100 µl Peroxidase-Substratlösung versetzt und unter visueller Kontrolle bei RT inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität positiv gefärbter Zellen wurden die Objektträger fünf bis zehn min mit PBS gespült, um die Färbereaktion abzustoppen. Für die BDHC-Färbung wurden die Gewebeschnitte mit einer Lösung aus 0,01% BDHC und 0,03% Natrium-Nitroprussid für acht min vorbehandelt und anschließend mit einer Peroxidase-Substratlösung aus 0,01% BDHC, 0,005% H₂O₂ und 0,03% Natrium-Nitroprussid behandelt und nach Erreichen der gewünschten Farbintensität positiv gefärbter Zellen mit Wasser gespült.

Um Bestandteile des nicht gefärbten Gewebes sichtbar zu machen, wurden *Vector[®] NovaRedTM* gefärbte Gewebeschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt, um Zellkerne blau zu färben. Dazu wurden die Objektträger wenige Sekunden in eine Hämatoxylinlösung getaucht und anschließend 15 min in heißem Leitungswasser gespült bis sich keine Farbpartikel mehr vom Schnitt lösten. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem wässrigen Eindeckelmedium (biomeda, Foster City, CA, USA) und einem Deckgläschen versiegelt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Bei Doppelfärbungen wurde keine Gegenfärbung durchgeführt, da sonst die spezifische Rot- oder Blau-Färbung nicht mehr zu erkennen war. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

Für die Immunfluoreszenz wurden alle Gewebe in 4% Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte entwacht und

in einem Wasserbad bei 70 °C für 40 min in einer 0,1%igen Natriumcitrat vorbehandelt. Es folgte ein Blockierschritt mit 20% Ziegenserum für 20 min bei RT und die Inkubation einer 1:100-Verdünnung beider Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Die Schnitte wurden anschließend in PBS gewaschen und für eine h bei 37 °C mit 1:200 Verdünnungen der Sekundärantikörper im Dunkeln inkubiert. Dabei war der anti-Ratte Antikörper an *texas red*, der anti-Maus Antikörper an FITC gekoppelt. Die Schnitte wurden abermals gewaschen und mit *Vectashield Mounting medium* mit 1,5 µg / ml DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Ontario, Canada) eingedeckelt. Die Mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Leitz DMRXE Mikroskop. Die Vergrößerungen werden bei den jeweiligen Abbildungen angegeben.

3.12 CD4⁺ CD62L⁺ Transfer-Kolitis-Modell

Bei diesem Kolitis-Modell wird eine Untergruppe der Milzzellen aus Balb/c Spender-tieren in eine Scid-Maus transferiert. Als Marker für naive CD4 positive T-Zellen wurde dabei CD62L gewählt. Scid-Mäuse besitzen weder T- noch B-Zellen, so dass es durch den Transfer dieser Zellen zu einer teilweisen Rekonstitution des Immunsystems kommt. Das CD4⁺ CD62L⁺ Transfer-Kolitis-Modell ist dem CD4⁺CD45RB^{high}-Transfer-Modell abgeleitet²⁴².

Einer gesunden ggf. vorbehandelten Balb/c Spendermaus wird die Milz entnommen. Die Milz wird mit dem Stempel einer Spritze in Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS, P/S, β-Me) zermahlen. Durch Filtern der entstandenen Suspension durch einen 70µm Filter wird eine Einzelzellsuspension hergestellt. Es erfolgt ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 1600 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Zell-pellet wird zur Lyse der Erythrozyten in 20 ml 1xACK-Puffer (Ammonium-Chlorid-Kalium-Puffer) resuspendiert und für zehn min auf Eis inkubiert. Es erfolgt eine langsame Neutralisierung mit 20 ml Medium und anschließende Zentrifugation für zehn min bei 1600 rpm. Die Zellen werden anschließend in fünf ml Waschpuffer (PBS mit 0,5% BSA, 0,01 M EDTA) resuspendiert und gezählt.

Es folgt Inkubation der ersten Antikörper. Auf 1×10^7 Zellen werden 5 µg jedes Antikörpers (CD45R, CD11b, CD8, MHC II) pipetiert und 30 min bei 4 °C auf einem

Rotor inkubiert. Die Zellen werden anschließend zweimal mit Waschpuffer gewaschen und wieder in fünf ml des Waschpuffers resuspendiert.

Es folgt die Inkubation mit *goat anti-rat-Bead*-Antikörpern. Auf 10^7 Zellen werden 20 µl des AK gegeben und für 15 min bei 4 °C auf einem Rotor inkubiert. Die Zellen werden anschließend einmal mit Waschpuffer gewaschen und in einem ml Waschpuffer resuspendiert.

Die Zellseparation erfolgt im Auto-Macs mit dem Programm DepleteS. Dabei handelt es sich um eine Negativselektion, d.h., die Negativzellfraktion enthält die $CD4^+$ -Zellen. Nach der Separation werden die Zellen gezählt, und es erfolgt die zweite Inkubation mit Macs-Bead-Antikörpern. Auf 10^7 Zellen werden nun 10 µl anti-CD62L-Bead Antikörper pipettiert und es erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei 4 °C auf einem Rotor. Anschließend werden die Zellen einmal mit Waschpuffer gewaschen und in einem ml Waschpuffer resuspendiert.

Die zweite Zellseparation erfolgt im Auto-Macs mit dem Programm PosselS. Hierbei handelt es sich um eine Positivselektion, so dass die Positivfraktion die $CD62L^+$ -Zellen enthält.

Die $CD4^+ CD62L^+$ Zellen werden zweimal mit Waschpuffer gewaschen, gezählt und die Zellzahl wird auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Als Empfängertiere dienen CB17 Scid-Mäuse im Alter von 4 - 6 Wochen. Pro Tier werden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 100 µl transferiert. Die Zellen werden *intraperitoneal* appliziert.

Die gesamte Zellpopulation wird mittels FACS-Analyse überprüft. Die restlichen Zellen werden zum einen in einem Stimulations-Assay mit und ohne anti-CD3 stimuliert (3.11.2), der Rest wird in 350 µl RLT-Puffer für die Isolation von RNA lysiert und bei -80 °C weggefroren.

Das Gewicht der Tiere wird einmal wöchentlich kontrolliert. Gegebenenfalls werden die Tiere nach dem Transfer mit Gp96, peptidbeladenem Gp96 (Gp96/Pep) oder denaturiertem Gp96 (GP96/denat.) behandelt. Die Behandlung erfolgt dabei am Tag 1, eine, zwei und drei Wochen nach Transfer. Es werden jeweils 100 µg Protein in 100 µl PBS *sub cutan* in den Nacken verabreicht. Das Gp96 und die Peptide wurden von der Firma Immatics Biotechnologies (Tübingen) hergestellt. Die Beladung von Gp96 wurde ebenfalls durch Immatics Biotechnologies vorgenommen. Die Substanzen waren endotoxinfrei. Nach 6 - 8 Wochen entwickeln die Tiere eine chronische Kolitis und der Versuch wird durch Tötung der Tiere beendet.

Den Tieren wird der Darm entnommen und für histologische Untersuchungen und Immunhistochemie präpariert. Des Weiteren werden die mesenterialen Lymphknoten entnommen, um mit ihnen eine Lymphknotenzellstimulation durchzuführen (3.11.1).

3.12.1 Stimulation mesenterialer Lymphknotenzellen

Einen oder mehrere Tage vor der geplanten Zellstimulation müssen die benötigten Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit anti-CD3 Antikörpern beschichtet werden. Dazu werden in jedes Loch 100 µl einer mit 2,5 µg/ml konzentrierten anti CD3-AK-Lösung pipettiert werden. Die Platten werden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die mesenterialen Lymphknoten einer Gruppe von Tieren werden in Medium (RPMI, 10% FCS, P/S, β-Me) gesammelt und mit einem Spritzenstempel zerdrückt. Die Zellsuspension wird anschließend durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert um eine Einzellsuspension herzustellen. Es erfolgt Zentrifugation bei 1600 rpm für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden nochmals in Medium gewaschen. Inzwischen wird die mit anti-CD3 beschichtete 96-Well-Platte gewaschen. Dazu wird die AK-Lösung steril abgesaugt, es werden 100 µl PBS in die Vertiefungen pipettiert und erneut abgesaugt. Nach der Zentrifugation werden die Zellen gezählt. Die Zellzahl wird auf 1×10^5 Zellen/100 µl eingestellt und es werden 2×10^5 Zellen pro Vertiefung eingesät. Dabei werden die Zellen, die mit anti-CD3 stimuliert werden, in Medium mit 50U/ml IL-2 aufgenommen. Die Zellen, die nicht mit anti-CD3 stimuliert werden, werden in Medium ohne IL-2 aufgenommen.

Für jede Gruppe werden 8 Wells mit anti CD3 stimuliert und 8 Wells werden ohne Stimulation für 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird der Überstand abgenommen und in einer neuen 96-Well-Platte bei -20 °C bis zur Zytokinbestimmung (3.9) weggefroren.

3.12.2 Stimulation von CD4⁺ CD62L⁺-Zellen

Die Stimulation der CD4⁺ CD62L⁺ Zellen erfolgt analog der Lymphknoten-zellstimulation. Der Unterschied besteht darin, dass die mit anti-CD3 zu stimulierenden Zellen ohne IL-2 stimuliert werden. Die Stimulation erfolgt ebenfalls 24 h bei 37 °C. Der Überstand wird danach abgenommen und bei -20 °C bis zur Zytokinbestimmung weggefroren.

3.13 Generierung einer konditionellen Gp96-knock-out-Maus

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Targetingvektor für eine konditionelle Gp96-knock-out-Maus kloniert werden. Die Strategie für das Targeting und die Klonierung des Vektors wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Hehlhans aus der Abteilung für Pathologie der Universität Regensburg entwickelt.

Das Gp96-Gen der Maus besteht aus 18 Exons und erstreckt sich über einen Bereich von etwa 15 kb (Abb.3.6). Um einen erfolgreichen knock-out zu erzielen, sollte ein möglichst großer Bereich des Gens aus dem Genom der Maus entfernt werden. Dabei durfte das Gen durch die Klonierung und die anschließende homologe Rekombination aber nicht zerstört werden, da bekannt war, dass eine konventionelle knock-out-Maus am 5. Tag der Embryonalentwicklung stirbt²⁴³. Erst durch die weitere Kreuzung der genetisch veränderten Maus mit einer die *cre*-Rekombinase in bestimmten Geweben exprimierenden Maus, sollte das Gp96-Gen im Gewebe ausgeschaltet werden. Das Targeting diente also dazu, zwei *cre*-Rekombinase-Stellen an geeigneten und genau definierten Stellen in das Maus-Genom einzubringen. Zur Selektion der embryonalen Stammzellen (ES)-Zellen auf erfolgreiche homologe Rekombination wurde eine Neomycin-Resistenz-Kassette in ein Intron des Gens eingefügt, wobei diese Resistenz nach der Selektion wieder entfernt werden musste, um die Gp96-Expression in der Maus nicht zu beeinflussen. Daher sollte das Neomycin-Gen von *frt*-Stellen flankiert sein, die einer Flippase als Angriffstellen für eine Entfernung des Gens aus dem Genom dienen würden (Abb.3.6).

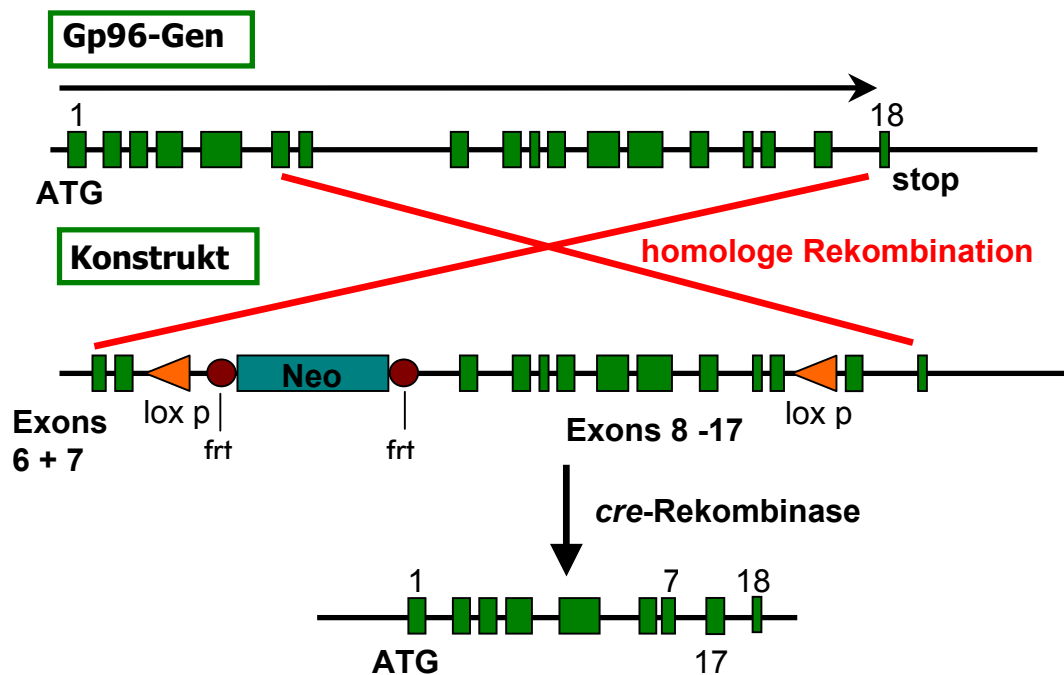


Abb.3.6: Targetingstrategie für eine konditionelle *Gp96*-knock-out-Maus

Um den Targeting-Vektor zu klonieren, mussten zunächst drei Teile des Maus-*Gp96*-Gens per PCR amplifiziert werden. Die Teile werden im Folgenden als Fragment I, II und III bezeichnet. Fragment I beginnt nach Exon 18 und erstreckt sich bis zwischen Exons 14 und 13 (2975 bp), direkt daran schließt sich Fragment II an, welches sich bis nach Exon 8 erstreckt (3346 bp) und Fragment III beginnt zwischen Exon 8 und 7 und überspannt die Exons 7 und 6 (1722 bp) (Abb.3.7). Die Fragmente I und II sollten später zu einem großen Stück zusammenkloniert werden, welches sich wegen seiner Gesamtgröße von über 6 kb per PCR schwer direkt amplifizieren lassen würde. Zwischen dieses große Teilstück und dem Fragment III wird die *frt*-flankierte Neomycin-Resistenz einkloniert (Abb.3.6). An die Fragmente wurden durch die Primer geeignete Restriktionsschnittstellen angefügt (Abb.3.7)

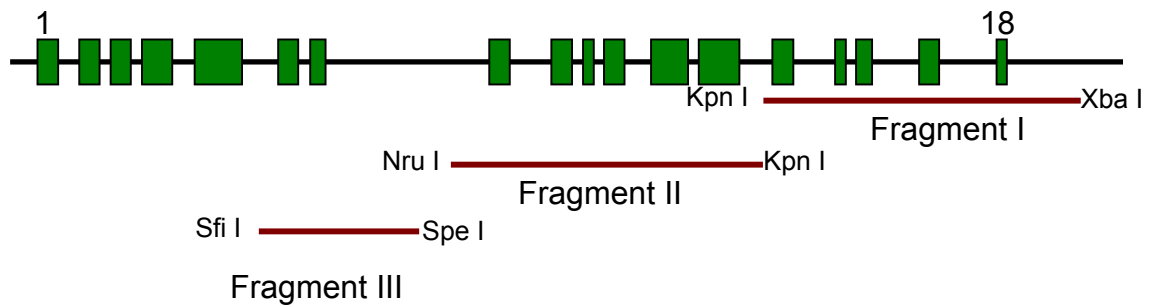


Abb.3.7: Darstellung der Position der drei PCR-Fragmente für die konditionelle Gp96-knock-out-Maus

Die Primersequenzen für die im Folgenden dargestellten PCR-Reaktionen sind unter 2.4.3 zusammengefasst. Folgende PCR-Bedingungen wurden zur Amplifikation der einzelnen Fragmente verwendet:

<u>Fragment I:</u>	2 µl	ES-Zell-DNA (200 ng)
	0,5 µl	Herkulase (Stratagene [®] , La Jolla, CA, USA)
	2 µl	DMSO (Endkonzentration 4%)
	2,5 µl	Primer MH up (5 µM)
	2,5 µl	Primer MH do (5 µM)
	1 µl	dNTPs (10 mM)
	5 µl	10x Puffer
	34,5 µl	H ₂ O
	10 min	94 °C
	1 min	94 °C
	1 min	50 °C
	4 min	72 °C
		} 40x
	10 min	72 °C

Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Von dem Rest wurde eine 1:1000-Verdünnung hergestellt und es wurde eine

nested-PCR mit den endgültigen, die Restriktionsschnittstellen enthaltenden Primern, durchgeführt.

2 µl	PCR 1:1000 verdünnt
0,5 µl	Herkulase (Stratagene [®] , La Jolla, CA, USA)
2 µl	DMSO (Endkonzentration 4%)
2,5 µl	Primer k.o. Xba fl (5 µM)
2,5 µl	Primer k.o. kpn rl (5 µM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
5 µl	10x Puffer
34,5 µl	H ₂ O
10 min	94 °C
1 min	94 °C
1 min	50 °C
4 min	72 °C
} 25x	
10 min	72 °C

Das erhaltene PCR-Produkt von etwa 3 kb wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel kontrolliert und mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

Um anschließend ein Topo-TA-Cloning durchführen zu können, wurden an das PCR-Fragment A-Nucleotide mit einer Taq-Polymerase (MBI-Fermentas) angehängt.

1,2 µl	MgCl ₂ (1,5 mM)
1 µl	Taq-Polymerase
2 µl	10x Puffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
9 µl	PCR-Fragment I
5,8 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde 30 min bei 72 °C inkubiert, anschließend erfolgte die Klonierung in den Vektor des Topo-XL-Cloning Kits von Invitrogen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.5 und 3.6 dargestellt.

<u>Fragment II:</u>	1 µl	ES-Zell-DNA
	2,5 µl	Primer k.o. kpn fII (2 µM)
	2,5 µl	Primer k.o. nru rII (2 µM)
	1 µl	dNTPs (10 mM)
	5 µl	10x Puffer
	0,5 µl	Herkulase (Stratagene [®] , La Jolla, CA, USA)
	37,5 µl	H ₂ O
	2 min	94 °C
	30 sek	92 °C
	30 sek	60 °C
	3,5 min	72 °C
		} 35x
	10 min	72 °C

Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und mittels des QIAEX II Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert. Anschließend erfolgte die Klonierung in den ZeroBlunt TOPO-Vektor (Invitrogen) nach Anleitung (siehe 3.5). Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.5 und 3.6 dargestellt.

<u>Fragment III:</u>	1 µl	ES-Zell-DNA
	2,5 µl	Primer k.o. xho fIII (2 µM)
	2,5 µl	Primer k.o. sfi rIII (2 µM)
	1 µl	dNTPs (10 mM)
	5 µl	10x Puffer
	0,5 µl	Herkulase (Stratagene [®] , La Jolla, CA, USA)
	37,5 µl	H ₂ O

2 min	94 °C	
30 sek	92 °C	} 30x
30 sek	50 °C	
3,5 min	72 °C	
10 min	72 °C	

Da nach dieser PCR die Ausbeute noch sehr gering war, wurde 1 µl der PCR in einer erneuten PCR unter den gleichen Bedingungen nochmals amplifiziert. Die Bande von etwa 1700 bp Größe wurde aus einem 0,8%igen Agarose-Gel eluiert. Um anschließend ein Topo-TA-Cloning durchführen zu können, wurden an das PCR-Fragment A-Nucleotide mit einer Taq-Polymerase (MBI-Fermentas) angehängt.

1,2 µl	MgCl ₂ (1,5 mM)
1 µl	Taq-Polymerase
2 µl	10x Puffer
1µl	dNTPs (10 mM)
14,8 µl	PCR-Fragment III

Der Ansatz wurde 30 min bei 72 °C inkubiert und anschließend erfolgte die Klonierung in den Vektor des Topo-XL-Cloning Kits von Invitrogen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 3.5 und 3.6 dargestellt.

Neomycin-Resistenz-Kassette:

Die Neomycin-Resistenz-Kassette war in einem Vektor enthalten, den wir von Prof. Dr. Thomas Hehlhans aus der Pathologie erhalten hatten. Um die für unsere Klonierungsstrategie passenden Restriktionsschnittstellen zu erhalten, wurde die Resistenz durch PCR mit Primern, an denen die Schnittstellen Sal I und Xho I angefügt waren, amplifiziert.

0,5 µg	Vektor
1 µl	Primer lox frt neo frt f (2 µM)
1 µl	Primer lox frt neo frt r (2 µM)
5 µl	10x Puffer
10 µl	Taq-Polymerase-Mix (Qiagen)
7 µl	H ₂ O

15 min	94 °C	
30 sek	94 °C	} 35x
30 sek	50 °C	
2,5 min	72 °C	
10 min	72 °C	

Die erhaltene Bande wurde aus einem 1%igen Agarose-Gel eluiert, in den pCR[®] II–TOPO -Vektor kloniert und anschließend sequenziert (3.5 und 3.6).

lox p-Element:

Das lox p-Element wurde aus einem durch Prof. Dr. Thomas Hehlhans zur Verfügung gestellten Vektor per PCR gewonnen. Dabei wurden durch die PCR geeignete Restriktionsschnittstellen (Sal I) zur Klonierung angefügt.

Der Vektor hatte eine Konzentration von 1,2 µg/µl und wurde für die PCR 1:100.000 verdünnt.

1 µl	Vektor
1 µl	Primer lox p for (5 µM)
1 µl	Primer lox p rev (5 µM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
5 µl	10x Puffer
0,5 µl	Herkulase (Stratagene [®] , La Jolla, CA, USA)
40,5 µl	H ₂ O

2 min	94 °C	
30 sek	92 °C	} 30x
30 sek	55 °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	

Die erhaltene Bande wurde aus einem 1%igen Agarose-Gel eluiert, in den pCR[®] II-TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert (3.5 und 3.6).

Nachdem alle Fragmente, die Neomycin-Resistenz und das lox p-Element amplifiziert und kloniert waren, sollten die Komponenten in folgender Reihenfolge in den pSL301-Vektor einkloniert werden (Abb.3.8):

1. Klonierung von Fragment III mit Sfi I und Xho I
2. Klonierung der *frt*-flankierten Neomycin-Resistenz mit Xho I und Sal I
3. Klonierung von Fragment II mit Nru I und Kpn I
4. Klonierung von Fragment I mit Kpn I und Xba I
5. Klonierung des lox p Elements in Fr I mit XhoI bzw. Sal I

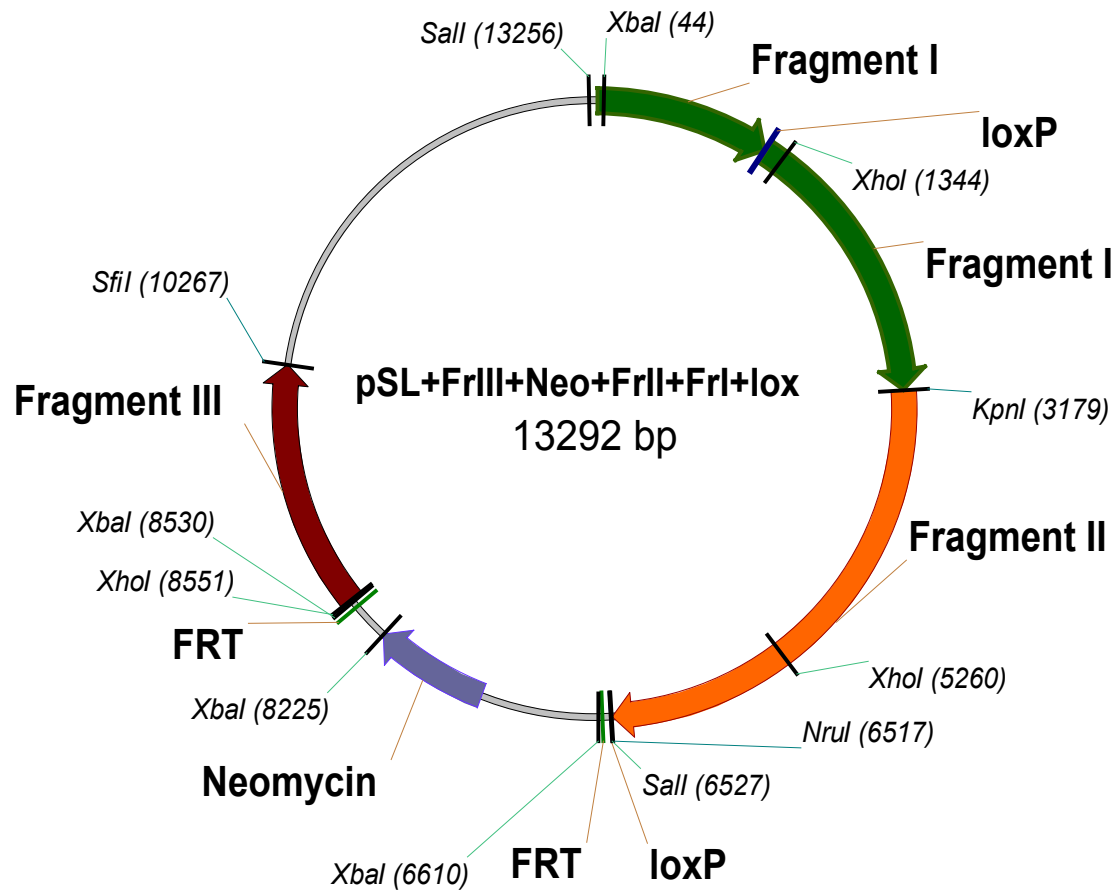


Abb.3.8: Targeting-Vektor für die konditionelle Gp96-knock-out-Maus

4 Ergebnisse

4.1 Aufreinigung intestinaler humaner Makrophagen

Im Intestinum ausdifferenzierte Makrophagen besitzen einen spezifischen Phänotyp, der in dieser Form in keinem anderen Organ des Menschen beschrieben wurde (1.2.2).

Die typischen Oberflächenantigene der Monozyten finden sich gerade nicht auf intestinalen Makrophagen (1.2.2). Studien über den Phänotyp und die Funktion intestinaler Makrophagen wurden in unserer Arbeitsgruppe zwar vorangetrieben^{18, 17, 19}, aber dennoch konnten noch nicht alle wichtigen Zusammenhänge eindeutig geklärt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, intestinale Makrophagen aus nicht entzündlichen und entzündlichen Geweben funktionell besser zu charakterisieren. Die Aufreinigung intestinaler Makrophagen wurde in der Arbeitsgruppe bereits vor einiger Zeit etabliert²⁴⁴, dennoch sollte die Aufreinigung nach dem etablierten Protokoll nachvollzogen, und die Reinheit der intestinalen Makrophagen per Durchflusszytometrie untersucht werden, da für Expressionsuntersuchungen in dieser Arbeit mRNA einer reinen Makrophagenpopulation benötigt wurde.

Die Aufreinigung der intestinalen Makrophagen erfolgte mit Hilfe eines gegen das Oberflächenantigen CD33 gerichteten, mit magnetischen Beads gekoppelten Antikörpers. Der Nachweis der Reinheit und Spezifität erfolgte mit einem PE-gekoppelten AK, der gegen den Bead-gekoppelten Antikörper gerichtet war. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, war bei zwei aufeinander folgenden Separationsschritten die Aufreinigung einer zu 90% reinen CD33-positiven Makrophagenpopulation möglich.

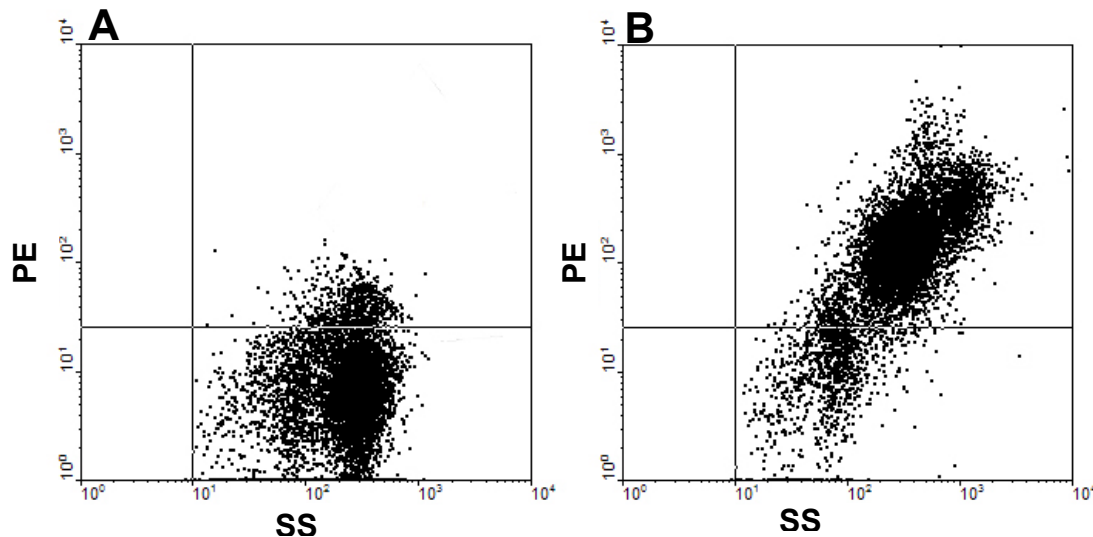


Abb. 4.1: Aufreinigung von intestinalen Makrophagen durch anti-CD33 MicroBeads. Seitwärtsstreulicht (SS) und R-Phycoerythrin (PE). CD33 positive Zellen waren nach zwei Isolationschritten auf ca. 90% angereichert (B). Die Isotyp-Kontrolle zeigte keine unspezifische Färbung (A).

4.2 Microarray, RT-PCR und *real-time-PCR* für Gp96

Um differenzierungsspezifische Gene für intestinale Makrophagen zu identifizieren wurden im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe subtraktive Hybridisierungsversuche durchgeführt. Dabei wurde cDNA von *in vitro* differenzierten Makrophagen von Makrophagen-cDNA nicht entzündeter Patienten subtrahiert. Es zeigte sich, dass fünf von 76 erhaltenen Klonen >99% Homologie zur mRNA von Gp96 aufwiesen (Referenz-Sequenz bei NCBI: X15187). Dies ließ den Schluss zu, dass Gp96 bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert wird und der Grundstein zu der vorliegenden Arbeit wurde gelegt.

4.2.1 Affymetrix GeneChip® Analysen

Um die Daten der Subtraktiven Hybridisierung zu bestätigen, wurden Affymetrix GeneChip® Analysen am Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik in Regensburg durchgeführt. Die mRNA von drei nicht entzündeten Patienten und drei Spendern für *in vitro* differenzierte Makrophagen wurde gepoolt um mögliche individuelle Unter-

schiede in der Expression auszuschließen. Die jeweilige mRNA wurde auf jeweils zwei Chips hybridisiert. Für beide auf dem Chip enthaltenen Gp96-*probe sets* war die mRNA-Expression in intestinalen Makrophagen signifikant höher als die Expression in *in vitro* differenzierten Makrophagen. Für jedes *probe set* wurde der Durchschnitt der beiden Chips ermittelt. Für das eine *probe set* war die Expression in intestinalen Makrophagen dreimal höher, für das zweite *probe set* war die Expression 11 mal höher als in *in vitro* differenzierten Makrophagen (Abb. 4.2). Im Durchschnitt liegt die Expression in intestinalen Makrophagen etwa siebenmal höher als in *in vitro* differenzierten Makrophagen. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des t-Tests.

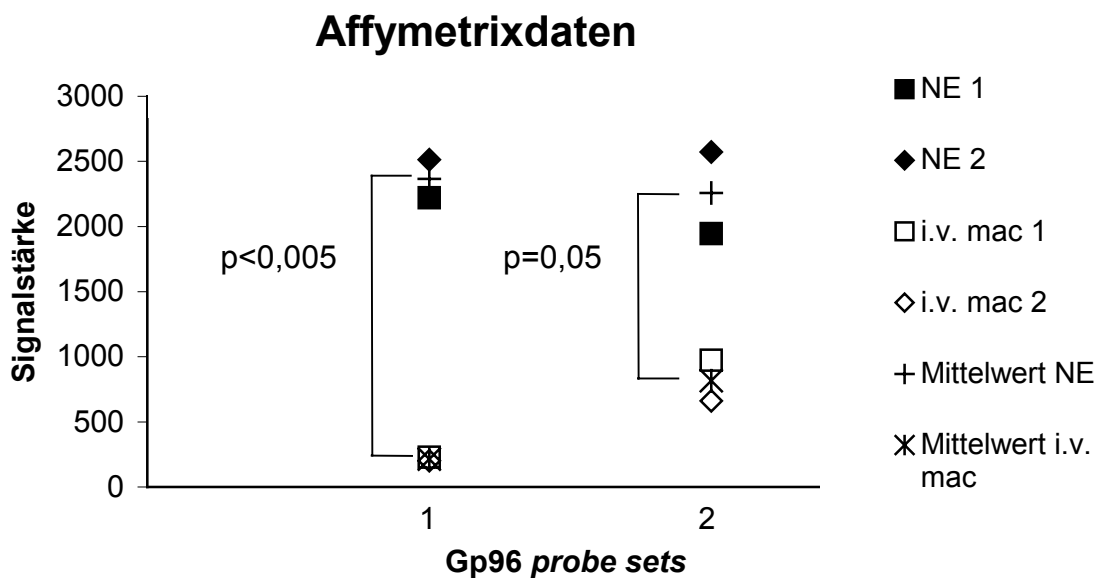


Abb. 4.2: Die Affymetrixdaten bestätigen die Ergebnisse der Subtraktiven Hybridisierung. Die original Signalstärken der intestinalen Makrophagen und der *in vitro* differenzierten Makrophagen für beide probe sets sind gezeigt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Signalstärke auf dem Chip. Der Mittelwert ergibt sich jeweils aus den beiden Datenpunkten für intestinale Makrophagen und *in vitro* differenzierte Makrophagen. Für das probe set 1 wurde eine 11-fache für das probe set 2 eine dreifache Induktion gemessen. NE: nicht entzündet; i.v. mac: *in vitro* differenzierte Makrophagen

4.2.2 RT-PCR

Um die Ergebnisse der subtraktiven Hybridisierungsversuche und der Affymetrix GeneChip® Analyse weiter zu bestätigen, wurden RT-PCR–Versuche mit der mRNA aus intestinalen Makrophagen von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und ohne intestinale Entzündung (NE), des Weiteren mit mRNA aus Monozyten und *in vitro* differenzierten Makrophagen, durchgeführt. In intestinalen Makrophagen von Patienten mit MC, CU und ohne intestinale Entzündung konnte Gp96 nachgewiesen werden. Keine Expression von Gp96 zeigte sich jedoch in Monozyten und in *in vitro* differenzierten Makrophagen (Abb. 4.3). Die Integrität der cDNA wurde mit dem Gene Checker™ kit durchgeführt, wobei nur GAPDH gezeigt ist.

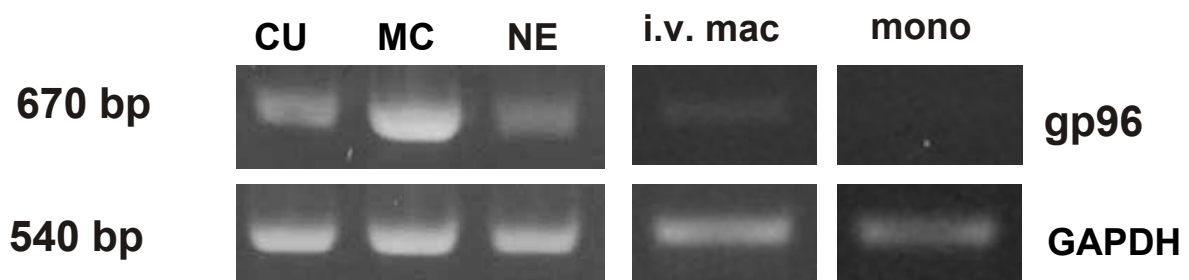


Abb. 4.3: Gp96-mRNA-Expression in *in vitro* differenzierten Makrophagen (i.v. mac), Monozyten (mono) und intestinalen Makrophagen von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU), Morbus Crohn (MC) und nicht entzündeter Mukosa (NE). Gp96 kann bei Patienten mit MC, CU und NE nachgewiesen werden, jedoch nicht in Monozyten und *in vitro* differenzierten Makrophagen. Die Abbildung ist repräsentativ für 11 nicht entzündete Patienten, neun Patienten mit MC, sechs Patienten mit CU, vier Spender für *in vitro* differenzierte Makrophagen und 11 Monozyten-Spender.

4.2.3 Real-time-PCR mit TaqMan®

Um genaueren Aufschluss über die Expressionsunterschiede, vor allem zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen, zu erhalten wurden *real-time-PCR*-Versuche nach der Taqman®-Methode durchgeführt. Hierfür wurde mRNA von sieben Monozyten-Spendern, drei Kulturen *in vitro* differenzierter Makrophagen, fünf Patienten mit

Colitis ulcerosa, sechs Patienten mit Morbus Crohn und fünf Patienten ohne intestinale Entzündung gewonnen. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, gab es bei der mRNA-Expression von Gp96 innerhalb der Patientengruppen (MC, CU und NE) keine signifikanten Unterschiede, aber die Expression lag signifikant höher als in Monozyten und in *in vitro* differenzierten Makrophagen (Monozyten vs. CU $p < 0,002$, Monozyten vs. MC $p < 0,005$, Monozyten vs. NE nicht signifikant, i.v. mac vs. CU $p < 0,05$, i.v. mac vs. MC $p < 0,02$, i.v. mac. Vs. NE nicht signifikant, t-Test)

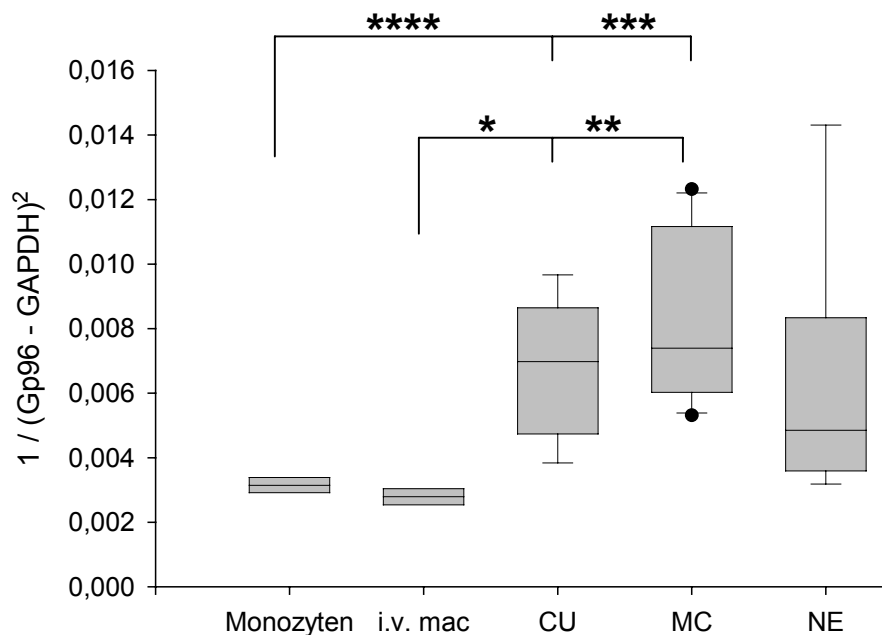


Abb. 4.4: Real-time-PCR (TaqMan®) für Gp96. Die mRNA-Expression ist in Makrophagen von Patienten mit MC, CU und NE höher als in Monozyten und *in vitro* differenzierten Makrophagen. (* $p < 0,002$, Monozyten vs. MC $p < 0,005$, Monozyten vs. NE n.s., i.v. mac vs. CU $p < 0,05$, i.v. mac vs. MC $p < 0,02$, i.v. mac vs. NE n.s.).

4.3 Immunhistochemische Analyse der Gp96 Expression in multi-zellulären Sphäroiden (MZS)

Basierend auf den Ergebnissen der mRNA-Expression konnte geschlossen werden, dass die Gp96-Expression während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert wird. Um nachzuprüfen ob Gp96 tatsächlich während der Differenzierung

von Monozyten in intestinale Makrophagen induziert wird, wurde das Sphäroid-Modell der Makrophagendifferenzierung herangezogen^{241, 20}.

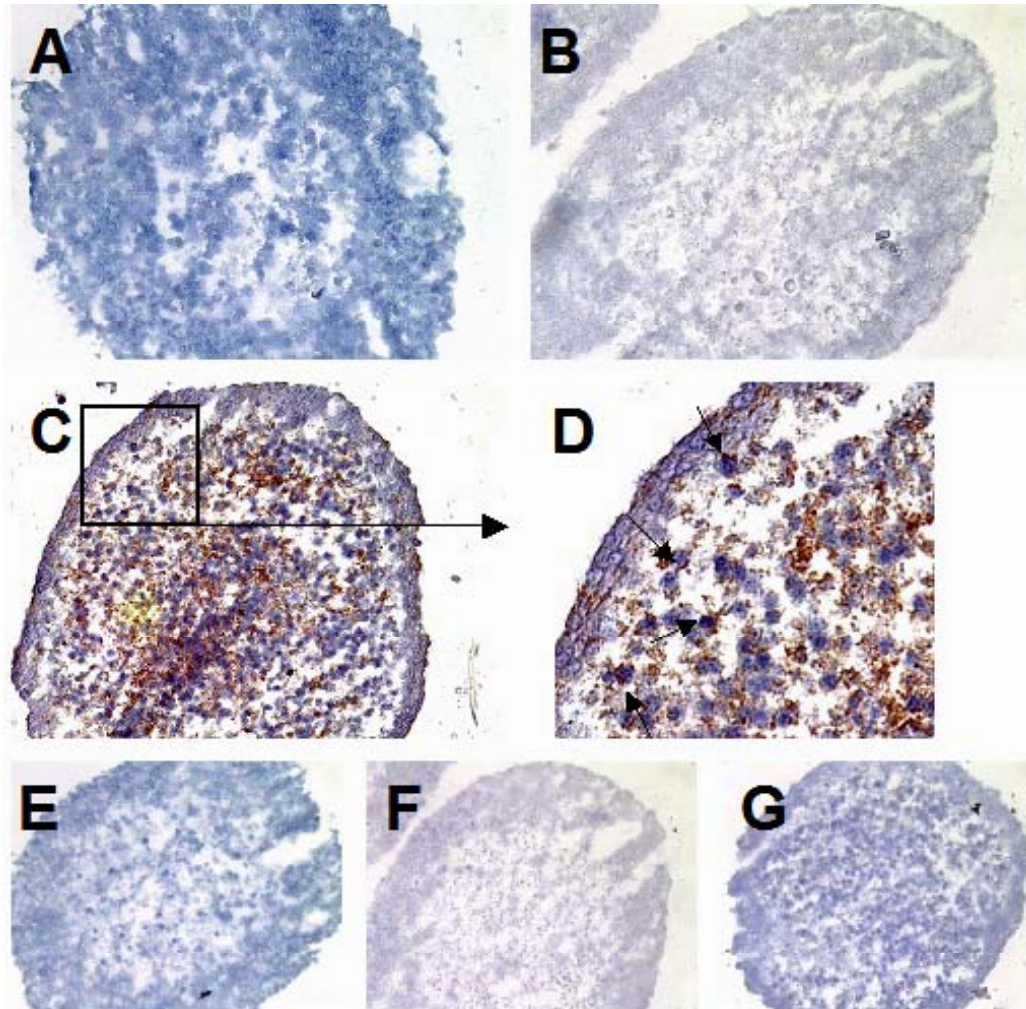


Abb. 4.5: Expression von Gp96 in HT-29 Sphäroiden nach 24 h, drei und sieben Tagen Kokultur mit Monozyten. Nach 24 h und drei Tagen konnte keine Gp96-Expression detektiert werden (A + B). Nach sieben Tagen war Gp96 nachweisbar (C + D). Die Isotypkontrolle zeigte keine unspezifische Färbung. (E + F + G) (Vergrößerung x200).

Nach 24 h und drei Tagen Kokultur von Monozyten mit den Sphäroiden war keinerlei Gp96 detektierbar (Abb. 4.5 A + B). Nach sieben Tagen Kokultur hingegen konnte Gp96 in hohen Mengen in den Sphäroiden nachgewiesen werden, wobei das Verteilungsmuster der Expression typisch für eingewanderte Monozyten bzw. Makrophagen war (Abb. 4.5 C + D).

Die Versuche wurden dreimal mit unterschiedlichen Monozyten-Spendern durchgeführt und es konnte daraufhin geschlossen werden, dass Gp96 tatsächlich differenzierungsspezifisch für intestinale Makrophagen ist.

4.4 Gp96-Expression in humaner intestinaler Mukosa

4.4.1 Immunhistochemie

Da bisher gezeigt werden konnte, dass Gp96 bei der Differenzierung von Monozyten in intestinale Makrophagen induziert wird, sollte Gp96 in Makrophagen der intestinalen Mukosa nachgewiesen werden. Dies sollte zunächst bei Patienten mit Morbus Crohn und bei Patienten ohne intestinale Entzündung untersucht werden.

Die immunhistochemische Untersuchung wurde auf Darm-Resektaten von neun Patienten ohne intestinale Entzündung und sieben Patienten mit MC mit einem spezifischen monoklonalen anti-Gp96 Antikörper vorgenommen. Es wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und in einem ersten Markierungsschritt wurde Gp96 mit *Vector® NovaRED®* (rot) nachgewiesen. In einem zweiten Markierungsschritt wurden Makrophagen über den spezifischen Marker CD68 mit BDHC (blau, granulär) nachgewiesen. Wie in Abb. 4.6 zu sehen, war Gp96 in intestinalen Makrophagen bei Patienten ohne intestinale Entzündung nachweisbar (Abb. 4.6 A), wohingegen Gp96 auf Proteinebene, im Gegensatz zur mRNA-Ebene, in Makrophagen von Patienten mit MC nicht detektierbar war (Abb. 4.6 B). Die Isotypkontrolle (Ratte-IgG2a für Gp96, Maus-IgG1 für CD68) zeigte keinerlei unspezifische Färbung (Abb. 4.6 C + D).

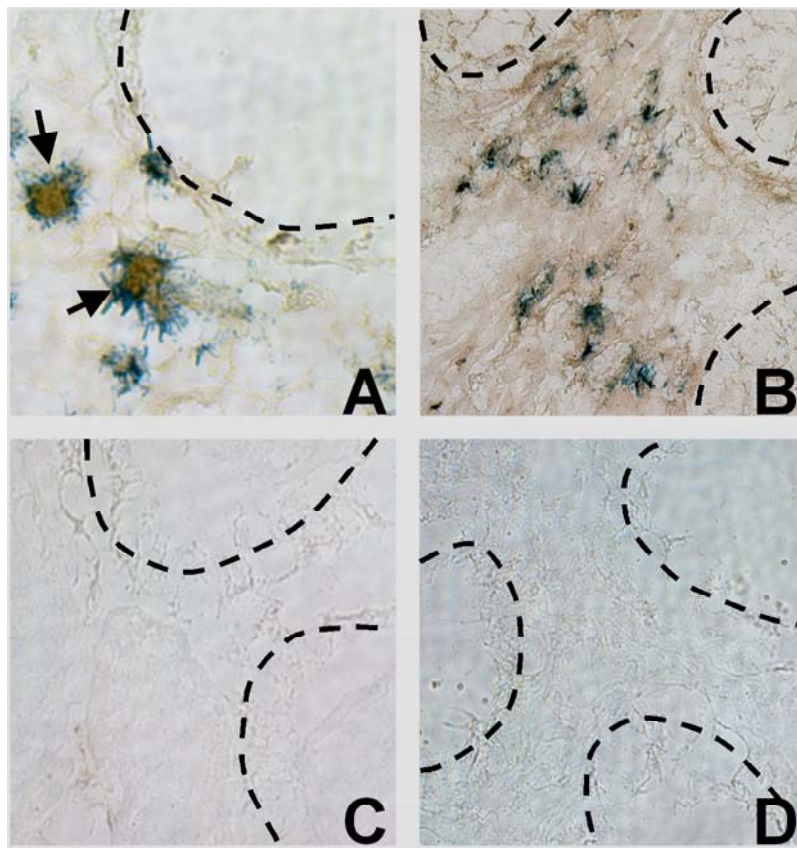


Abb. 4.6: Nachweis der Gp96-Expression in intestinalen Makrophagen mit einem monoklonalen Antikörper. Gp96 war in intestinalen Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa nachweisbar (A), wohingegen in Makrophagen aus Patienten mit MC kein Gp96 detektierbar war (B). Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifische Färbung (C + D).

----- Krypte

(Vergrößerung x400)

Um auszuschließen, dass an Gp96 gebundene Peptide die Bindung des monoklonalen Antikörpers verhindern, wurde zusätzlich zu den Versuchen mit dem monoklonalen Antikörper, Gp96 mit einem polyklonalen Serum immunhistochemisch nachgewiesen. Die Ergebnisse waren identisch zu denen mit dem monoklonalen Antikörper und sind in Abb. 4.7 dargestellt.

Auch mit dem polyklonalen Serum war Gp96 nur in Makrophagen der nicht entzündeten intestinalen Mukosa, nicht jedoch in Makrophagen von Patienten mit MC detektierbar. Die Isotypkontrolle (Kaninchen-Immunglobuline für Gp96, Maus-IgG1 für CD68) zeigte keinerlei unspezifische Färbung (Abb. 4.7 C + D).

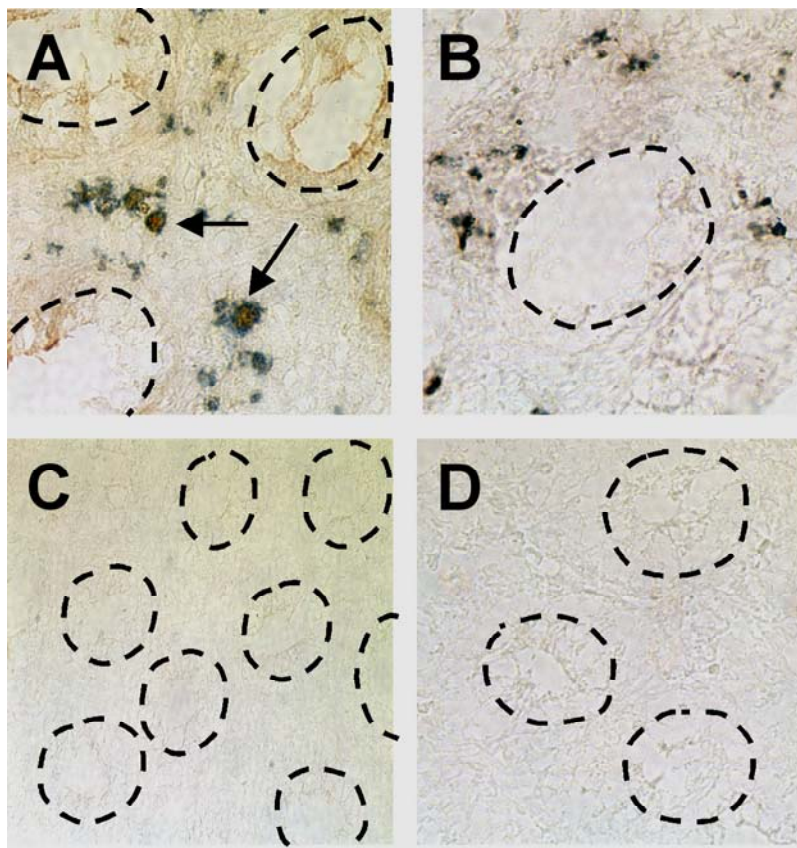


Abb. 4.7: Nachweis der Gp96-Expression in intestinalen Makrophagen mit einem polyklonalen Serum. Gp96 war in intestinalen Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa nachweisbar (A), wohingegen in Makrophagen aus Patienten mit MC kein Gp96 detektierbar war (B). Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifische Färbung (C + D).

----- Krypte

(Vergrößerung x400)

4.4.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzversuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frauke Bataille und Sabine Troppmann aus der Abteilung für Pathologie durchgeführt und bestätigten die Immunhistochemischen Untersuchungen. Als Primärantikörper wurden dieselben herangezogen wie auch für die immunhistochemischen Versuche. Der Nachweis erfolgte aber im Gegensatz zur Immunhistochemie auf Paraffinschnitten und die Detektion erfolgte mit an Alexa-Fluor gekoppelte Sekundärantikörper. Der anti-Ratte Antikörper war an Alexa Fluor® 594 (rot), der anti-Maus Antikörper an Alexa Fluor® 488 (grün) gekoppelt.

Die Immunfluoreszenzen zeigten dieselben Ergebnisse wie die immunhistochemischen Versuche. In Abb. 4.8 A - C (Pfeile) ist zu sehen, dass Gp96 in den meisten intestinalen Makrophagen exprimiert wird, wenn keine intestinale Entzündung vorliegt. Dabei ist zu beobachten, dass Gp96-negative Zellen in sup-epithelialen Bereichen akkumulieren und nahe an den Krypten liegen. Gp96 positive Makrophagen sind eher in tieferen Schichten der Lamina propria zu finden. Dagegen sind die meisten

Makrophagen in der Mukosa von Patienten mit MC Gp96 negativ (Abb. 4.8 D - F, grüne Pfeile), nur sehr wenige Makrophagen exprimieren Gp96 (Abb. 4.8. D - F, weiße Pfeile). In keinem anderen Zelltyp außer Makrophagen konnte in der intestinalen Mukosa Gp96 detektiert werden (Abb. 4.6 bis 4.8).

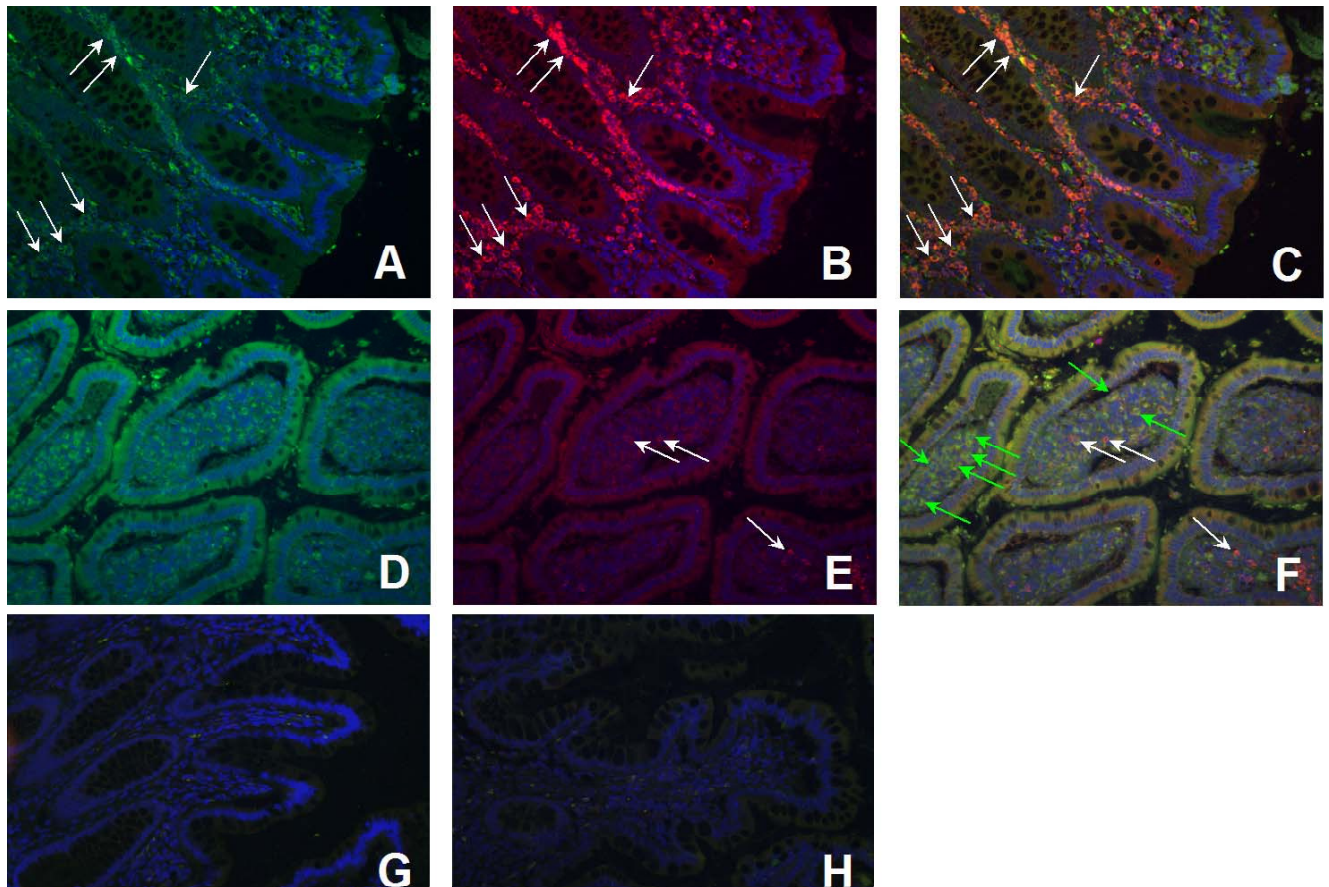


Abb. 4.8: Nachweis von Gp96 in intestinaler Mukosa von Patienten ohne intestinale Entzündung (A - C) und mit Morbus Crohn (D - F). In nicht entzündeter Mukosa sind die meisten Makrophagen (A, grün, Pfeile) Gp96 positiv (B, rot; C, Überlagerung, Pfeile). Nur sehr wenige Makrophagen (D, grün, grüne Pfeile) sind bei Patienten mit MC Gp96 positiv (E, rot; F, Überlagerung, weiße Pfeile). Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifische Färbung (G + H). (Vergrößerung x200)

4.4.3 Immunhistochemie und -fluoreszenz bei Colitis ulcerosa und Divertikulitis

Um zu bestimmen, ob das Fehlen von Gp96 in intestinalen Makrophagen von Patienten mit MC spezifisch für MC ist, oder ob es sich dabei um ein Epiphenomän der intestinalen Entzündung im Allgemeinen handelt, wurden immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Dünnschnitten von Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) und Divertikulitis durchgeführt.

Wie in Abb. 4.9 und 4.10 gezeigt, ist Gp96 in intestinalen Makrophagen bei Divertikulitis (4.9) und CU (4.10) im gleichen Ausmaß nachweisbar wie in Patienten ohne intestinale Entzündung (Abb. 4.6 - 4.8). Das Verteilungsmuster in der Mukosa ist dabei ebenfalls dasselbe wie in der Mukosa ohne Entzündung. Die Gp96-positiven Makrophagen sind in tieferen Schichten der Lamina propria zu finden wohingegen Gp96-negative Makrophagen in Kryptennähe liegen.

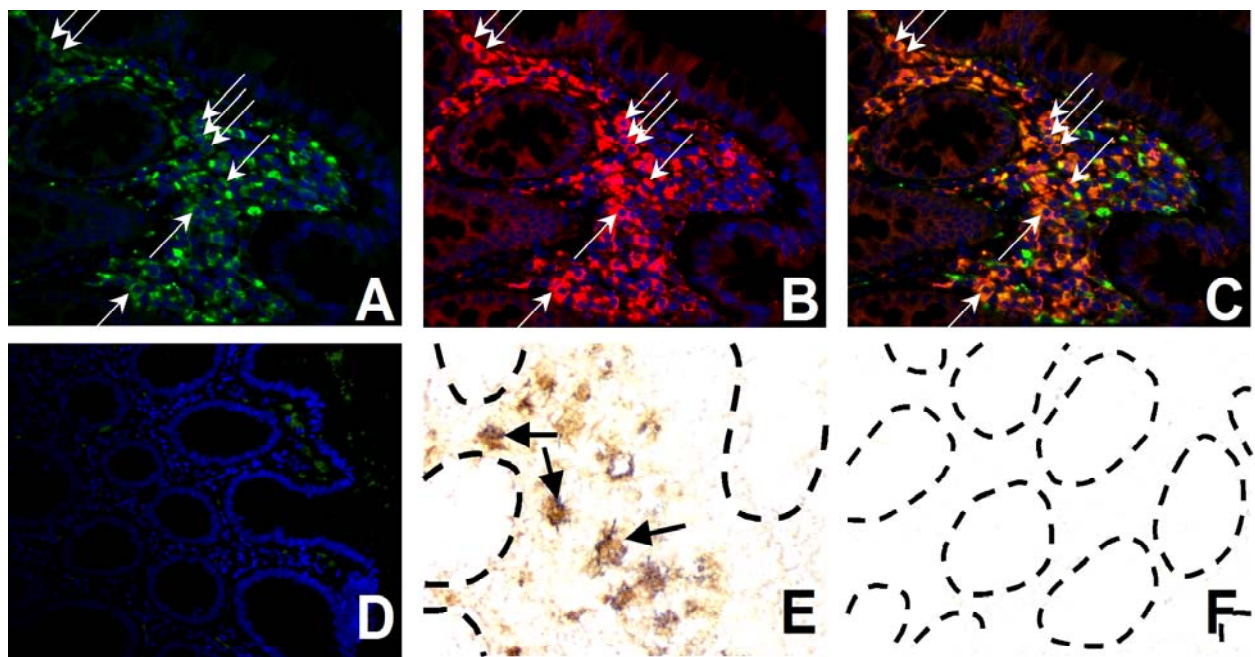


Abb. 4.9: Immunfluoreszenz und -histochemie auf Dünnschnitten eines Patienten mit Divertikulitis. Die meisten Makrophagen exprimieren Gp96 (Pfeile) Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifische Färbung (D + E). ---- Krypte (Vergrößerung A - D x200; E, F x400).

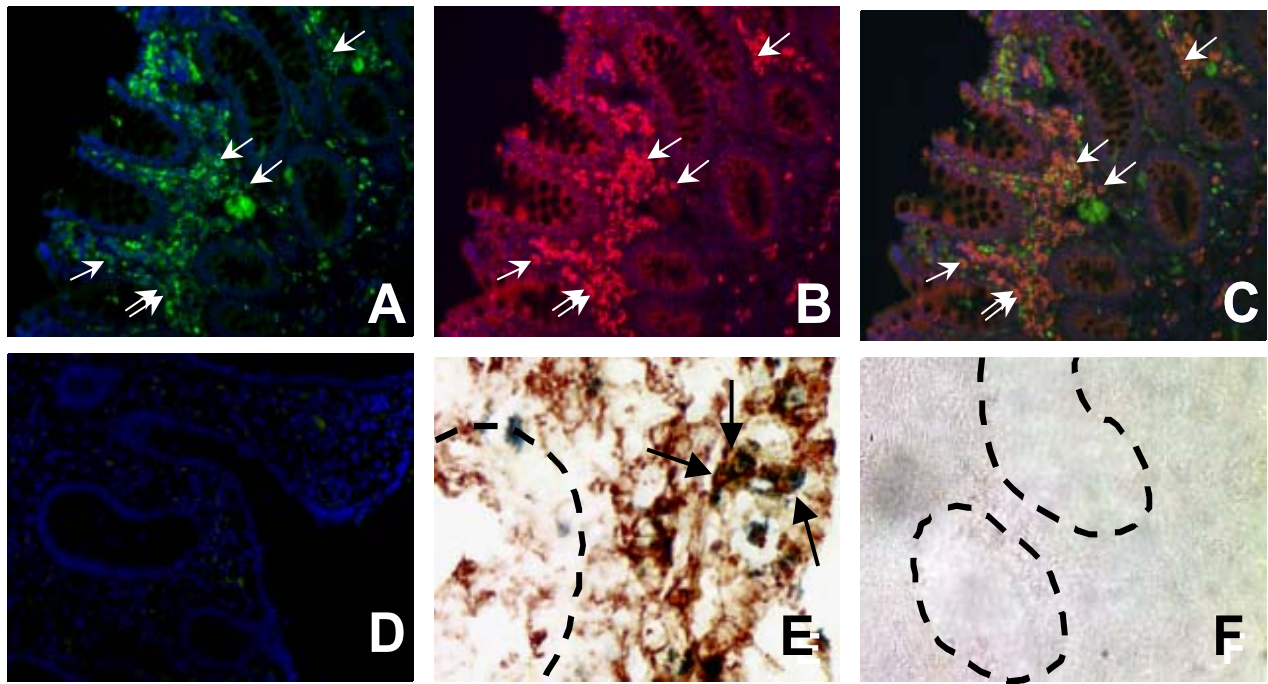


Abb. 4.10: Immunfluoreszenz und -histochemie auf Dünnschnitten eines Patienten mit CU. Die meisten Makrophagen exprimieren Gp96 (Pfeile) Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifische Färbung (D + E). ---- Krypte (Vergrößerung A - D x200; E, F x400).

4.5 Sequenzierung von Gp96 cDNA

Um zu untersuchen, ob Gp96 in intestinalen Makrophagen bei Patienten mit MC nur deshalb nicht detektiert werden konnte, weil eine Mutation vorliegt, so dass der Antikörper nicht oder nur schlecht binden kann, wurde die cDNA einiger Patienten kloniert und sequenziert.

Die cDNA für Gp96 von fünf Patienten mit MC, zwei Patienten mit CU und fünf Patienten ohne intestinale Entzündung wurde in den Vektor Topo 2.1 kloniert und anschließend sequenziert. Es wurde in keinem der Patienten eine Mutation, die zu einer Leseraster-Verschiebung, einem Stopp-Kodon oder einem Aminosäureaustausch führt, gefunden. Bei acht der 12 untersuchten Patienten kam es allerdings an Position 2382 zu einem Nucleotidaustausch von C zu T (NCBI Sequenz-Nr.: X15187.1), welcher aber zu keinem Aminosäureaustausch führt, da die dritte Position des Kodons CCC betroffen ist, welches zu CCT wird. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure

Prolin. Diese Mutation betraf drei der Patienten mit MC, alle fünf Patienten ohne intestinale Entzündung und keinen der CU-Patienten.

4.6 Gp96-Expression im Transfer-Kolitis-Maus-Modell

Da die Funktion von Gp96 für die Darmschleimhaut im Menschen nicht näher untersucht werden kann, wurden weitere Untersuchungen zur Expression und Regulation im Transfer-Kolitis Maus-Modell durchgeführt. $CD4^+ CD62L^+$ T-Zellen wurde aus Milzen von Balb/c Spendertieren isoliert und in Scid-Mäuse transferiert. Die Mäuse entwickeln nach etwa 6 - 8 Wochen eine chronische Kolitis.

Gefrierschnitte des Dickdarmes von fünf gesunden und sieben Tieren mit Kolitis wurden immunhistochemisch auf die Expression von Gp96 untersucht. Da es bei Mäusen, im Gegensatz zum Menschen, keinen eindeutigen Makrophagenmarker gibt, mit dem alle Makrophagenpopulationen detektiert werden können, wurden zwei verschiedene Marker zum Nachweis von Makrophagen benutzt. Mac-3 diente dabei zum Nachweis ruhender Makrophagen, F4/80 zum Nachweis aktivierter Makrophagen^{245, 246, 247}.

In der Mukosa von Mäusen ohne Kolitis konnte Gp96 in Mac-3 positiven Makrophagen detektiert werden (Abb. 4.11 A), wohingegen keinerlei Gp96 in der Mukosa von Mäusen mit Kolitis nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.11 B + F). Des Weiteren waren keine Mac-3 positiven Makrophagen in der Mukosa von Kolitis-Mäusen zu detektieren (Abb. 4.11 B), wobei Mac-3 positive Makrophagen durchaus in Lymphfollikeln von Kolitis-Mäusen zu finden waren und diese exprimierten Gp96 (Abb. 4.11 C + D). In gesunden Mäusen konnten nur vereinzelt F4/80 positive Makrophagen nachgewiesen werden, wobei diese dann keine Gp96-Expression zeigten (Abb. 4.11 E). In Mäusen mit Kolitis waren sehr viele F4/80 positive Makrophagen zu finden, wobei diese keine Gp96-Expression aufwiesen (Abb. 4.11 F).

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Gp96-Expression in der Mukosa von Mäusen einer ähnlichen Regulation unterliegt wie in der humanen Mukosa.

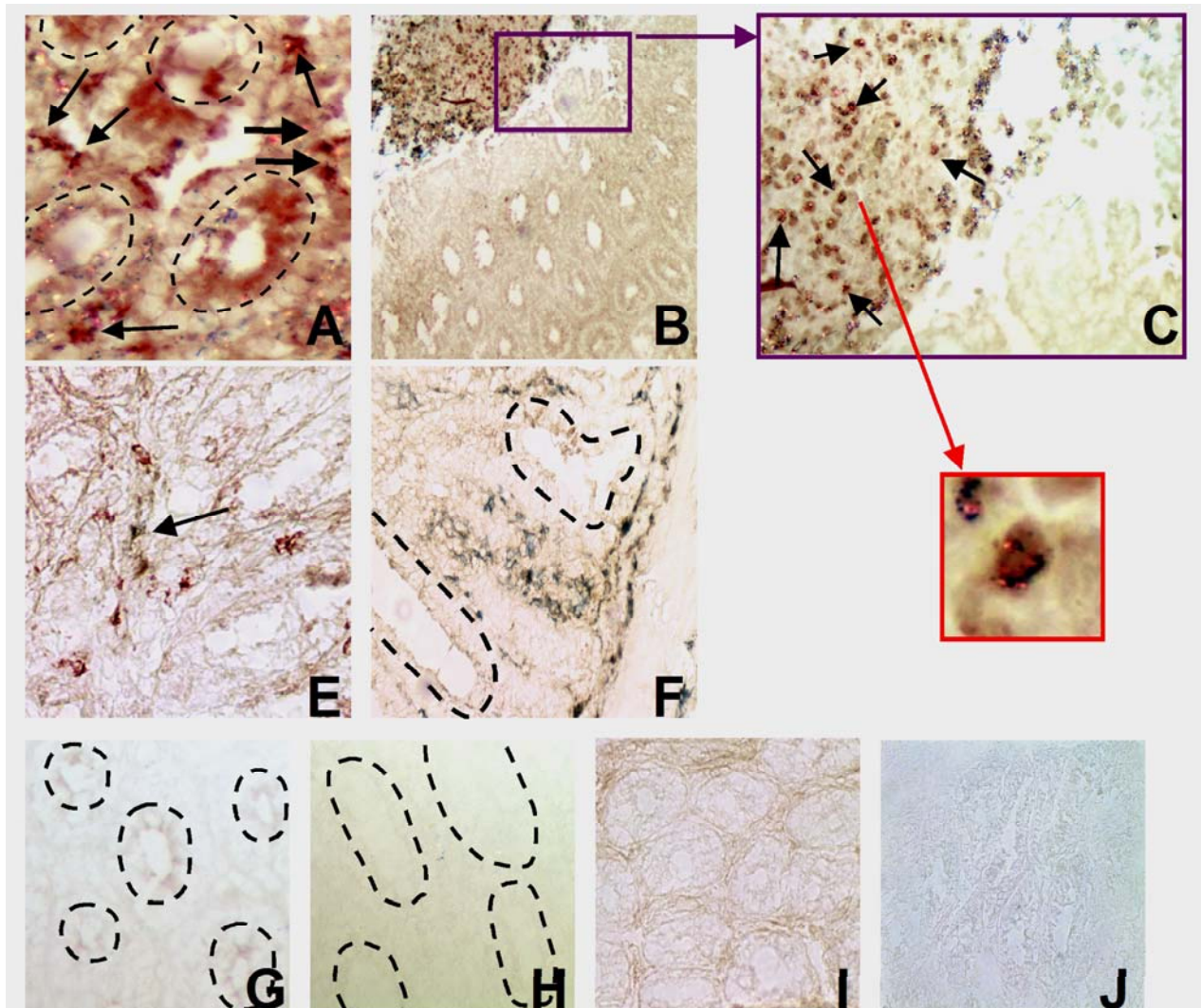


Abb. 4.11: Immunhistochemischer Nachweis von Gp96 in murinem Dickdarm. Gp96 wird in Mac-3 positiven Makrophagen (A) aber nicht in F4/80 positiven Makrophagen (E) in nicht entzündeter Mukosa exprimiert. Gp96 wird nicht in Mac-3 (B) oder F4/80 (F) positiven Makrophagen in der Mukosa von Mäusen mit Kolitis. In Lymphfollikeln wird Gp96 in Mac-3 positiven Makrophagen exprimiert (C + D). Die Isotypkontrollen zeigen keine unspezifische Färbung (G - J). ---- Krypte (Vergrößerung x400).

4.7 Transfer-Kolitis Maus-Modell – Behandlung mit Gp96

Da bisher in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Gp96-Expression bei der Differenzierung von Monozyten zu intestinalen Makrophagen induziert wird und Gp96-Protein bei Morbus Crohn in intestinalen Makrophagen nicht nachgewiesen werden kann, und weil sich bei Mäusen mit einer durch $CD4^+$ $CD62L^+$ T-Zell-Transfer ausgelösten Kolitis ähnliche Verhältnisse zeigten, vermuteten wir, dass der bei Morbus

Crohn und der bei der Transfer-Kolitis ausgelöste Verlust der Toleranz gegenüber der eigenen luminalen Bakterienflora ursächlich mit dem Verlust von Gp96 zusammenhängen könnte. Daher sollten verschiedene Ansätze zur Behandlung der Transfer-Kolitis mit Gp96 getestet werden. Zum einen sollten Tiere nach dem T-Zell-Transfer zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Gp96 behandelt werden, zum anderen sollten bereits Balb/c Donortiere mit Gp96 behandelt werden, um zu zeigen, dass ein protektiver Effekt von Gp96 über T-Zellen vermittelt wird. Ausschlaggebend für diese Versuche waren Publikationen^{127, 128}, in denen gezeigt worden war, dass die Behandlung von Mäusen mit hohen Gp96-Dosen (100 µg) zu Toleranz gegenüber Tumoren führte, aus denen Gp96 isoliert wurde, und nicht zwangsläufig zur Immunisierung gegen den Tumor¹²⁷. Dieselbe Gruppe zeigte kürzlich, dass die Behandlung von Mäusen mit Gp96 den Ausbruch einer *myelin basic protein* oder eine Proteolipid-Protein induzierten Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) sowie den Beginn eines Diabetes in *non-obese-diabetic* (NOD)-Mäusen verhindern kann¹²⁸. Des Weiteren wurde kürzlich bekannt, dass Gp96 nicht nur in der Lage ist, Peptide in den MHC Klasse I-Weg einzuschleusen, sondern, dass Gp96 offensichtlich auch Peptide auf MHC Klasse II-Moleküle übertragen kann, so dass diese dann CD4⁺-T-Zellen präsentiert werden. Dabei kommt es nicht zur Induktion einer Immunantwort gegen das Peptid, sondern die T-Zellen werden in einen anergen Zustand überführt²⁴⁸.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Ansätze in drei Transfer-Versuchen durchgeführt, die im Folgenden erläutert und beschrieben sind. Bei jedem der Transfer-Ansätze wurden die isolierten CD4⁺ CD62L⁺ Zellen auf die Expression der Oberflächenmarker CD4, CD8, MHC Klasse II, CD45R, CD45RB, CD62L, CD25 und CD103 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Exemplarisch ist in Abb. 4.12 eine FACS-Analyse der isolierten Zellen dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Zellen die Oberflächenmarker CD4, CD62L und CD45RB exprimieren, für die anderen Marker jedoch negativ sind. Daraus ist zu folgern, dass es sich um eine sehr reine naive T-Zell-Population handelt, die für die Transferversuche verwendet wurde. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Expression der genannten Oberflächenmarker, wenn die Spendertiere unbehandelt waren oder aber mit Gp96, peptidbeladenem Gp96 oder denaturiertem Gp96 vorbehandelt worden waren.

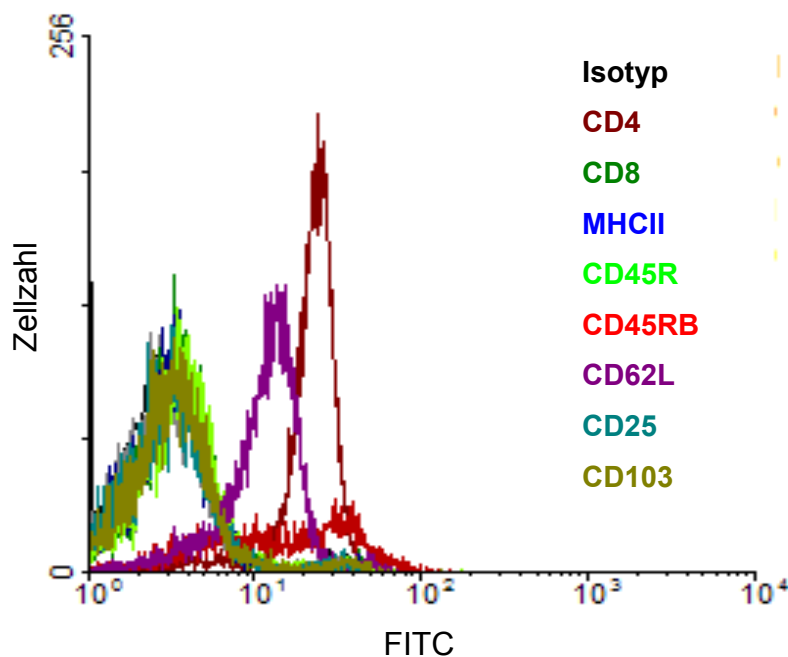


Abb. 4.12: Durchflusszytometrische Analyse der isolierten $CD4^+ CD62L^+$ Zellen. Die Zellen exprimieren nur die Marker $CD4$, $CD62L$ und $CD45RB$.

Die Balb/c-Donortiere wurden entweder mit reinem endotoxinfreiem Gp96, oder mit peptidbeladenem Gp96 behandelt. Die Behandlung nach dem T-Zell-Transfer erfolgte nur mit reinem Gp96. Die Peptide wurden, genauso wie das Gp96 selbst, von der Firma Immatics Biotechnologies (Tübingen) synthetisiert. Auch die Beladung von Gp96 mit den Peptiden wurde von Immatics Biotechnologies durchgeführt. Bei den gewählten und für die Versuche benutzen Peptiden handelte es sich um zwei Peptide aus einem *E.coli*-Membran-Protein (*putative outer membrane lipoprotein Wza*, Acc. Nr. Q9X4B7, AAD21562, AS-Sequenzen, siehe 2.1), von dem anzunehmen ist, dass es auch natürlicherweise im Darm von Mäusen vorkommt. Ausgewählt wurden die Peptide von Immatics Biotechnologies im Hinblick auf ihre Fähigkeit von MHC Klasse I-Molekülen und Gp96 gebunden zu werden, denn nicht jedes beliebige Peptid passt gleich gut in den peptidbindenden Spalt beider Moleküle.

4.7.1 1.Transfer

Im ersten Transfer-Versuch wurde mit fünf unterschiedlichen Versuchs-Gruppen gearbeitet (Abb. 4.13):

VB Gp96:	zweimalige Behandlung der Spendertiere mit je 100 µg Gp96 im Abstand von einer Woche
VB Gp96/Pep:	zweimalige Behandlung der Spendertiere mit je 100 µg peptidbeladenem Gp96 im Abstand von einer Woche
BNT:	Behandlung der Scid-Empfängertiere nach T-Zell-Transfer mit 100 µg Gp96 an Tag 1 + 7 nach Transfer (keine Behandlung der Spendertiere).
CD62L ⁺ :	keine Behandlung der Spender- und Empfängertiere (Positivkontrolle für die Entstehung einer Kolitis)
PBS:	kein T-Zell-Transfer, nur Gabe von PBS

Die Gabe von Gp96 bzw. Gp96/Pep erfolgte *sub cutan* (s.c.) in den Nacken der Tiere. Nach dem Transfer erfolgte eine wöchentliche Gewichtskontrolle. Der Versuch wurde beendet, sobald es den Tieren der Positivkontroll-Gruppe klinisch sehr schlecht ging und der Gewichtsverlust einzelner Tiere 20% überschritt.

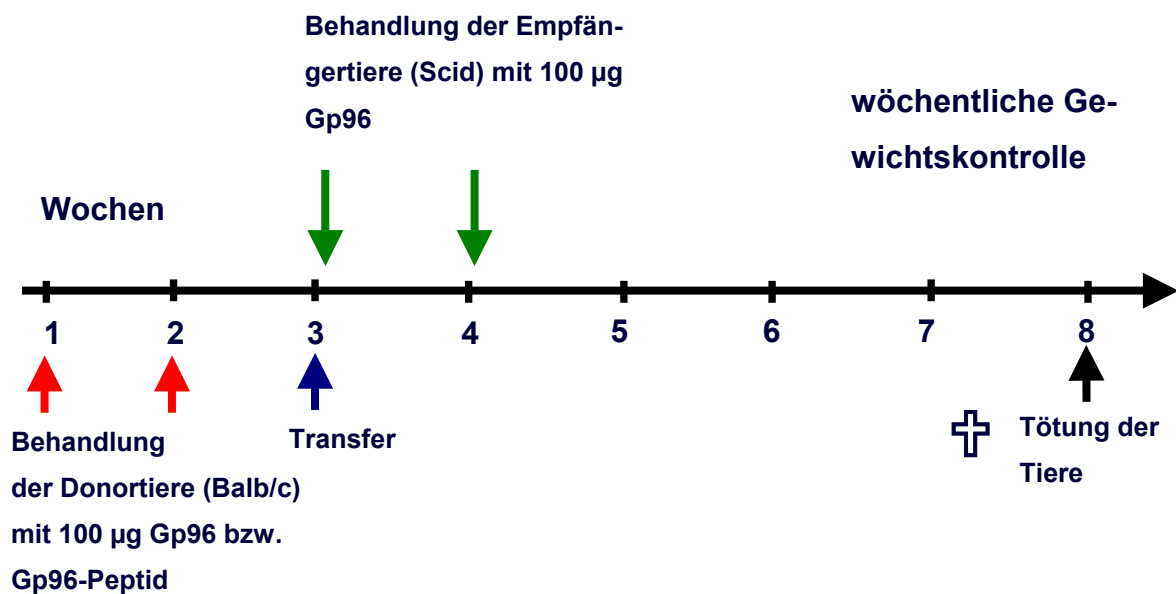


Abb. 4.13: Behandlungsschema des 1. Transfers.

Bei Tötung der Tiere wurde das Milzgewicht und die Darmlänge erfasst. Des Weiteren wurde der Darm vom Rektum bis zum Zökum in 4% Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet, um ihn histologisch zu begutachten. Die mesenterialen Lymphknoten wurden zur Zellisolation entnommen und die isolierten Zellen wurden unstimuliert für 24 h in Medium inkubiert, oder mit anti-CD3-Antikörpern in IL-2-haltigem Medium für 24 h stimuliert (siehe 3.13.1).

4.7.1.1 Gewichtsverlauf

Das Gewicht der Tiere wurde einmal wöchentlich kontrolliert. Des Weiteren wurde beobachtet, ob die Tiere sonstige klinische Veränderungen, wie struppiges Fell oder Durchfall aufwiesen. In Abb. 4.14 ist der Gewichtsverlauf der fünf Gruppen dargestellt.

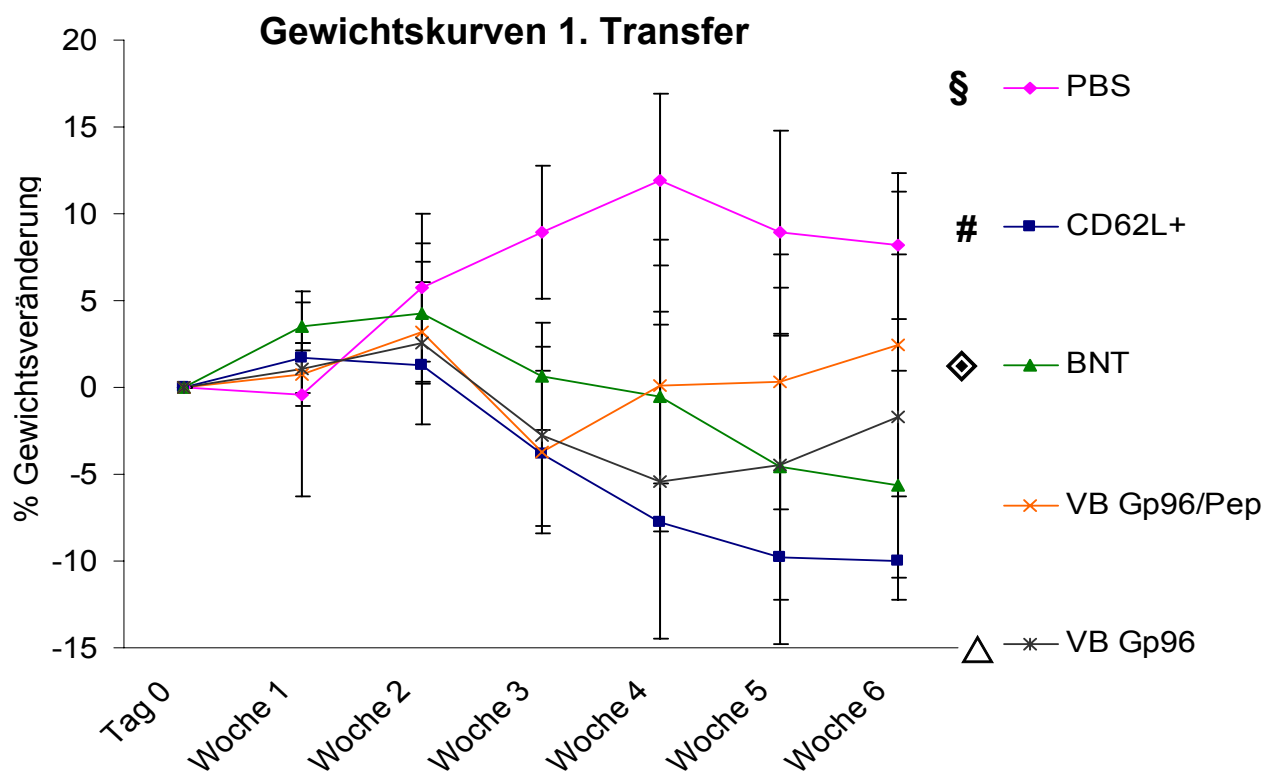


Abb. 4.14: Gewichtsverläufe der Gruppen im 1. Transfer-Versuch. Die Tiere der PBS-Gruppe nahmen deutlich an Gewicht zu, wohingegen die Tiere der CD62L⁺-Gruppe stark an Gewicht verloren. Die Tiere, die Zellen aus vorbehandelten Donoren erhalten hatten, erholten sich nach einem anfänglichen Gewichtsverlust. # vs. § p<0,001, # vs. ◇ p=0,05, # vs. △ p<0,05, allgemeines lineares Modell

Wie erwartet, zeigten die Tiere, die nur PBS erhalten hatten eine kontinuierliche Gewichtszunahme, die Tiere der CD62L⁺-Gruppe wiesen eine starke Gewichtsabnahme auf. Der Unterschied der Gewichtskurven beider Gruppen zueinander ist signifikant ($p < 0,001$, allgemeines lineares Modell). Die BNT-Gruppe zeigte eine verzögerte Gewichtsabnahme. Auch dieser Unterschied im Verlauf war signifikant ($p = 0,05$). Den Tieren ging es klinisch besser als denen der CD62L⁺-Gruppe. Sie hatten weniger starken Durchfall und das Fell war weniger struppig. Tiere der VB Gp96- und der VB Gp96/Pep-Gruppe nahmen zunächst genauso stark ab wie die Tiere der CD62L⁺-Gruppe, sie erholten sich aber im Verlauf des Versuchs zunehmend und erlangten fast wieder das Ausgangsgewicht. Sie hatten auch nicht so starken Durchfall und das Fell war weniger struppig. Der Gewichtsverlauf der CD62L⁺-Gruppe unterschied sich dabei nur von dem der VB Gp96-Gruppe signifikant ($p < 0,05$, allgemeines lineares Modell).

4.7.1.2 Milzgewichte und Darmlängen

Nachdem die Tiere getötet worden waren, wurden die Darmlängen und die Milzgewichte ermittelt. Die mit PBS behandelten Tiere hatten, wie erwartet, das geringste Milzgewicht, die anderen Gruppen unterschieden sich in den Milzgewichten nicht wesentlich. In den Darmlängen waren zwischen den Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede festzustellen (nicht gezeigt)

4.7.1.3 Histologie

Für die Ermittlung des histologischen Scores wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Der Score wurde von Dr. Florian Obermeier ermittelt, wobei ihm dabei nicht bekannt war zu welcher Gruppe die einzelnen Schnitte gehörten. Sowohl der Epithelzellschaden als auch das entzündliche Infiltrat wurden begutachtet. Für beide Parameter wurde an drei unterschiedlichen Stellen im Gewebeschnitt ein Score von 0 (kein Schaden, bzw. Infiltrat) bis 4 (starker Schaden, bzw. Infiltrat) vergeben, so dass sich sechs Einzelwerte ergaben. Aus den Einzelwerten wurde ein Gesamtdurchschnitt errechnet, der zwischen 0 und 4 lag.

Die Scores der einzelnen Gruppen sind in Abb. 4.15 dargestellt. Wie erwartet lag der Score bei den Tieren der CD62L⁺-Gruppe mit einem Mittelwert von $2,6 \pm 0,25$ am höchsten. Die Tiere der PBS-Gruppe hatten einen Score von 0. Der Score bei Tieren der VB Gp96-Gruppe lag bei $1,3 \pm 0,6$ und der der VB Gp96/Pep-Gruppe bei $1,5 \pm 0,9$. Die BNT-Gruppe hatte einen Score von $1,9 \pm 0,2$. Damit lagen alle drei Gruppen signifikant unter dem Score der CD62L⁺-Gruppe (VB Gp96 vs. CD62L⁺ $p < 0,005$; VB Gp96/Pep vs. CD62L⁺ $p = 0,05$; BNT vs. CD62L⁺ $p < 0,005$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test. In Abb. 4.16 ist exemplarisch für jede der Gruppen ein typisches Bild der Histologie dargestellt. Bei VB Gp96 und BNT ist eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe erkennbar.

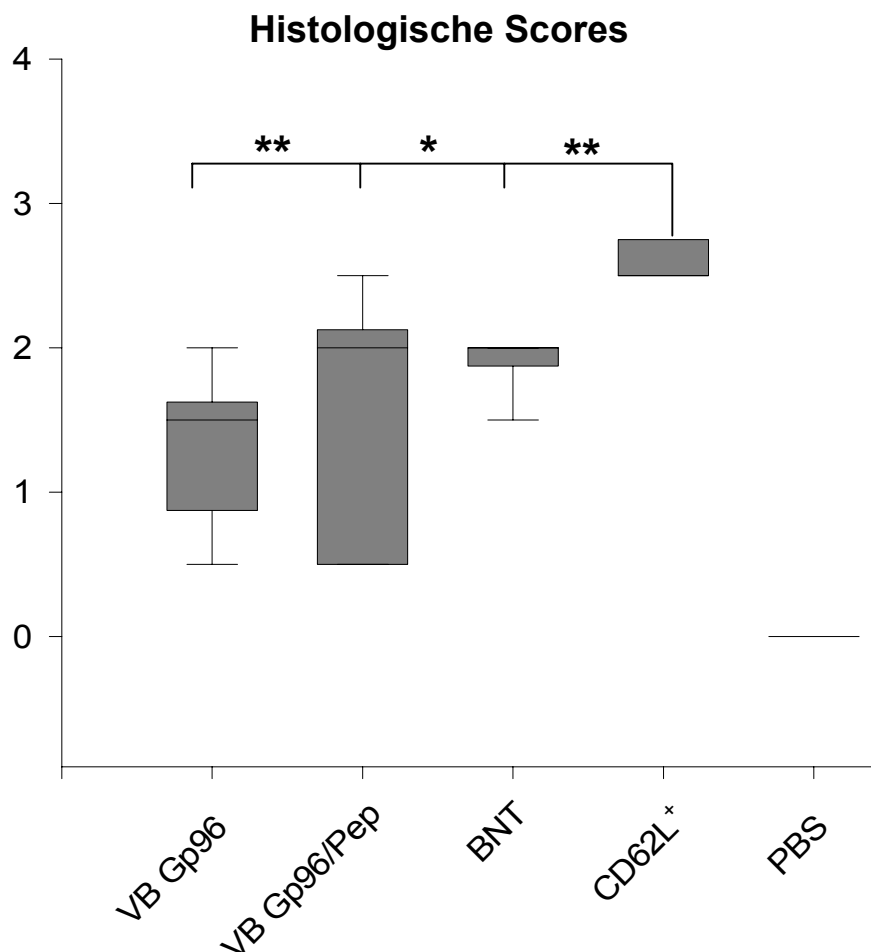


Abb. 4.15: Histologische Scores im 1. Transfer. Die mit Gp96 behandelte Gruppe, sowie die Gruppen deren Donoren mit Gp96 bzw. Gp96/Pep behandelt wurden, zeigten signifikante Verbesserungen im histologischen Score. * $p = 0,05$, ** $p < 0,005$

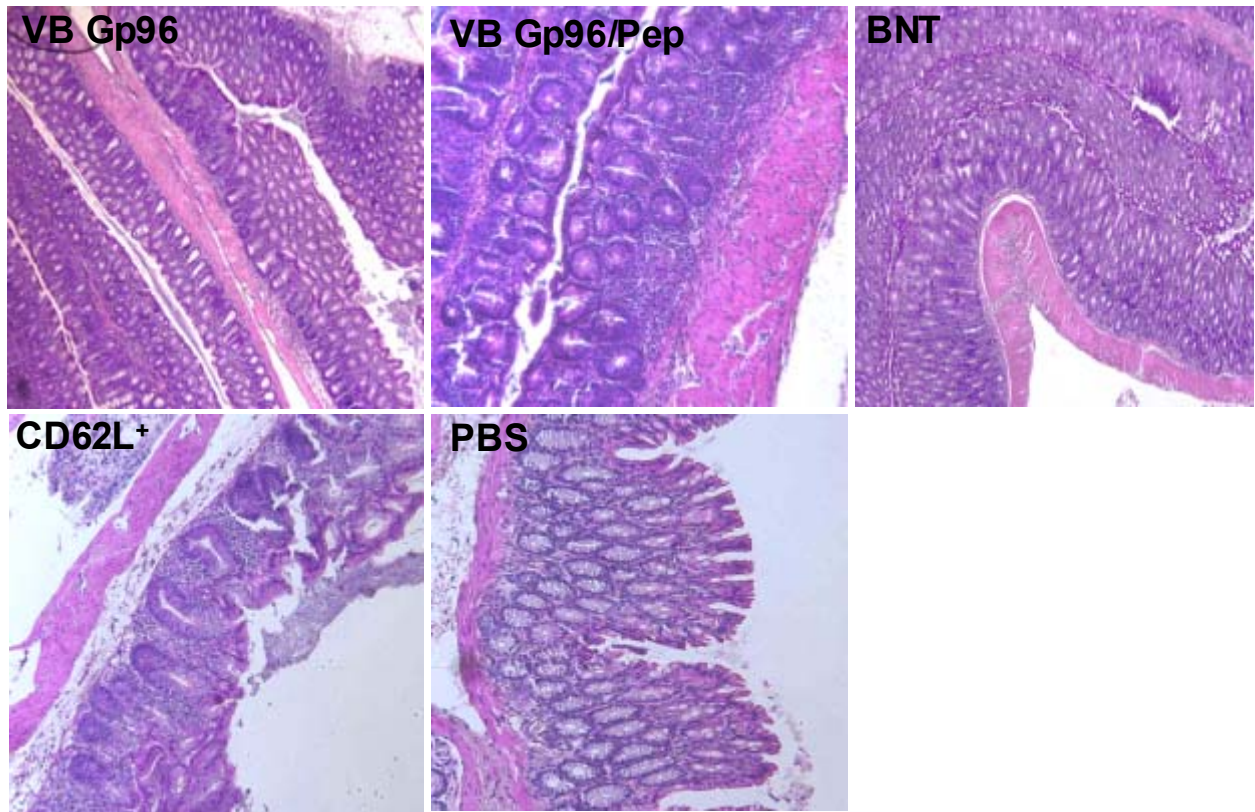


Abb. 4.16: Exemplarische Darstellung eines typischen Ausschnitts der Histologie für jede Gruppe. Bei den Gruppen VB Gp96, VB Gp96/Pep und BNT ist der Epithelschaden im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe reduziert.

4.7.1.4 Zytokinsekretion von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten

Den Tieren wurden die mesenterialen Lymphknoten (MLN) für die Bestimmung der Zytokinsekretion entnommen. Die mesenterialen Lymphknoten-Zellen aller Tiere einer Gruppe wurden gepoolt. Sofern es die gewonnene Zellzahl zuließ, wurden die Zellen einerseits auf anti-CD3 beschichteten Platten in IL-2-haltigem Medium ausgesät; ein weiterer Teil wurde unstimuliert belassen, so dass das Zytokinprofil in etwa dem *in vivo* entsprach. Die MLN-Zellen der PBS-Gruppe reichten nicht aus, um das Zytokinprofil sowohl nach Stimulation, als auch ohne Stimulation zu bestimmen, daher wurde entschieden nur die Zytokinsekretion ohne Stimulation zu messen, da dies einen Schluss auf die Zytokinsekretion *in vivo* zuließ. Es wurden die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF mittels der Luminex[®]-Methode gemessen, IFN- γ wurde mit Hilfe eines ELISAs bestimmt.

Das im Zusammenhang mit intestinalen Entzündungen als antiinflammatorisch zu bezeichnende Zytokin IL-4 zeigte ohne Stimulation bei allen Gruppen die gleiche Sekretionsrate (Abb. 4.17 A). Nach Stimulation war die Sekretion in allen Gruppen tendenziell etwas höher als bei der CD62L⁺-Gruppe, wobei der Unterschied nur bei den MLN-Zellen der VB Gp96/Pep-Gruppe signifikant war ($p < 0,01$, t-Test, Abb. 4.17 B).

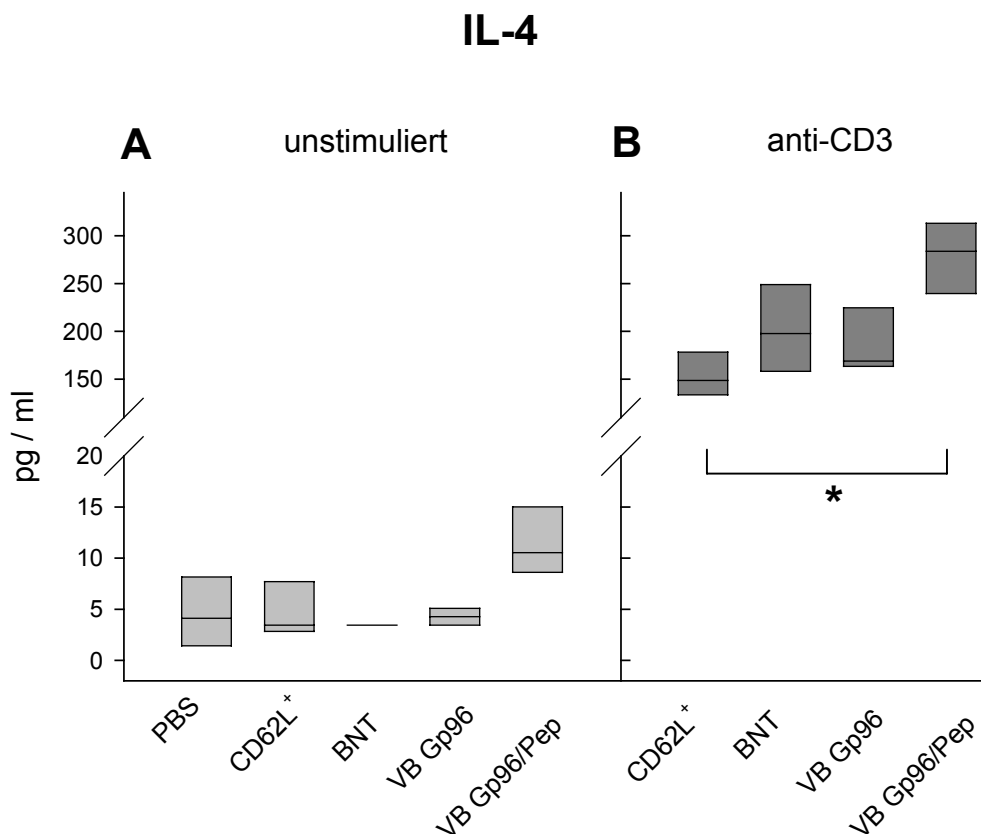


Abb. 4.17.: IL-4-Produktion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Ohne Stimulation (A) gab es keine signifikanten Unterschiede in der IL-4-Sekretion. Wenn die Spendertiere mit Gp96/Pep behandelt wurden, war die IL-4-Sekretion in den MLN nach Stimulation (B) im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe erhöht. * $p < 0,01$, t-Test.

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde von MLN-Zellen ohne Stimulation bei der VB Gp96-Gruppe signifikant weniger sezerniert als von Zellen der CD62L⁺-Gruppe (Abb. 4.18, A). Die Abnahme war signifikant ($p = 0,05$, t-Test). MLN-Zellen der VB Gp96- und der BNT-Gruppe sezernierten nach Stimulation signifikant weniger IL-6 als MLN von CD62L⁺-Tieren (CD62L⁺ vs. VB Gp96 $p < 0,05$; CD62L⁺ vs. BNT $p < 0,05$, t-

Test). MLN-Zellen der VB Gp96/Pep-Gruppe zeigten lediglich eine tendenzielle Abnahme der IL-6-Produktion (Abb. 4.18 B).

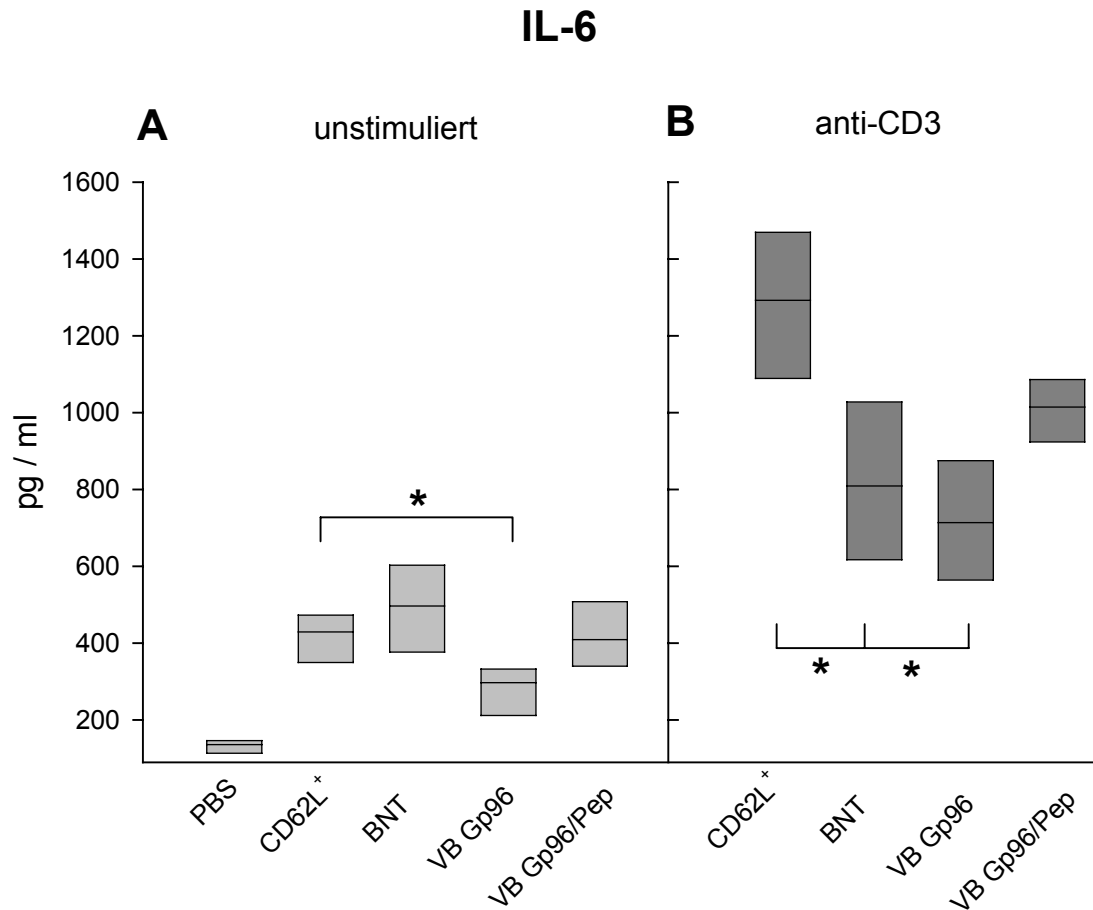


Abb. 4.18: IL-6-Produktion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Ohne Stimulation war die IL-6-Sekretion der Gp96-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen reduziert. Nach Stimulation zeigten die Zellen aus Tieren, deren Donoren mit Gp96 behandelt worden waren und Zellen der Tiere, die nach dem Transfer behandelt wurden eine deutlich reduzierte IL-6-Sekretion im Vergleich zu Tieren, die normale CD4⁺ CD62L⁺ Zellen erhalten hatten. * $p \leq 0,05$, t-Test.

Ohne Stimulation war die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in den MLN-Zellen der CD62L⁺ Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen am höchsten ($p < 0,005$, t-Test). Die IL-10 Expression von MLN-Zellen der BNT-Gruppe war gegenüber der PBS-Gruppe leicht erhöht ($p < 0,05$, t-Test), die IL-10-Sekretion der VB Gp96-Gruppe, war gegenüber der PBS-Gruppe leicht herabgesetzt ($p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.19 A). Die IL-10-Sekretion war nach Stimulation in der VB Gp96-Gruppe ge-

genüber der CD62L⁺-Gruppe signifikant höher ($p < 0,05$, t-Test). Zwischen den anderen Gruppen war kein Unterschied zu verzeichnen (Abb. 4.19 B) .

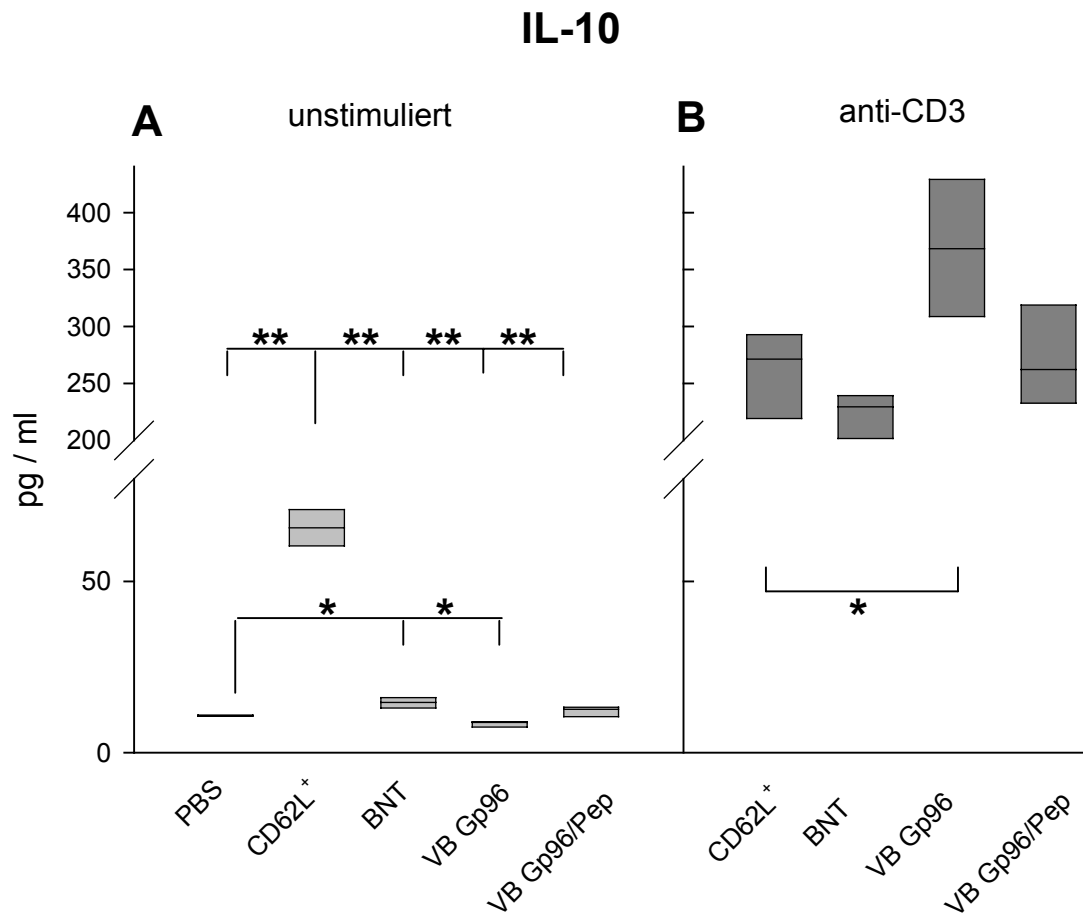


Abb. 4.19: IL-10-Produktion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Ohne Stimulation war die IL-10-Produktion bei Zellen der Gruppe, deren Donoren unbehandelt geblieben waren am höchsten. Die Zellen aus Tieren, deren Donoren mit Gp96 behandelt worden waren, wiesen nach Stimulation die höchste IL-10-Sekretion auf. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, t-Test

Die Expression des im Zusammenhang mit Kolitis als antiinflammatorisch zu bezeichnenden Zytokins IL-13 war ohne Stimulation bei MLN-Zellen der VB Gp96- und der VB Gp96/Pep-Gruppe im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Tieren stark erhöht (CD62L⁺ vs. VB Gp96 $p < 0,002$, CD62L⁺ vs. VB Gp96/Pep $p < 0,0001$, t-Test, Abb. 4.20 A): Die IL-13-Sekretion war nach Stimulation bei den Zellen der CD62L⁺-Gruppe im Vergleich zu den VB Gp96- bzw. VB Gp96/Pep-Gruppen und der BNT-Gruppe signifikant niedriger ($p < 0,0001$, t-Test, Abb. 4.20 B)

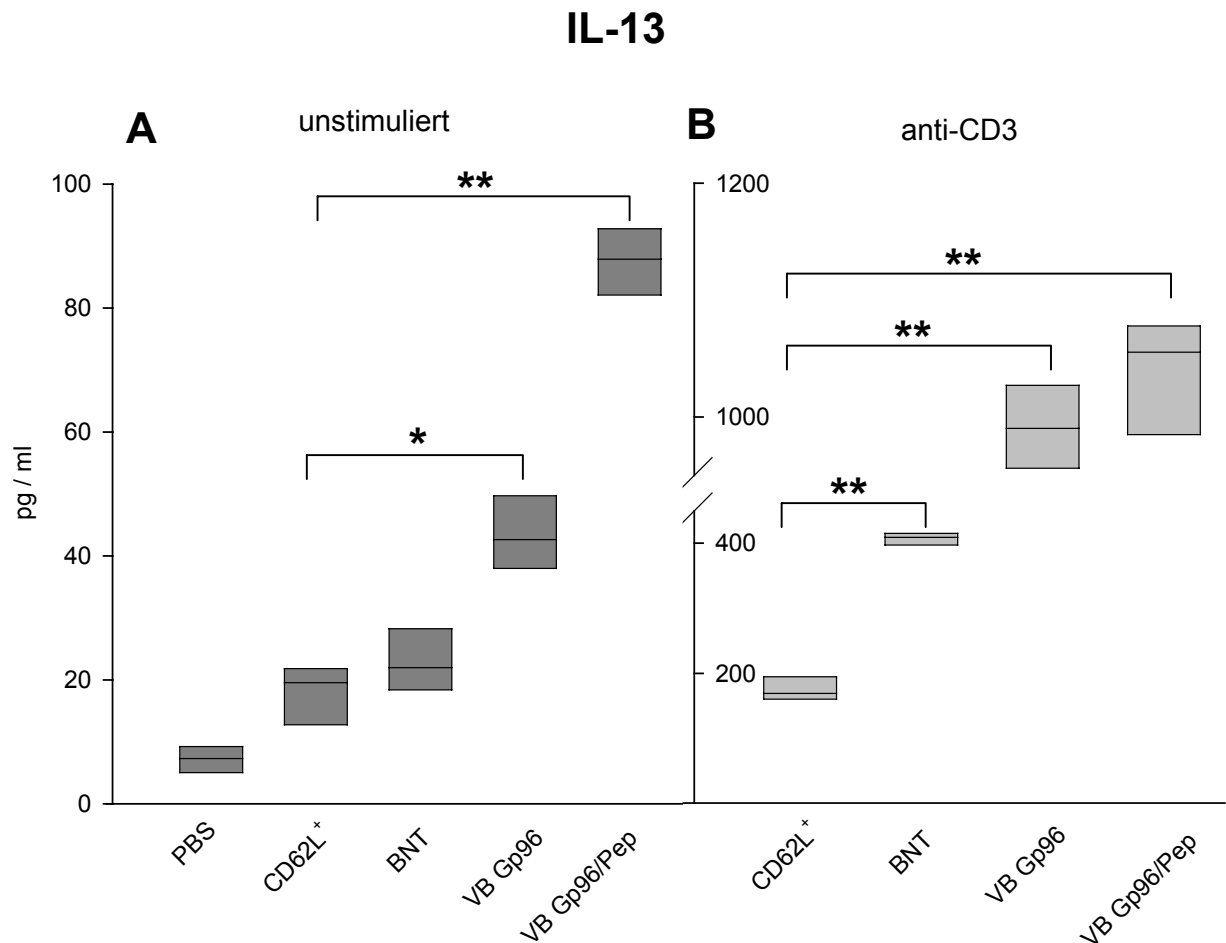


Abb. 4.20: IL-13-Produktion der MLN ohne (A) und Stimulation (B). Sowohl ohne Stimulation, als auch mit Stimulation zeigten die VB Gp96- und die VB Gp96/Pep-Gruppe die höchste IL-13-Sekretion. * $p < 0,002$, ** $p < 0,0001$, t-Test

Die Sekretion eines weiteren proinflammatorischen Zytokins, TNF, wurde ebenfalls mittels Luminex® in den Überständen der MLN-Zellkultur bestimmt. Ohne Stimulation der Zellen, waren deutliche Unterschiede in der TNF Expression zwischen den Gruppen zu erkennen (Abb. 4.21). Im Vergleich zur PBS-Gruppe war die Sekretion von TNF bei der CD62L⁺-Gruppe, bei der BNT-Gruppe und bei der VB Gp96/Pep-Gruppe signifikant erhöht (PBS vs. CD62L⁺ $p < 0,05$; PBS vs. BNT $p = 0,01$; PBS vs. VB Gp96/Pep $p < 0,0005$, t-Test). Im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe wies nur die VB Gp96-Gruppe eine signifikant erhöhte TNF-Sekretion auf ($p = 0,001$, t-Test). Nach Stimulation kam es zu keinem Unterschied in der TNF-Sekretion der MLN-Zellen zwischen den unterschiedlichen Gruppen (Daten nicht gezeigt).

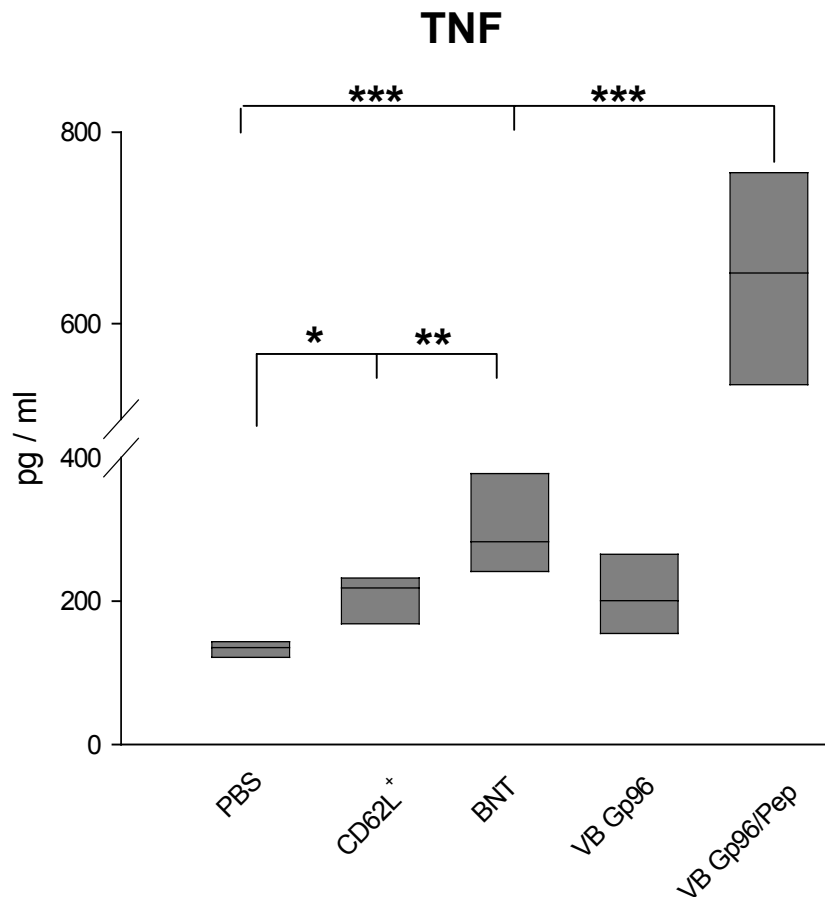


Abb. 4.21: TNF Produktion der MLN ohne Stimulation. Vor allem nach Behandlung der Donortiere mit Gp96/Pep kommt es zu einer stark erhöhten TNF-Produktion in den mesenterialen Lymphknotenzellen. * $p < 0,05$, ** $p = 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t -Test

Die Messung der IFN- γ -Sekretion erfolgte mittels ELISA, da diese Messung im Luminex noch nicht etabliert war. Es zeigte sich, dass ohne Stimulation bei allen Gruppen die IFN- γ Produktion gegenüber der PBS-Kontrollgruppe signifikant erhöht war (PBS vs. CD62L⁺, BNT und VB Gp96 $p < 0,005$; PBS vs. VB Gp96/Pep $p < 0,05$, t -Test). Gegenüber der CD62L⁺-Gruppe war die IFN- γ -Sekretion ebenfalls in allen anderen Gruppen signifikant höher ($p \leq 0,05$, t -Test, Abb. 4.22 A). Nach Stimulation konnte in allen Gruppen gegenüber der CD62L⁺-Gruppe eine signifikant erhöhte IFN- γ -Sekretion festgestellt werden ($p < 0,0005$), wobei die Sekretion in beiden Gruppen, in denen die Donortiere vorbehandelt wurden, gegenüber der BNT-Gruppe nochmals stark erhöht war ($p < 0,0005$, t -Test, Abb. 4.22 B)

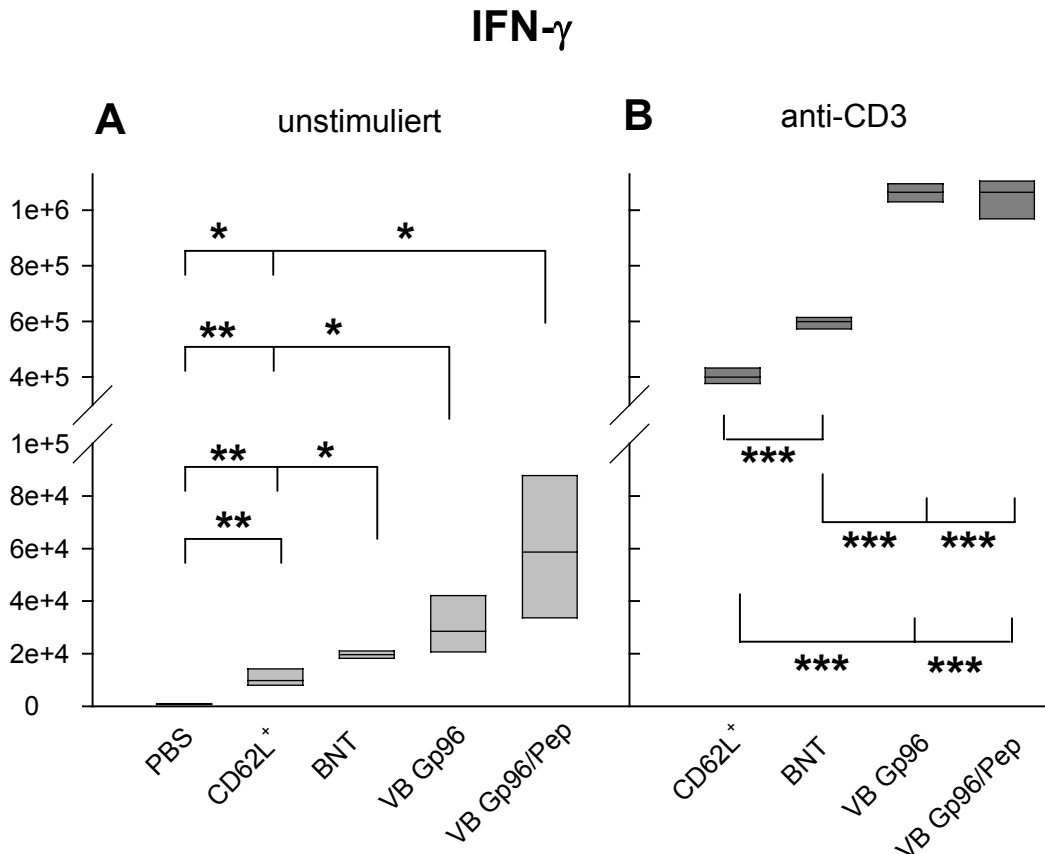


Abb. 4.22: IFN- γ Produktion der MLN ohne (A) und Stimulation (B). Ohne Stimulation war die IFN- γ Expression in allen Gruppen gegenüber der CD62L⁺-Gruppe erhöht (A). Nach Stimulation war die IFN- γ Expression ebenfalls in allen Gruppen gegenüber der CD62L⁺-Gruppe stark erhöht, wobei bei Behandlung der Donortiere nochmals eine Steigerung der Sekretion zu verzeichnen war (B).. * $p \leq 0,05$, ** $p = 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, t-Test

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die MLN aus Tieren, die T-Zellen aus mit Gp96 behandelten Donortieren erhalten hatten, vermehrt antiinflammatorische T_H2-Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) sezernierten. Bei der Behandlung der Spendertiere mit Gp96/Pep und bei der Behandlung nach dem Transfer war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt (Tab. 4.1)

VB Gp96	VB Gp96/Pep	BNT	Zytokin
↑↔	↑	↑↔	IL-4 T _H 2
↓	↔	↓↔	IL-6 T _H 1
↑	↔	↔	IL-10 nach Stimulation
↓↓↓	↓↓	↓↓	IL-10 ohne Stimulation
↑↑	↑↑↑	↑	IL-13 T _H 2
↔	↑	↔	TNF T _H 1
↑↑	↑↑	↑	IFN-γ T _H 1

Tab. 4.1: Veränderung der Zytokine der MLN-Zellen aus Tieren, deren Donoren mit Gp96 bzw. Gp96/Pep bzw. nach dem Transfer behandelt wurden im Vergleich zu Zellen aus Tieren deren Donoren unbehandelt waren (CD62L⁺-Gruppe). ↓ Abnahme, ↑ Zunahme, ↔ unveränderte Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe.

grün unterlegt: antiinflammatorische Zytokine, bzw. antiinflammatorischer Effekt

rot unterlegt: proinflammatorische Zytokine, bzw. proinflammatorischer Effekt

4.7.2 2. Transfer

Da beim ersten Transferversuch die Tiere, die Zellen aus mit Gp96 und Gp96/Pep behandelten Spendertieren erhalten hatten, einen besseren histologischen Score aufwiesen und zudem auch nicht so einen hohen Gewichtsverlust hatten, wurde im zweiten Transfer die Behandlung der Balb/c Spendertiere ausgedehnt, da dies den positiven Effekt verstärken sollte. Die Tiere wurden statt zweimal nun dreimal im Abstand von einer Woche mit je 100 µg Gp96 bzw. Gp96/Pep behandelt, CD4⁺ CD62L⁺-Zellen wurden aus den Milzen isoliert und in CB17 Scid-Mäuse transferiert. Bei diesem Versuch wurde auf die Gruppe, die nach dem Transfer mit Gp96 behandelt wurde, verzichtet, stattdessen wurde die Zahl der Tiere in den einzelnen Gruppen auf sieben erhöht, wobei die PBS-Gruppe eine Ausnahme bildete, hier waren es nur vier Tiere. Es gab also folgende Gruppen: CD62L⁺ (keine Behandlung der Donortiere), VB Gp96 bzw. VB Gp96/Pep (Behandlung der Donortiere) und PBS (kein Transfer).

4.7.2.1 Zytokinprofil der CD4⁺ CD62L⁺ Donorzellen

Da nicht alle isolierten Zellen für den Transfer benötigt wurden, war es möglich das Zytokinprofil der isolierten CD4⁺ CD62L⁺-Zellen, ähnlich wie bei den MLN-Zellen, zu bestimmen (3.13.2). Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert 24 h bei 37 °C inkubiert und ein weiterer Teil wurde mit anti-CD3-Antikörpern für 24 h stimuliert. Die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF wurden mittels der Luminex[®] Technologie bestimmt, IFN- γ wurde per ELISA gemessen.

Nach Stimulation war das im Zusammenhang mit einer Kolitis als anti-inflammatorisch zu bezeichnende Zytokin IL-4 in den beiden vorbehandelten Gruppen im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe signifikant erhöht ($p \leq 0,01$, t-Test, Abb. 4.23), ohne Stimulation hingegen waren keine Sekretionsunterschiede festzustellen (Daten nicht gezeigt).

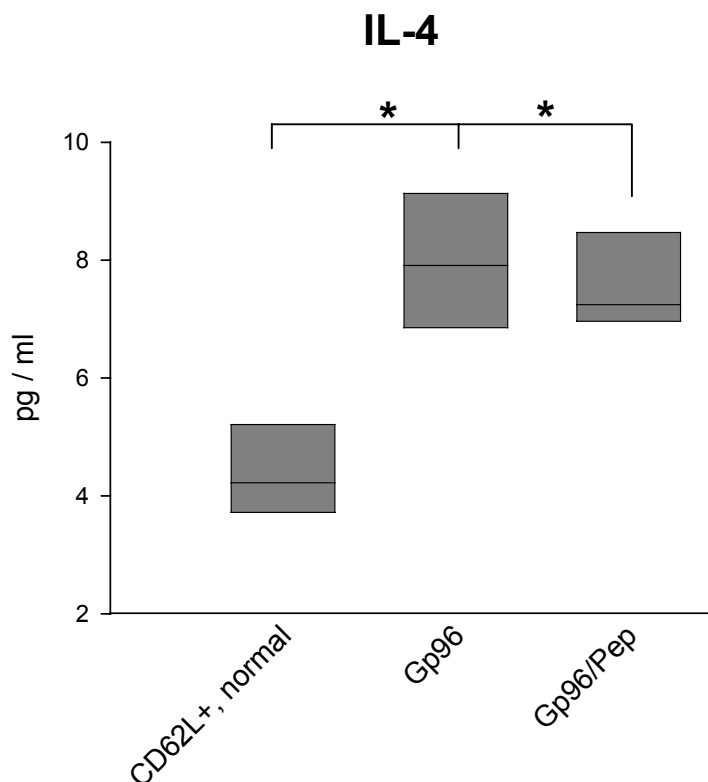


Abb. 4.23: IL-4-Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺ Donorzellen nach Stimulation

Nach Behandlung der Donortiere mit Gp96 und Gp96/Pep kam es zu einer erhöhten IL-4-Sekretion in den Zellen.

* $p \leq 0,01$, t-Test.

Die IL-6-Sekretion war ohne Stimulation in Zellen aus Gp96/Pep-behandelten Tieren stark erhöht (CD62L⁺ vs. Gp96/Pep $p < 0,0005$; Gp96 vs. Gp96/Pep $p < 0,0005$, t-Test), aber auch bei den Gp96-behandelten Tieren lag die IL-6-Sekretion im Vergleich

zu den unbehandelten Tieren signifikant höher ($p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.24 A). Nach Stimulation war die IL-6-Produktion bei den Gp96/Pep-behandelten Tieren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant höher (CD62L⁺ vs. Gp96/Pep $p < 0,05$; Gp96 vs. Gp96/Pep $p < 0,001$, t-Test). Die Zellen aus der Gp96-behandelten Gruppe schienen tendenziell etwas weniger IL-6 zu produzieren als die Zellen der unbehandelten Gruppe, der Unterschied war aber nicht signifikant (Abb. 4.24 B).

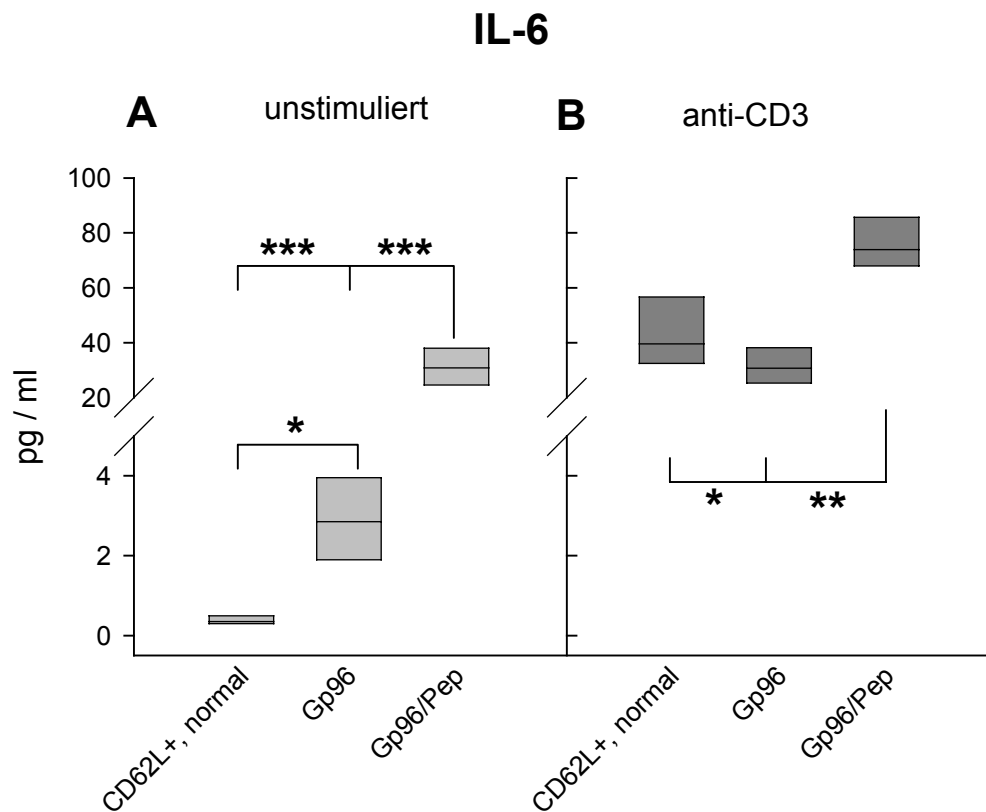


Abb. 4.24: IL-6-Produktion der CD4⁺ CD62L⁺ Donorzellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Sowohl ohne als auch mit Stimulation sezernierten die Zellen aus Tieren mit Gp96/Pep-Vorbehandlung vermehrt IL-6. * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0005$, t-Test.

Das antiinflammatorischen Zytokin IL-10 zeigte lediglich nach Stimulation eine erhöhte Sekretion bei den Zellen der Gp96/Pep-behandelten Tiere. Der Unterschied zu den beiden anderen Gruppen war dabei signifikant ($p = 0,01$, t-Test, Abb. 4.25). Ohne Stimulation war die IL-10-Sekretion bei den Zellen der unbehandelten Tiere ten-

denziell am höchsten, aber es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

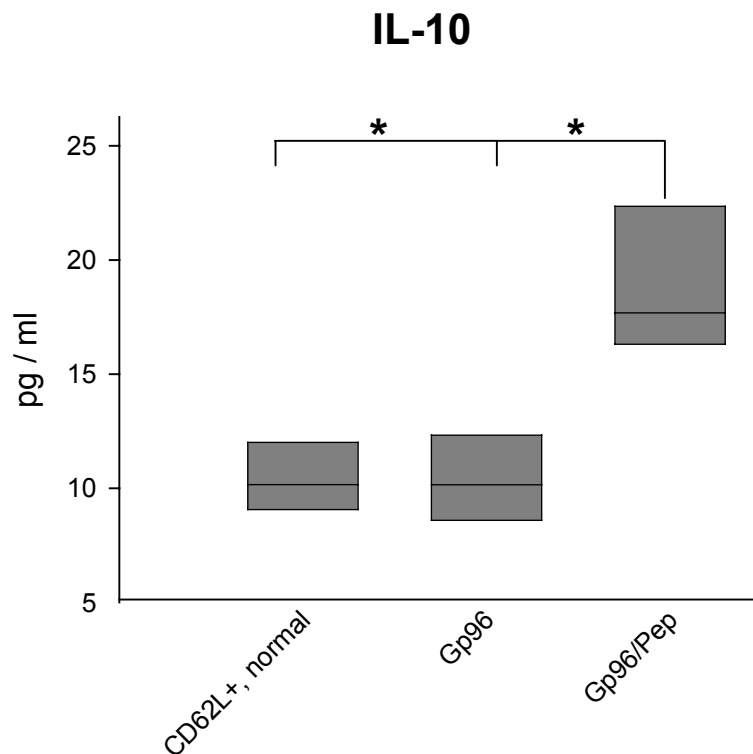


Abb. 4.25: IL-10-Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺ Donorzellen nach Stimulation.

Nach Behandlung der Donortiere mit Gp96/Pep sezernieren die Zellen vermehrt IL-10.

** $p=0,01$, t-Test.*

IL-13, ein Zytokin, welches als IFN- γ Antagonist bei der Makrophagenaktivierung gilt, und (Lungen-) Epithelzellen zu einer erhöhten Schleimproduktion anregt, war nach Stimulation bei Zellen aus Tieren nach Gp96-Behandlung am stärksten sezerniert. Der Unterschied zu unbehandelten Tieren war signifikant ($p<0,05$, t-Test). Die Zellen aus Gp96/Pep-behandelten Tiere sezernierten genauso viel IL-13, wie Zellen unbehandelter Tiere, der Unterschied zur Gp96-Gruppe war aber nicht signifikant (Abb. 4.26). Ohne Stimulation unterschied sich die Sekretion zwischen den Gruppen nicht (Daten nicht gezeigt).

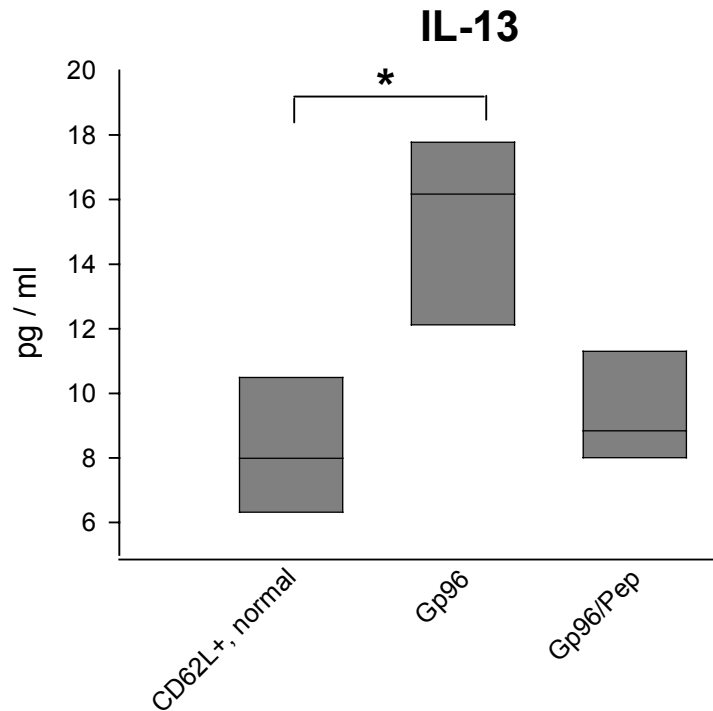


Abb. 4.26: IL-13-Produktion der $CD4^+$ $CD62L^+$ Donorzellen mit Stimulation.

Die Zellen aus mit Gp96 behandelten Mäusen zeigten eine erhöhte IL-13-Sekretion im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Tieren und Tieren die mit Gp96/Pep behandelt worden waren.

* $p < 0,05$, t-Test.

Die TNF-Sekretion war in den Zellen aus unbehandelten Tieren im Vergleich zu den mit Gp96 oder Gp96/Pep behandelten Tieren nach Stimulation fast doppelt so hoch ($p \leq 0,001$, t-Test, Abb. 4.27), wohingegen sie ohne Stimulation in allen drei Gruppen gleich war (ohne Abbildung).

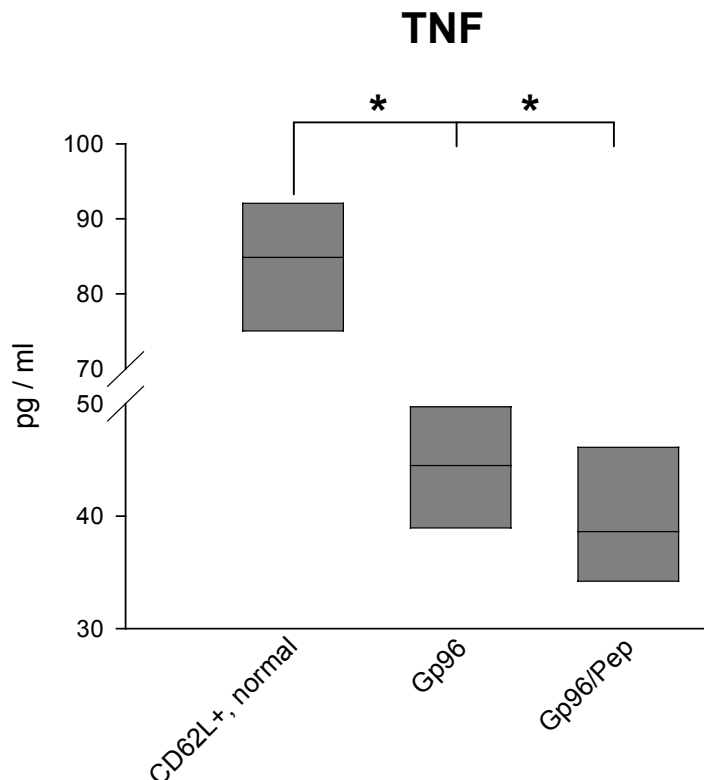


Abb. 4.27: TNF-Sekretion der $CD4^+$ $CD62L^+$ Donorzellen mit Stimulation

Zellen aus unbehandelten Tieren wiesen eine höhere TNF-Sekretion auf als Zellen aus mit Gp96 oder Gp96/Pep behandelten Tieren.*

$p \leq 0,001$, t-Test.

Die IFN- γ -Sekretion wurde mittels ELISA bestimmt. Die Sekretion der unstimulierten Zellen lag dabei unter der Nachweisgrenze, lediglich nach Stimulation war IFN- γ nachweisbar. Tendenziell sezernierten die Zellen aus mit Gp96 behandelten Tieren am wenigsten IFN- γ , der Unterschied zu den beiden anderen Gruppen war dabei aber nicht signifikant (Abb. 4.28).

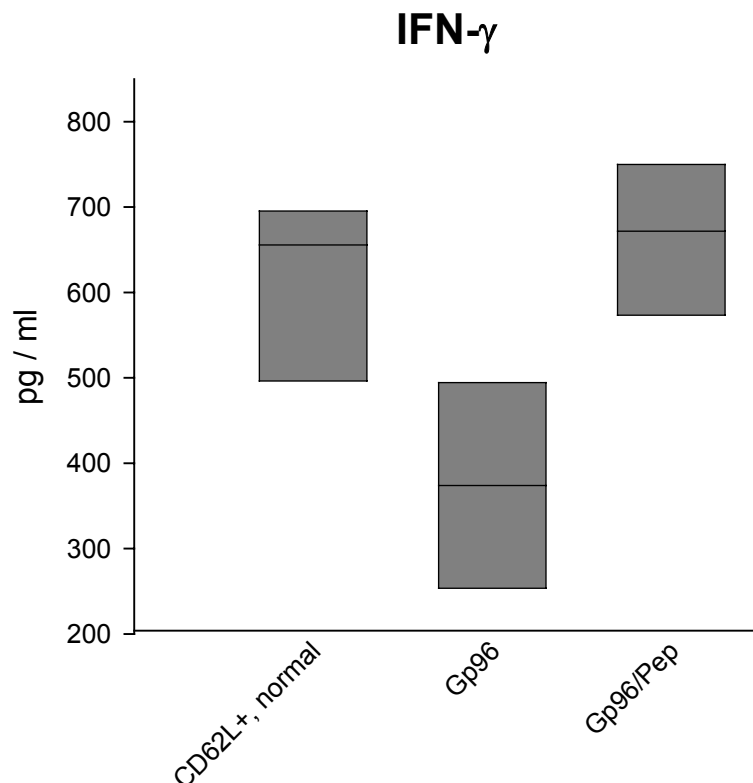


Abb. 4.28: IFN- γ -Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺ Donorzellen mit Stimulation.

Zellen aus mit Gp96 behandelten Tieren wiesen eine tendenziell reduzierte IFN- γ -Sekretion im Vergleich zu den anderen Gruppen auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vermehrt T_H2-Zytokine (IL-4, IL-6, IL-13) im Vergleich zu T_H1-Zytokinen (TNF, IFN- γ) nach Behandlung mit Gp96 und Gp96/Pep in den isolierten CD4⁺CD62L⁺-T-Zellen sezerniert wurden (Tab. 4.2). Den Scid-Tieren, deren Donoren mit Gp96 bzw. Gp96/Pep behandelt worden waren, wurden also T-Zellen appliziert, die T_H2-Zytokine sezernierten, die T-Zellen aus Tieren ohne Behandlung entsprachen eher einem T_H1-T-Zell-Typ.

Gp96	Gp96/Pep	Zytokin
↑	↑	IL-4 T _H 2
↓↔	↑↑	IL-6 T _H 1
↔	↑	IL-10
↑	↔	IL-13 T _H 2
↓	↓	TNF T _H 1
↔↓	↔	IFN-γ T _H 1

Tab. 4.2: Veränderung der Zytokine der Donorzellen aus mit Gp96 und Gp96/Pep behandelten Balb/c Spendertieren im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Donortieren. ↓: Abnahme der Sekretion im Vergleich zu Zellen unbehandelter Tiere; ↑: Zunahme der Sekretion im Vergleich zu Zellen unbehandelter Tiere; ↔ unveränderte Sekretion im Vergleich zu Zellen unbehandelter Tiere.

grün unterlegt: antiinflammatorische Zytokine, bzw. antiinflammatorischer Effekt

rot unterlegt: proinflammatorische Zytokine, bzw. proinflammatorischer Effekt

Es ist bekannt, dass bei CED sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell T_H1-Zytokine hoch reguliert sind, so dass nach diesen Ergebnissen zu erwarten war, dass der Transfer der Zellen vor allem aus mit Gp96 behandelten Tieren eine Verbesserung der Kolitis zur Folge hat.

4.7.2.2 Gewichtsverlauf

Auch bei diesem Transfer-Versuch wurden die Gewichte der Tiere einmal wöchentlich bestimmt und der prozentuale Gewichtsverlust /-gewinn in Bezug zum Anfangsgewicht ermittelt. Abb. 4.29 zeigt die Gewichtskurven der vier Gruppen. Wie auch schon im ersten Transfer wies die PBS-Gruppe einen stetigen Gewichtszuwachs auf. Bei der CD62L⁺-Gruppe zeigte sich in diesem Versuch, kein so deutlicher Gewichtsverlust wie im ersten Transfer. Im ersten Transfer zeigten beide Gruppen, deren Donoren behandelt worden waren, zunächst eine Gewichtsabnahme, wobei die Tiere bis zum Ende des Versuchs ihr Ausgangsgewicht fast wieder erlangt hatten. In diesem Transfer verloren die Tiere der VB Gp96/Pep-Gruppe sehr deutlich an Gewicht. Die VB Gp96-

Gruppe zeigte einen leichten aber nicht dramatischen Gewichtsverlust. Der Verlauf der Gewichtskurven war im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe bei allen anderen Gruppen signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$, allgemeines lineares Modell).

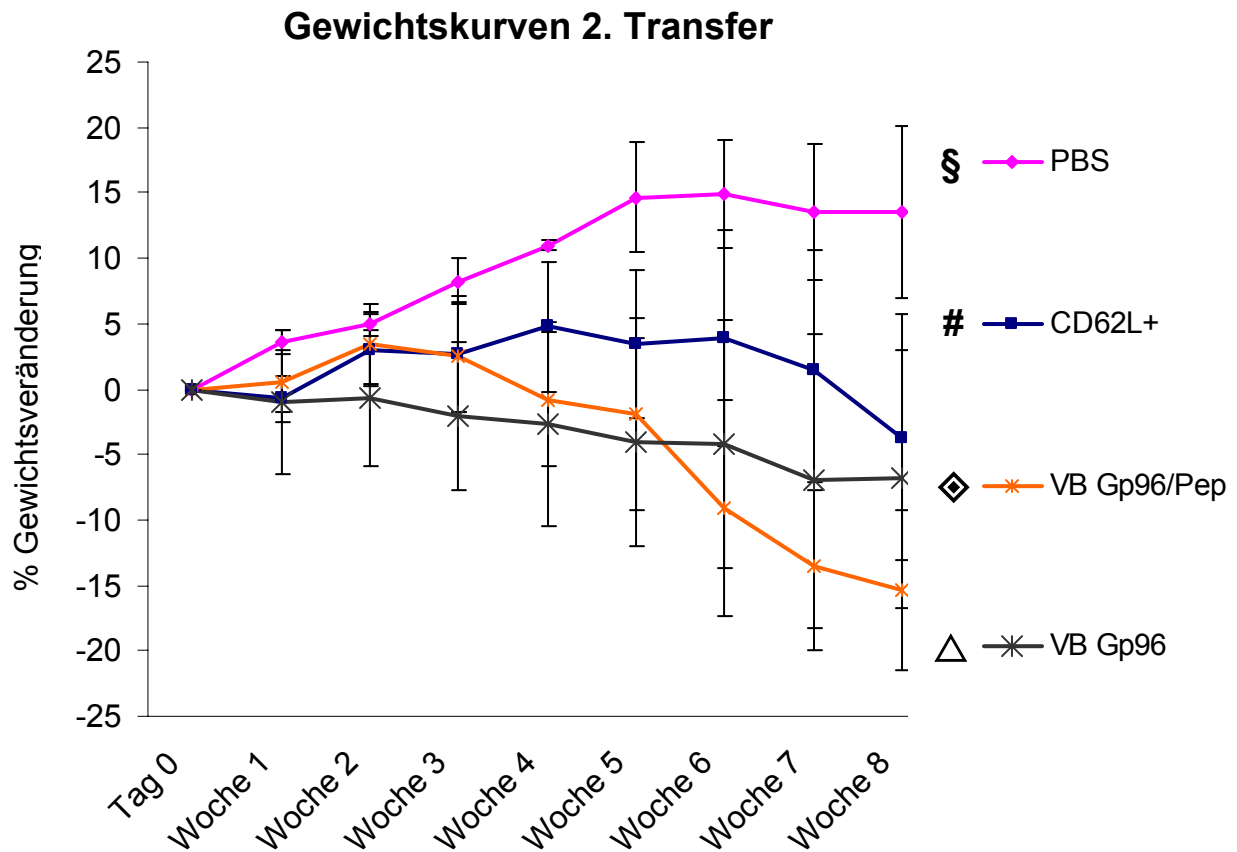


Abb. 4.29: Gewichtsverläufe der Gruppen im 2. Transfer-Versuch. Die Tiere der PBS-Gruppe nahmen deutlich an Gewicht zu, wohingegen alle anderen Gruppen, am stärksten die Tiere der VB Gp96/Pep-Gruppe, an Gewicht verloren. § vs. # $p < 0,001$, # vs. △ $p < 0,001$, # vs. ◇ $p < 0,001$, allgemeines lineares Modell

4.7.2.3 Milzgewichte und Darmlängen

Auch bei diesem Transfer wurden die Milzgewichte und die Darmlängen der einzelnen Tiere ermittelt und der Mittelwert der Gruppen wurde bestimmt. Im Gegensatz zum ersten Transfer, in dem keine Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden konnten, war das in diesem Versuch der Fall. In Abb. 4.30 sind die Milzgewichte und in Abb. 4.31 die Darmlängen dargestellt.

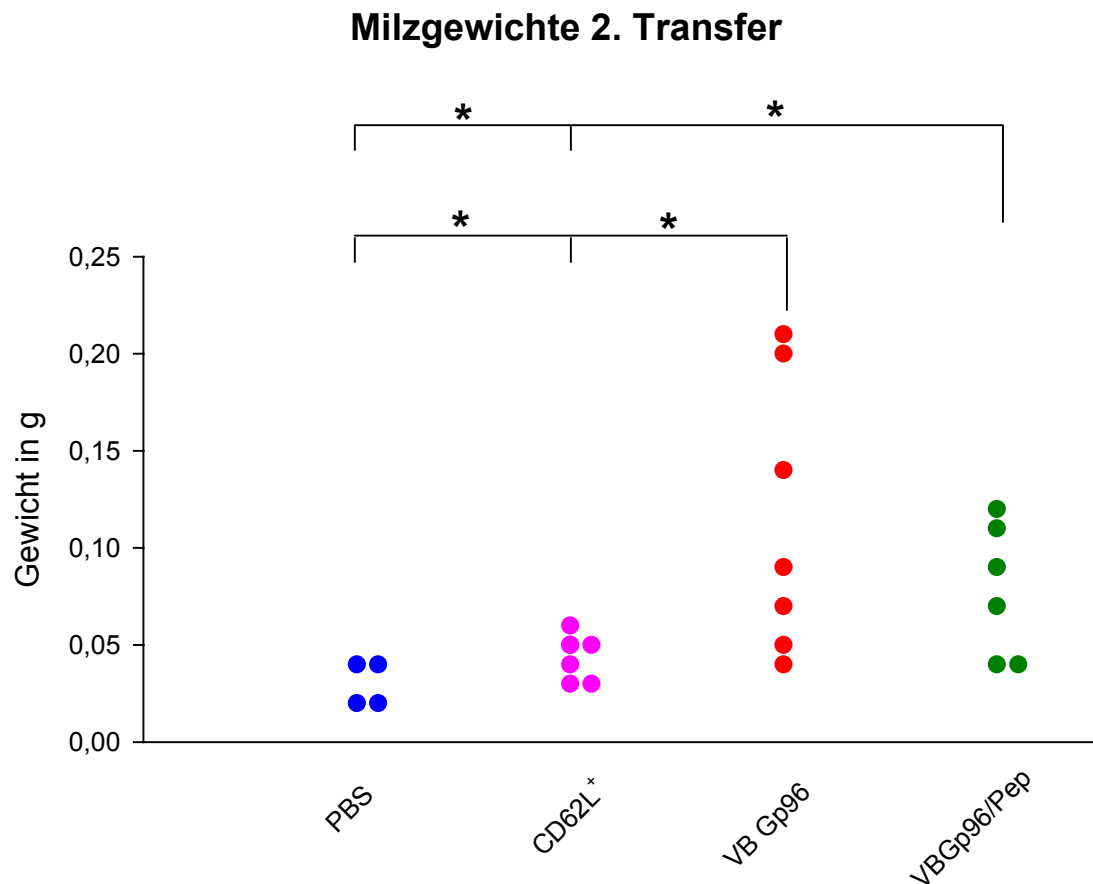


Abb. 4.30: Milzgewichte der Tiere des 2. Transfers. Die Milzen der Tiere, die Zellen aus behandelte Donortieren erhalten hatten, wiesen ein höheres Gewicht auf, als die Milzen der Gruppen, die PBS oder Zellen aus unbehandelten Donortieren erhalten hatten. * $p < 0,05$, t-Test.

Die Milzgewichte der PBS- und der CD62L⁺-Gruppe unterschieden sich nicht; aber die Milzen der Tiere, die Zellen von vorbehandelten Donoren erhalten hatten waren signifikant schwerer als die der PBS-Gruppe ($p < 0,05$, t-Test). Die Milzen der beiden Gruppen hatten auch im Vergleich zu den Tieren der CD62L⁺-Gruppe ein signifikant höheres Gewicht ($p < 0,05$, t-Test), wobei erwähnt werden sollte, dass die Gewichte der einzelnen Tiere stark schwankten.

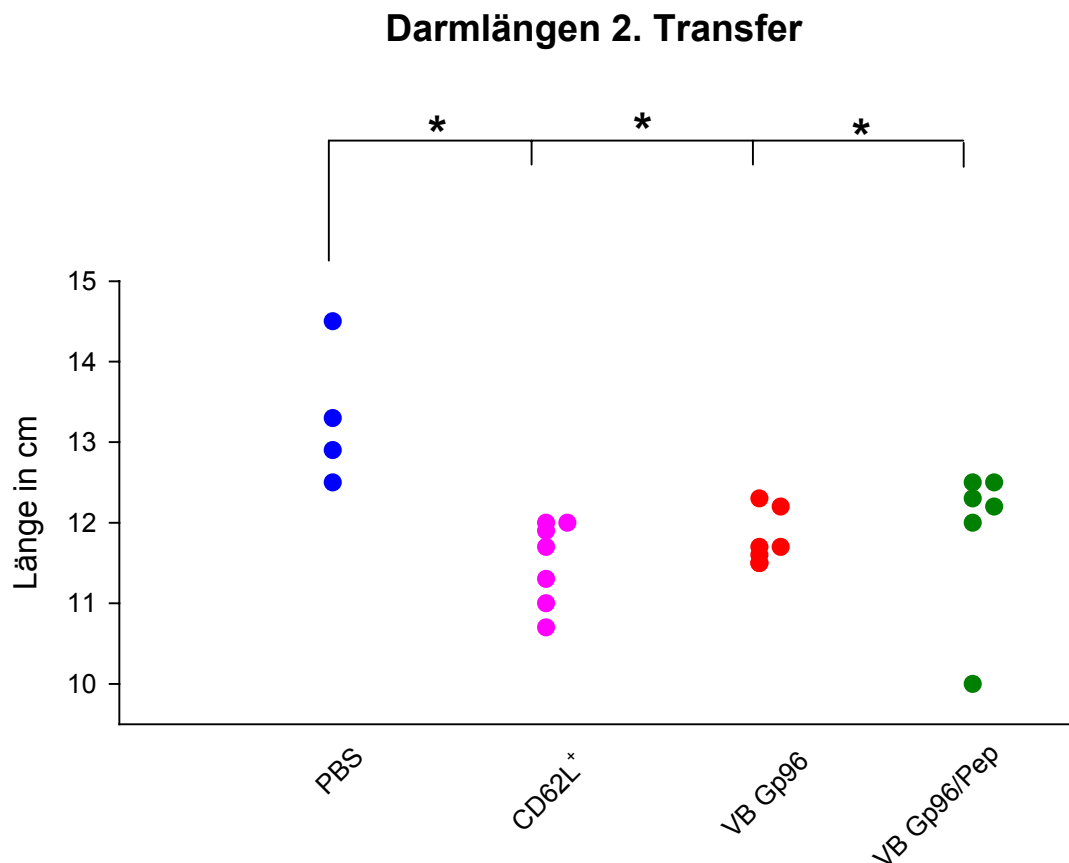


Abb. 4.31: Darmlängen der Tiere des 2. Transfers. Die Tiere, die Zellen aus unbehandelten Donoren erhalten hatten, hatten die kürzesten Därme, wohingegen die Tiere, die Zellen aus behandelten Donoren erhalten hatten tendenziell längere Därme hatten. * $p < 0,05$, t-Test.

Bei den Darmlängen war in diesem Transferversuch ein signifikanter Unterschied zwischen der PBS-Gruppe und den anderen Gruppen zu verzeichnen ($p < 0,05$, t-Test). Innerhalb der anderen drei Gruppen war der Unterschied nicht signifikant, jedoch waren die Därme bei den Gruppen, die Zellen von vorbehandelten Donoren erhalten hatten, tendenziell etwas länger.

4.7.2.4 Histologie

Auch bei diesen zweiten Transfer wurden die histologischen Scores verblindet durch Dr. Florian Obermeier bestimmt und sind in Abb. 4.32 dargestellt. Die mit PBS behandelten Tiere hatten, wie erwartet, keine intestinale Entzündung; der Score lag bei 0.

Die Tiere der CD62L⁺-Gruppe hatten trotz des relativ geringen Gewichtsverlustes (siehe 4.7.2.2) mit einem Score von $2,8 \pm 0,4$ eine recht starke intestinale Entzündung, wie auch schon im ersten Transferversuch. Eine etwas schwächere Entzündung hatten die Tiere der VB Gp96/Pep-Gruppe. Der Score von $2,0 \pm 0,8$ war höher als im ersten Transfer ($1,5 \pm 0,9$) und er war nicht signifikant geringer als der der CD62L⁺-Tiere. Einen signifikant niedrigeren Score hatten aber die Tiere der VB Gp96-Gruppe. Der Score lag bei $1,6 \pm 1,2$ und war damit leicht höher als im ersten Versuch ($1,3 \pm 0,6$). Somit hatten die Tiere lediglich eine leichte intestinale Entzündung im Vergleich zu den Tieren der CD62L⁺-Gruppe ($p < 0,05$, t-Test).

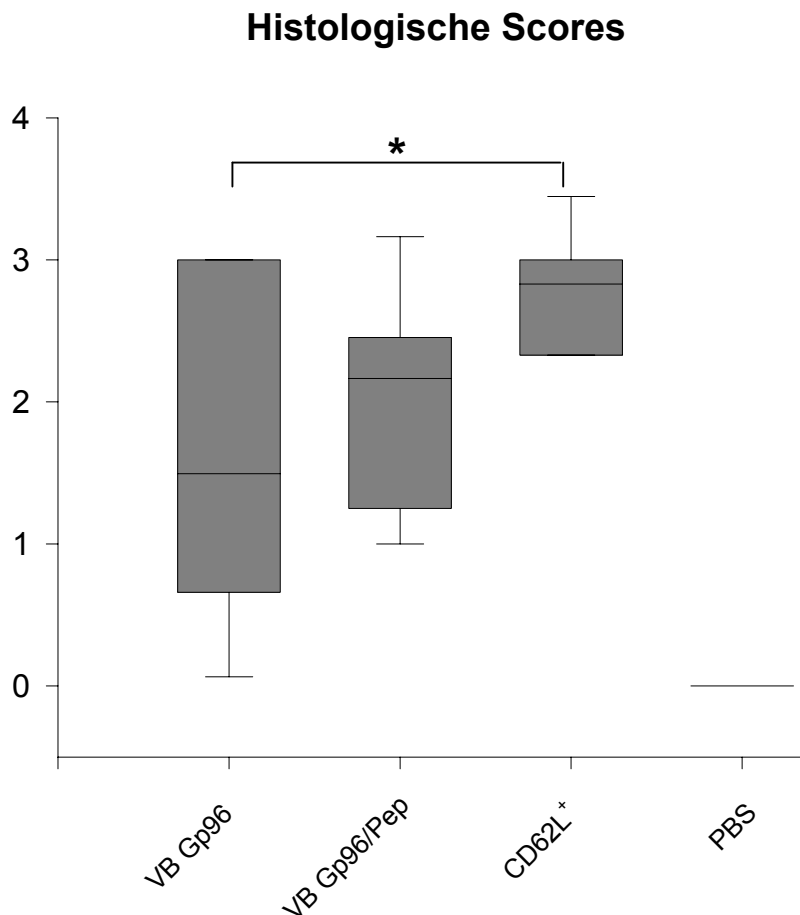


Abb. 4.32: Histologische Scores im 2. Transfer. Die VB Gp96-Gruppe zeigte eine signifikante Verbesserungen im histologischen Score. * $p < 0,05$, t-Test.

In Abb 4.33 ist jeweils ein typisches Bild der Histologie für jede Gruppe dargestellt. Nach Behandlung der Donortiere mit Gp96 ist der Epithelschaden deutlich geringer als bei Tieren der CD62L⁺-Gruppe. Er ist aber auch im Vergleich zur VB Gp96/Pep-Gruppe etwas weniger stark ausgeprägt.

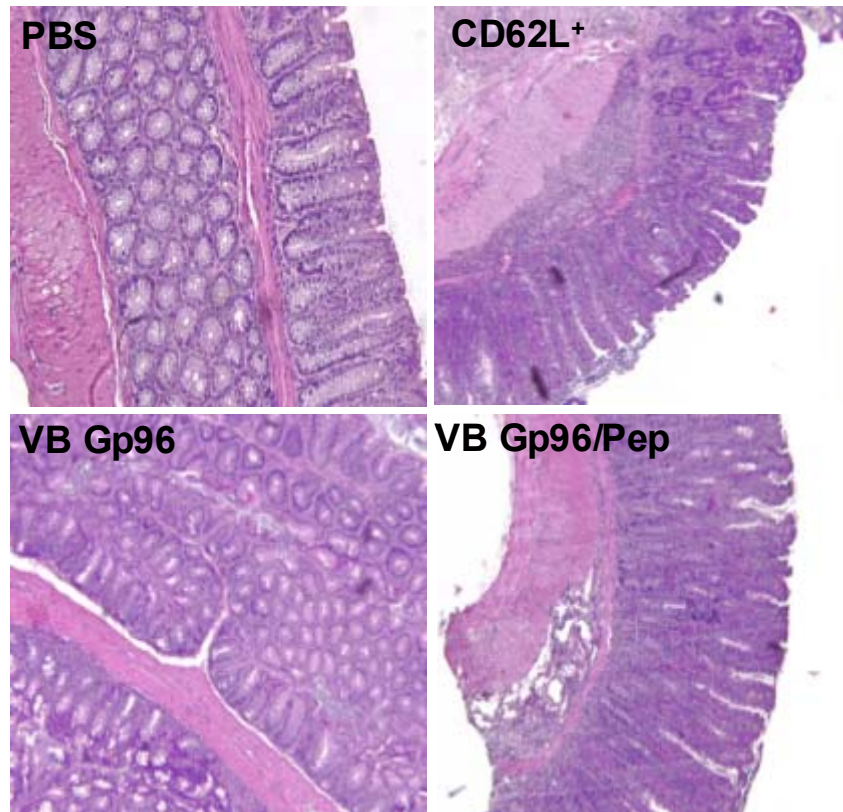


Abb. 4.33: Exemplarische Darstellung eines typischen Ausschnitts der Histologie für jede Gruppe. Bei der VB Gp96-Gruppe ist der Epithelschaden im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe deutlich reduziert.

4.7.2.5 Zytokinsekretion von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten

Auch bei diesem Transfer wurden die isolierten mesenterialen Lymphknotenzellen (MLN-Zellen) für 24 h mit und ohne anti-CD3-Stimulation inkubiert. Bei Stimulation mit anti-CD3 wurde dem Medium IL-2 zugegeben. In den Überständen wurden die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF- α im Luminex[®] und IFN- γ im ELISA nachgewiesen.

Die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 lag bei den unstimulierten Zellen der PBS-, der CD62L⁺ und der VB Gp96-Gruppe unter der Nachweisgren-

ze. Lediglich bei der VB Gp96/Pep-Gruppe zeigte sich eine tendenzielle aber nicht signifikant erhöhte Sekretion (nicht gezeigt).

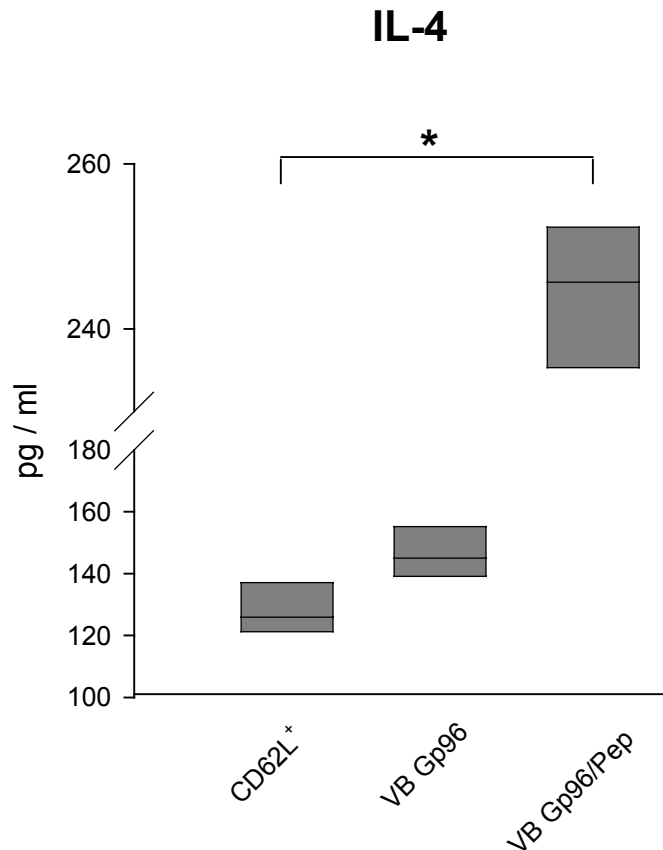


Abb. 4.34: IL-4-Sekretion der MLN-Zellen mit Stimulation. Die Zellen aus den Tieren der VB Gp96/Pep-Gruppe wiesen eine höhere IL-4-Sekretion auf als Zellen der anderen beiden Gruppen.

** $p < 0,005$, t-Test.*

Nach Stimulation war die IL-4-Sekretion in der CD62L⁺-Gruppe und der VB Gp96-Gruppe in etwa gleich, wobei eine tendenziell höhere Expression bei der VB Gp96-Gruppe vorzuliegen schien. Die Sekretion von IL-4 bei den Zellen der VB Gp96/Pep-Gruppe war im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant höher ($p < 0,005$, t-Test, Abb. 4.34).

Auch das proinflammatorische Zytokin IL-6 war in den unterschiedlichen Gruppen verschieden stark sezerniert. Unstimuliert war die IL-6-Sekretion bei den Zellen der PBS-Gruppe, wie erwartet, am niedrigsten. Der Unterschied zu den anderen Gruppen war nicht signifikant. Die Zellen der CD62L⁺-Gruppe sezernierten tendenziell das meiste IL-6, wobei dieser Unterschied im Vergleich zu den anderen Gruppen nicht signifikant war (Abb. 4.35 A). Im ersten Transfer war die IL-6-Sekretion ohne Stimulation in der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe erniedrigt. Nach Stimulation war IL-6 in den Überständen der VB-Gruppen am stärksten exprimiert und die

Erhöhung gegenüber den beiden anderen Gruppen war signifikant ($p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.35 B).

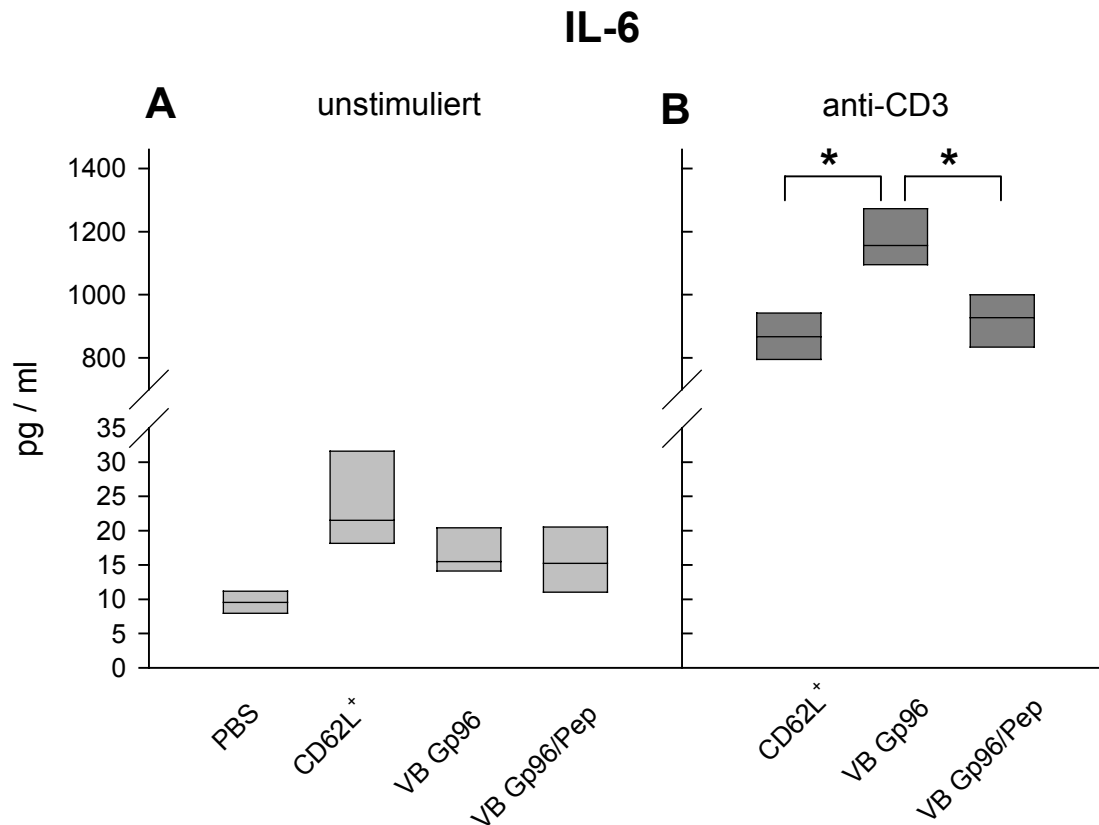


Abb. 4.35: IL-6-Sekretion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Tiere, die Zellen aus mit Gp96 behandelten Donortieren erhalten hatten, wiesen nach Stimulation gegenüber den anderen Gruppen eine erhöhte IL-6-Expression auf. * $p < 0,05$, t-Test

Hier ist ein deutlicher Unterschied zum ersten Transfer zu verzeichnen, da dort die IL-6-Sekretion der MLN-Zellen der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe erniedrigt war.

Bei dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 zeigten sich in diesem Transfer sowohl ohne als auch mit Stimulation keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 4.36). Das war unerwartet, da im ersten Transfer nach Stimulation die IL-10 Expression der Gp96-Gruppe gegenüber den anderen Gruppen, vor allem gegenüber der CD62L⁺ Gruppe, stark erhöht war.

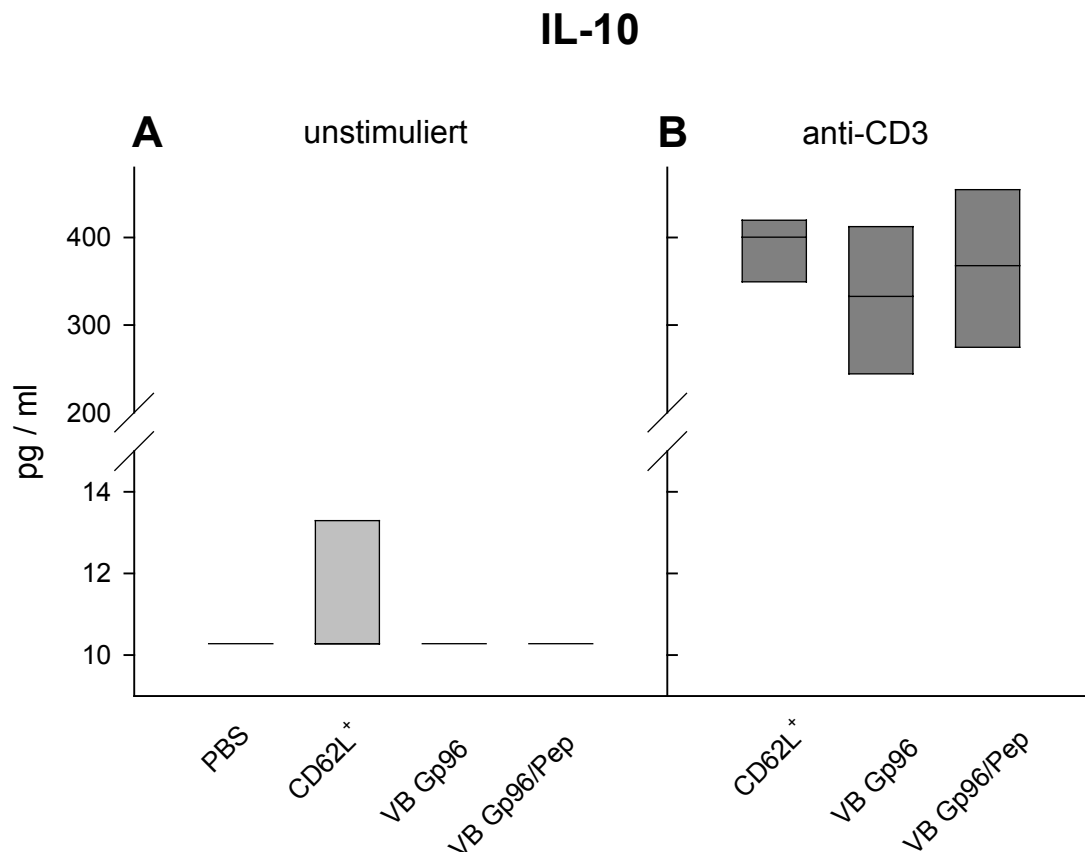


Abb. 4.36: IL-10-Sekretion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Es zeigten sich weder mit noch ohne Stimulation Unterschiede in der IL-10-Sekretion.

Die Absolut-Werte der CD62L⁺-Gruppe unterschieden sich dabei. Im ersten Transfer lag die Sekretion bei etwa 250 pg / ml, in diesem Transfer war sie bei etwa 400 pg / ml. Auch bei den VB-Gruppen waren die Absolut-Werte etwas höher als im ersten Transfer, was vor allem für die VB-Gp96-Gruppe der Fall war. Im ersten Transfer lag die Sekretion bei über 350 pg / ml, im zweiten Transfer lag sie bei etwa 300 pg / ml.

Bei der IL-13-Sekretion zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen. Ohne Stimulation war die IL-13-Sekretion bei den Zellen der PBS-Gruppe und der VB Gp96-Gruppe am geringsten. Der Unterschied zur CD62L⁺-Gruppe war dabei nicht signifikant, wohingegen der Unterschied zur VB Gp96/Pep-Gruppe signifikant war (PBS vs. VB Gp96/Pep $p < 0,05$; VB Gp96 vs. VB Gp96/Pep $p < 0,01$, t-Test). Diese Gruppe produzierte spontan das meiste IL-13 (Abb. 4.37 A). Nach Stimulation zeigten die Zellen der VB Gp96-Gruppe eine signifikant niedrigere IL-13 Expression als die der

beiden anderen Gruppen ($CD62L^+$ vs. VB Gp96 $p < 0,001$; VB Gp96/Pep vs. VB Gp96 $p < 0,05$, t-Test), aber auch die Zellen der VB Gp96/Pep-Gruppe zeigten gegenüber der $CD62L^+$ -Gruppe eine signifikant niedrigere IL-13-Sekretion ($p < 0,01$, t-Test, Abb. 4.37 B).

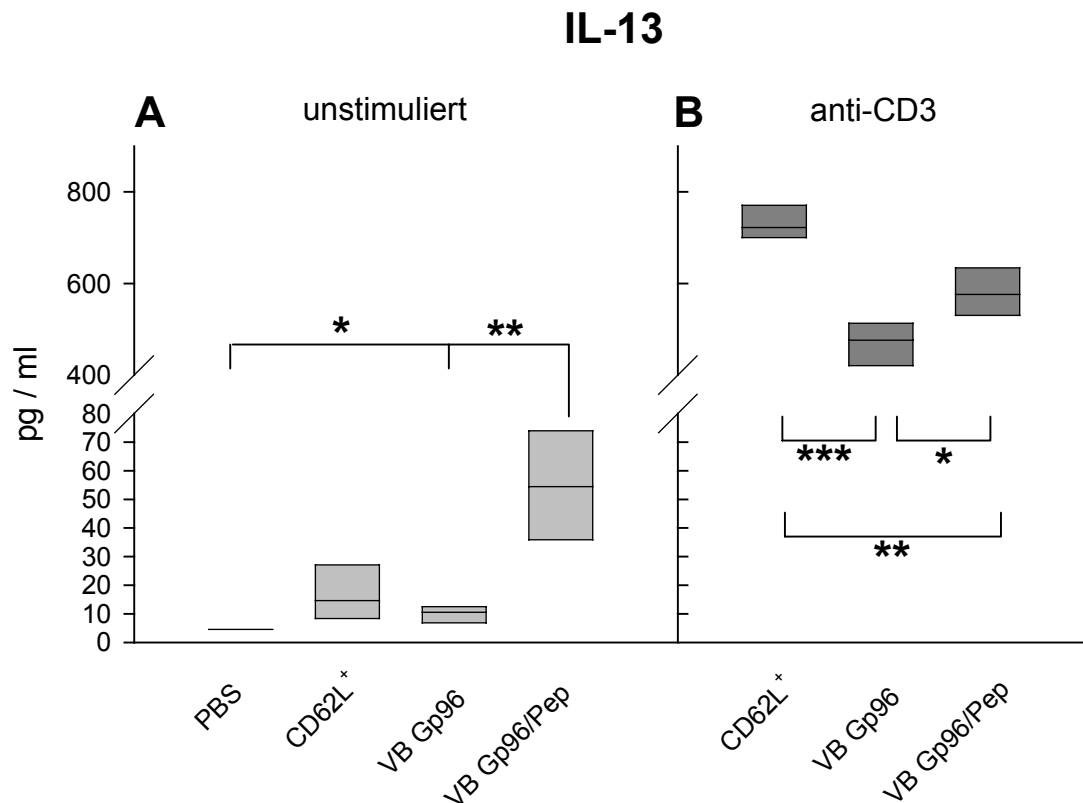
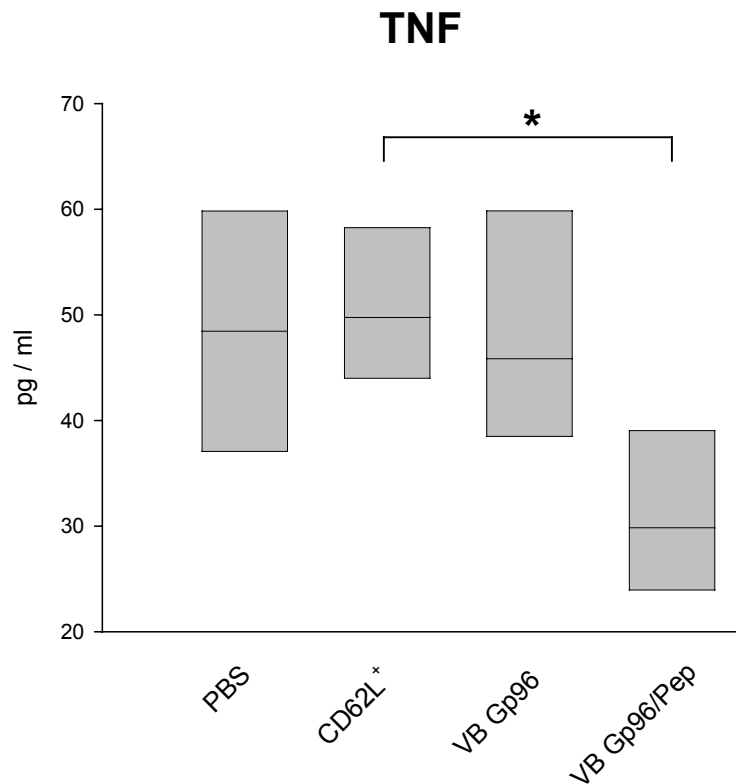


Abb. 4.37: IL-13-Sekretion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Ohne Stimulation zeigten die Zellen VB Gp96/Pep-Gruppe die höchste IL-13-Sekretion (A). Nach Stimulation (B) war die IL-13-Sekretion bei Zellen der VB Gp96-Gruppe am niedrigsten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, t-Test

Der Unterschied zum ersten Transfer ist sehr deutlich, da dort die IL-13-Sekretion bei Vorbehandlung der Spendertiere mit Gp96 deutlich erhöht war. Die Vorbehandlung mit Gp96/Pep zeigte aber in beiden Transfers ein ähnliches Ergebnis.

Über die TNF-Sekretion der Zellen nach Stimulation ließ sich keine Aussage treffen, da alle Werte über dem Maximum lagen (nicht gezeigt). Die Sekretion ohne Stimulation zeigte lediglich beim Vergleich der $CD62L^+$ -Gruppe mit der VB Gp96/Pep-Gruppe eine signifikant geringere TNF-Sekretion ($p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.38). Das war

erstaunlich, da beim ersten Transfer gerade diese Gruppe vermehrt TNF sezerniert hatte.



*Abb. 4.38: TNF-Sekretion der MLN-Zellen ohne Stimulation. Die TNF-Sekretion war nur in der Gruppe, die Zellen aus mit Gp96/Pep behandelten Tieren erhalten hatten, verringert. Die anderen Gruppen wiesen eine ähnliche Expression auf. * $p < 0,05$, t-Test*

Die IFN- γ -Sekretion der MLN-Zellen wurde mittels ELISA bestimmt. Dabei lag die Sekretion bei den unstimulierten Zellen unter der Nachweisgrenze und nur nach Stimulation konnte die IFN- γ Menge bestimmt werden. Die Sekretion war bei MLN-Zellen der aus der VB Gp96-Gruppe tendenziell am niedrigsten. Dieser Unterschied zu den beiden anderen Gruppen war aber nicht signifikant (Abb. 4.39).

Auch hier zeigten sich Unterschiede zum ersten Transfer. Dort war die IFN- γ -Sekretion nach Stimulation bei allen Gruppen im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe erhöht, wobei sie gerade bei den VB-Gruppen am höchsten war.

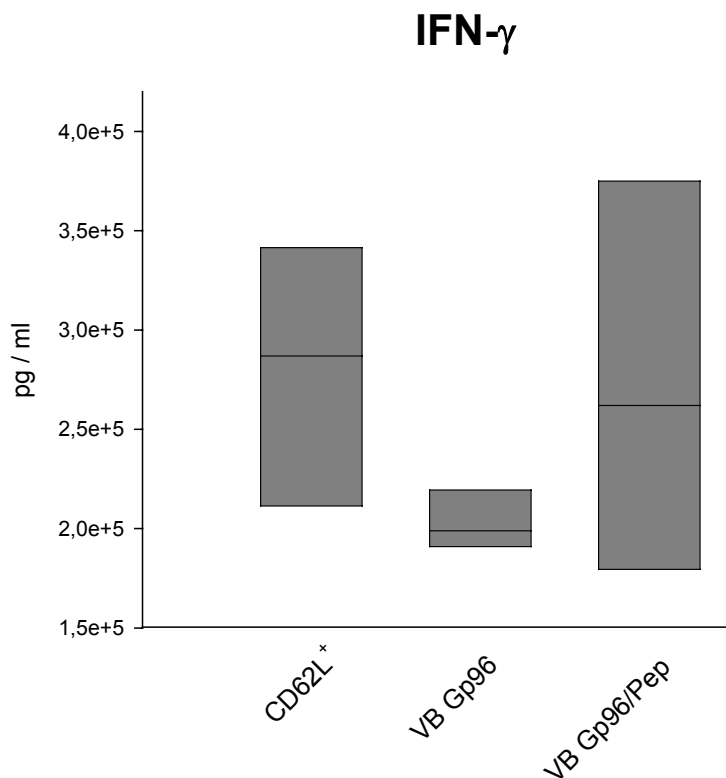


Abb. 4.39: IFN- γ -Sekretiojn der MLN-Zellen mit Stimulation.

Die Gruppe, die Zellen aus mit Gp96 behandelten Spendertieren erhalten hatte, wies tendenziell eine verringerte IFN- γ -Sekretion auf.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass bei Tieren, die Zellen aus dreimal Gp96-vorbehandelten Spendertieren erhalten hatten, kaum ein Unterschied im Zytokinprofil im Vergleich zu Zellen der CD62L⁺-Gruppe auszumachen war. Das steht im Gegensatz zum ersten Transfer (zweimalige Vorbehandlung), bei dem MLN-Zellen dieser Gruppe sehr wohl ein antiinflammatorisches Zytokinprofil aufwiesen. Die dreimalige Behandlung der Donortiere mit Gp96/Pep dagegen, zeigte ein ähnliches Zytokinprofil in den Scid-Tieren, wie die zweimalige Behandlung des ersten Transfers (Tab. 4.3).

VB Gp96	VB Gp96/Pep	Zytokin
↔	↑↑	IL-4 T _H 2
↑	↔	IL-6 T _H 1
↔	↔	IL-10
↓↓	↓	IL-13 T _H 2 nach Stimulation
↔	↑↑	IL-13 T _H 2 ohne Stimulation
↔	↓	TNF T _H 1
↔	↔	IFN-γ T _H 1

Tab. 4.3: Veränderung der Zytokine der MLN-Zellen aus Tieren, deren Donoren mit Gp96 bzw. Gp96/Pep behandelt wurden im Vergleich zu Zellen aus Tieren deren Donoren unbehandelt waren (CD62L⁺ Gruppe). ↓: Abnahme der Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe; ↑: Zunahme der Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe; ↔ unveränderte Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe.

grün unterlegt: antiinflammatorische Zytokine, bzw. antiinflammatorischer Effekt

rot unterlegt: proinflammatorische Zytokine, bzw. proinflammatorischer Effekt

4.7.3 3. Transfer

Bei einem dritten Transfer-Versuch wurden Balb/c-Spendertiere wieder zweimal im Abstand von einer Woche mit jeweils 100 µg Gp96, bzw. denaturiertem Gp96 (Gp96/denat.) behandelt, da sich die dreimalige Behandlung nicht als wirksamer dargestellt hatte, als die zweimalige Behandlung. Mit dem denaturiertem Gp96 sollte ausgeschlossen werden, dass dem entzündungshemmenden Effekt von Gp96 lediglich eine allgemeine Stimulation des Immunsystems der Spendertiere zugrunde liegt. Wäre dies der Fall, so müsste auch denaturiertes Gp96 denselben entzündungshemmenden Effekt haben, wie natives Gp96. Diesmal wurden auch wieder Tiere nach dem Transfer von T-Zellen aus unbehandelten Spendertieren mit je 100 µg Gp96 bzw. Gp96/denat. behandelt. Die Behandlung erfolgte viermal nach Transfer, beginnend am Tag 1 und weitere Behandlungen eine, zwei und drei Wochen nach dem Transfer. Somit ergaben sich insgesamt 6 Gruppen:

CD62L ⁺ :	keine Behandlung der Donortiere, keine Behandlung nach dem Transfer
VB Gp96:	zweimalige Behandlung der Spendertiere mit Gp96
VB Gp96/denat.:	zweimalige Behandlung der Spendertiere mit denaturiertem Gp96
BNT Gp96:	viermalige Behandlung nach T-Zell-Transfer mit Gp96
BNT Gp96/denat.:	viermalige Behandlung nach T-Zell-Transfer mit denaturiertem Gp96
PBS.	Kein T-Zell-Transfer und keine Behandlung

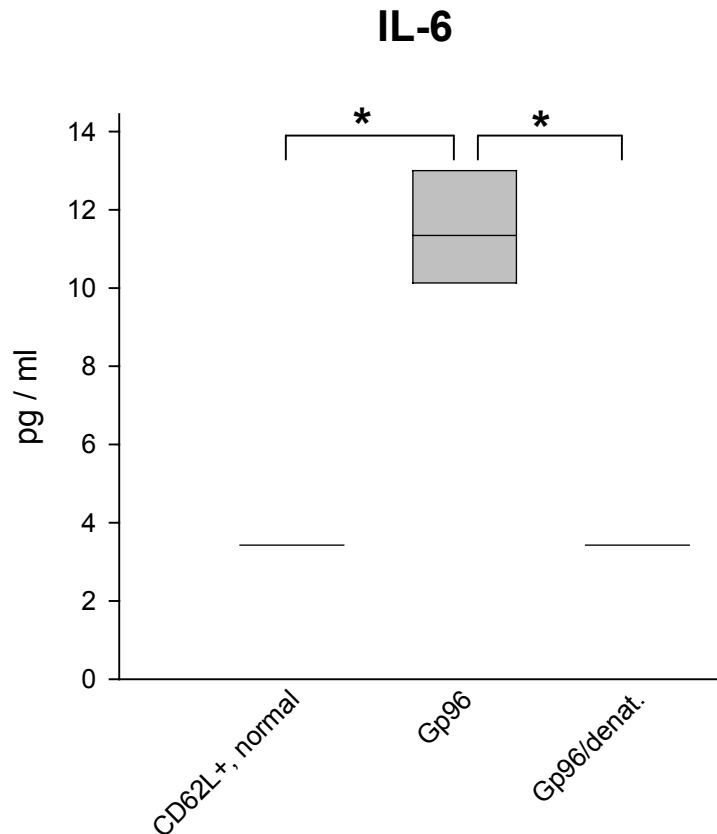
Die Gruppen bestanden aus jeweils 6 Tieren, mit Ausnahme der PBS-Gruppe, die aus nur 4 Tieren bestand.

4.7.3.1 Zytokinprofil der CD4⁺ CD62L⁺-Donorzellen

Nicht alle isolierten Zellen wurden für den Transfer benötigt und so war es möglich das Zytokinprofil der isolierten CD4⁺ CD62L⁺-Zellen, ähnlich wie bei den MLN-Zellen, zu bestimmen (3.13.2). Ein Teil der Zellen wurde unstimuliert 24 h bei 37° C inkubiert und ein weiterer Teil wurde mit anti-CD3 in IL-2-haltigem Medium für 24 h stimuliert. Die Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF wurden mittels der Luminex[®] Technologie bestimmt, IFN- γ wurde per ELISA gemessen.

Die Messung der IL-4-Sekretion ergab keine Daten, da alle Messwerte unter der Nachweisgrenze lagen. Im zweiten Transfer war die Messung von IL-4 bei den Donorzellen möglich gewesen. Dort zeigte sich eine vermehrte Expression von IL-4 nach Behandlung der Tiere mit Gp96 und Gp96/Pep.

Ohne Stimulation sezernierten die Zellen aus mit Gp96 behandelten Tieren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen das meiste IL-6 ($p < 0,0005$, t-Test). Dazu muss erwähnt werden, dass die IL-6 Expression bei der CD62L⁺- und der Gp96/denat.-Gruppe jeweils unter der Nachweisgrenze lag (Abb. 4.40). Nach Stimulation zeigte sich für die IL-6-Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺-Zellen keine Unterschiede in der Menge (nicht gezeigt).



*Abb. 4.40: IL-6-Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺-Zellen ohne Stimulation. Die IL-6-Menge lag bei den unbehandelten und den Tieren, die Gp96/denat. erhalten hatten, unter der Nachweisgrenze. Im Vergleich dazu war die Sekretion in Zellen der Gp96-Gruppe deutlich erhöht. * $p < 0,0005$, t-Test*

Hier zeigte sich ein Unterschied zu den Donorzellen des zweiten Transferversuches, bei dem die IL-6-Sekretion nach Behandlung mit Gp96 im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Tieren keinen Unterschied aufwies.

Für IL-10 war eine Aussage zu Unterschieden in der sezernierten Menge ohne Stimulation nicht möglich, da die Menge bei allen drei Gruppen unter der Nachweisgrenze lag (nicht gezeigt). Nach Stimulation war die Sekretion bei Zellen der unbehandelten Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen am höchsten ($p \leq 0,02$, t-Test). Die Menge bei den Gruppen, die mit Gp96 bzw. Gp96/denat. behandelt worden waren, war in etwa gleich (Abb. 4.41).

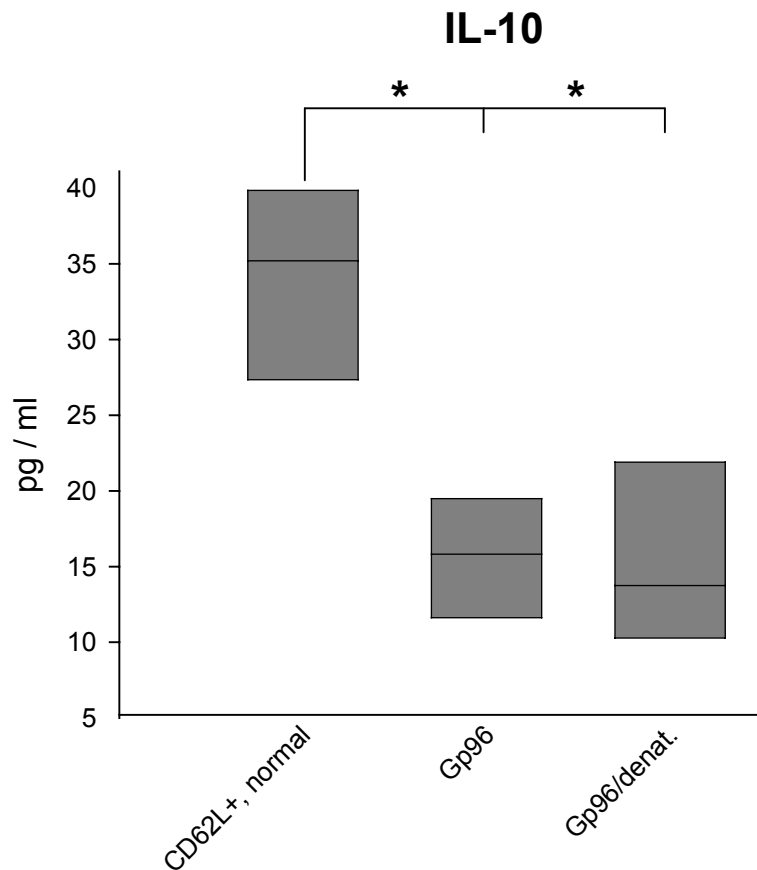


Abb. 4.41: IL-10-Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺-Zellen nach Stimulation. Die IL-10-Menge war nach Stimulation bei Zellen aus unbehandelten Tieren gegenüber den anderen beiden Gruppen deutlich erhöht.

* $p \leq 0,02$, t-Test

Im zweiten Transfer war die Sekretion von IL-10 in den Zellen aus unbehandelten Tieren und aus Tieren, die mit Gp96 behandelt worden waren, gleich.

Für die Sekretion von IL-13 zeigte sich ohne Stimulation kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen. Lediglich die Zellen der Gp96/denat.-Gruppe sezernierten tendenziell mehr IL-13 (Abb. 4.42 A). Nach Stimulation war die Sekretion bei Zellen der unbehandelten Gruppe am höchsten (CD62L⁺ vs. Gp96 $p < 0,02$; CD62L⁺ vs. Gp96/denat. $p = 0,0002$, t-Test, Abb. 4.42 B). Auch hier war ein Unterschied zum zweiten Transfer festzustellen, da dort die IL-13-Sekretion nach Stimulation bei Zellen der Gp96-Gruppe am höchsten war.

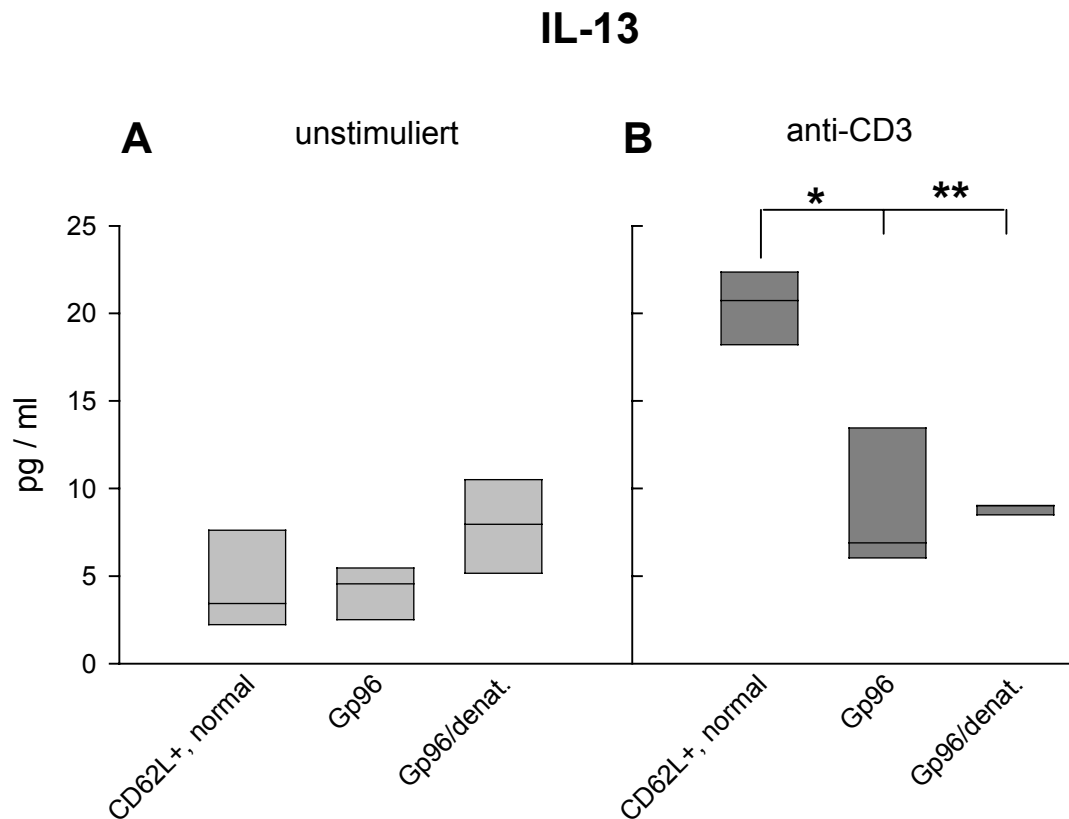


Abb. 4.42: IL-13-Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺-Zellen ohne (A) und mit (B) Stimulation. Ohne Stimulation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die IL-13-Menge war nach Stimulation bei Zellen aus unbehandelten Tieren gegenüber den anderen beiden Gruppen deutlich erhöht. * $p \leq 0,02$, ** $p = 0,0002$, t-Test

Die TNF-Sekretion war ohne Stimulation im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen bei Zellen aus mit Gp96 behandelten Tieren am höchsten (Gp96 vs. CD62L⁺ $p < 0,01$; Gp96 vs. Gp96/denat. $p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.43 A). Nach Stimulation ergab sich kein signifikanter Unterschied in der TNF-Sekretion zwischen den Gruppen (Abb. 4.43 B), wobei Zellen der Gp96/denat.-behandelten Gruppe tendenziell mehr TNF sezernierten. Im Vergleich zum zweiten Transfer-Versuch ergab sich auch hier ein Unterschied. Im vorangegangenen Transfer war die TNF-Sekretion bei Zellen aus vorbehandelten Tieren im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Tieren reduziert.

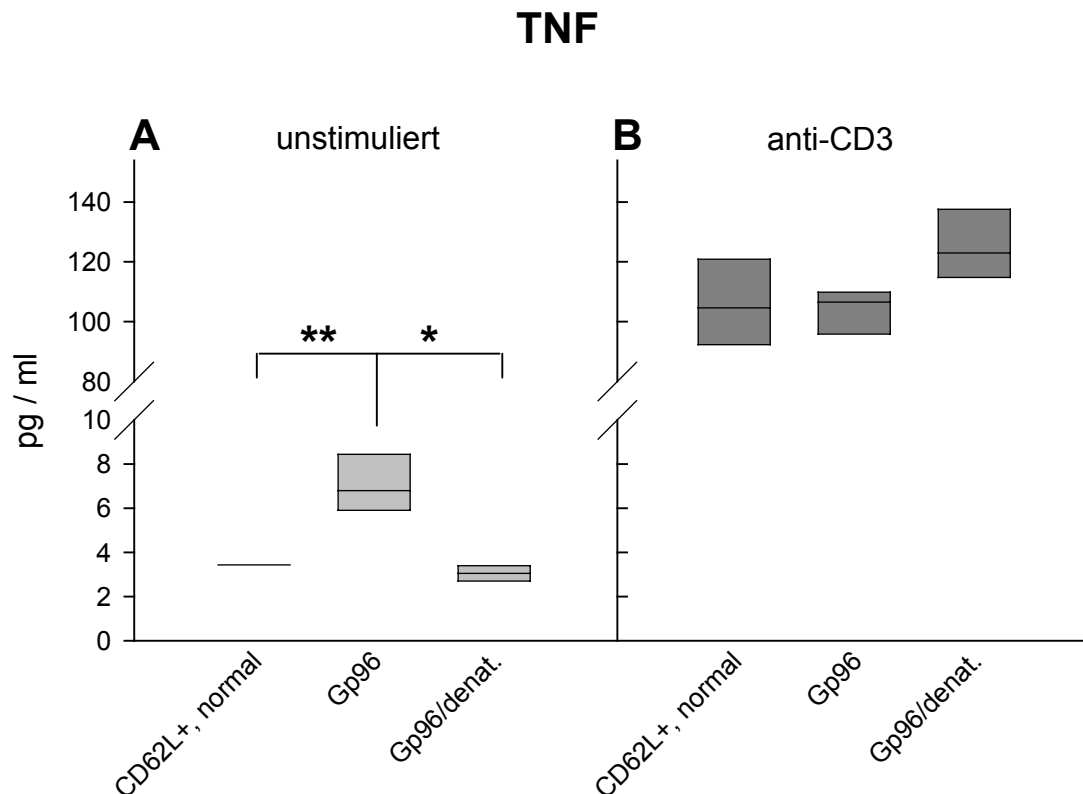


Abb. 4.43: TNF-Sekretion der $CD4^+ CD62L^+$ -Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Zellen der Tiere, die mit Gp96 behandelt worden waren, zeigten unstimuliert eine deutlich erhöhte Sekretion. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, t-Test

Die $IFN-\gamma$ -Sekretion unterschied sich ohne Stimulation zwischen allen drei Gruppen. Sie war bei Zellen aus unbehandelten Tieren im Vergleich zu Zellen aus den beiden behandelten Gruppen deutlich höher ($CD62L^+$ vs. Gp96 $p < 0,005$, $CD62L^+$ vs. Gp96/denat. $p < 0,005$, t-Test). Zellen aus Gp96-behandelten Tieren wiesen die niedrigste $IFN-\gamma$ -Sekretion auf. Diese Menge war auch im Vergleich zu mit Gp96/denat. behandelten Tieren signifikant niedriger ($p < 0,005$, t-Test, Abb. 4.44 A). Nach Stimulation war die $IFN-\gamma$ -Sekretion in Zellen der unbehandelten Gruppe und der Gp96-behandelten Gruppe in etwa gleich hoch. Bei Zellen aus mit denaturiertem Gp96 behandelten Tieren lag die Expression etwas niedriger, wobei der Unterschied nur im Vergleich zu Zellen aus Gp96 behandelten Tieren signifikant war ($p = 0,01$, t-Test, Abb. 4.44 B). Im Vergleich zum vorangegangenen Transfer-Versuch war auch bei $IFN-\gamma$ ein Unterschied in der Sekretion zu verzeichnen. Im zweiten Transfer war die $IFN-\gamma$ -

Sekretion nach Stimulation bei Zellen aus Gp96 behandelten Tieren am niedrigsten. Ohne Stimulation gab es keine Unterschiede in der Expression.

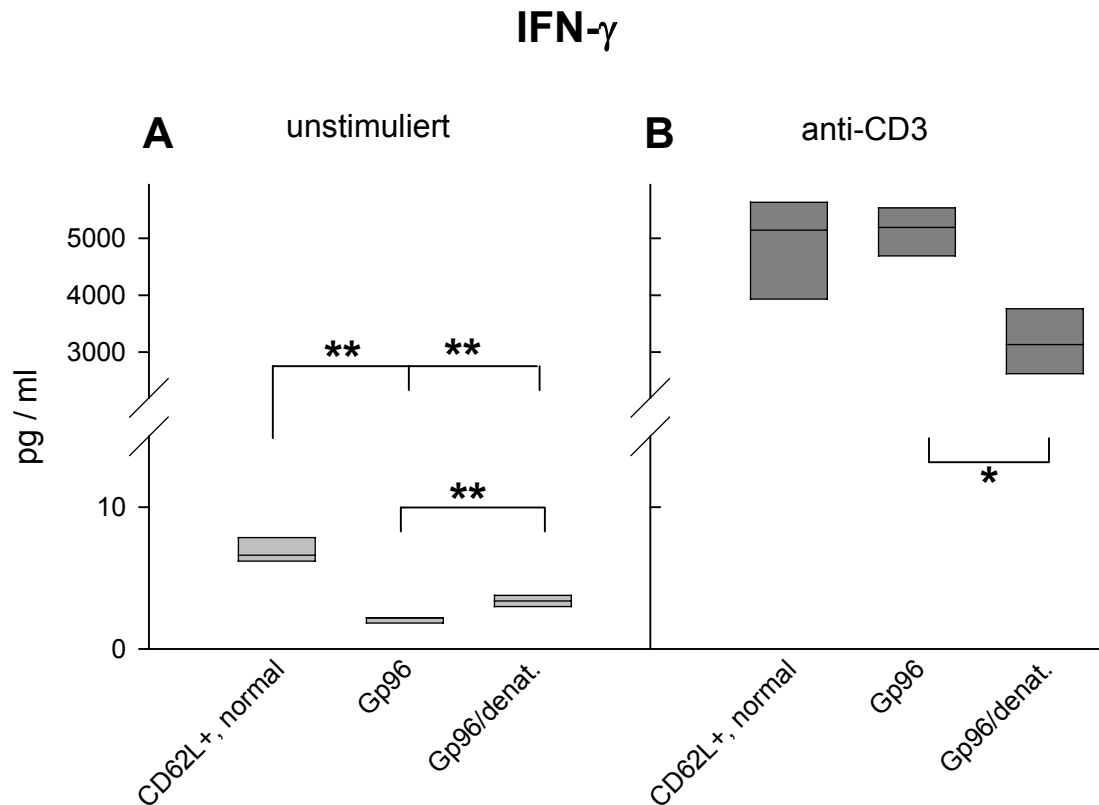


Abb.4.44: IFN- γ -Sekretion der CD4⁺ CD62L⁺-Zellen ohne (A) und mit (B) Stimulation. Ohne Stimulation war die IFN- γ -Menge bei Zellen aus unbehandelten Tieren am höchsten und bei Zellen aus Gp96-behandelten Tieren am niedrigsten. Nach Stimulation war die IFN- γ -Sekretion bei Zellen aus Gp96/denat.-behandelten Tieren herabgesetzt. * $p=0,01$, ** $p<0,005$, t -Test.

Zusammenfassend ergibt sich bei den CD4⁺CD62L⁺-Zellen dieses Transfers, im Vergleich zum zweiten Transfer, kein eindeutiger Hinweis auf einen regulatorischen T-Zell-Typ nach Behandlung der Tiere mit Gp96. Die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 sind im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Donoren erniedrigt und IL-6 wird verstärkt sekretiert. Nur IFN- γ war herabreguliert (Tab. 4.4).

Gp96	Gp96/denat.	Zytokin
-	-	IL-4 T _H 2
↑	↔	IL-6 T _H 1
↓	↓	IL-10
↓↔	↓↔	IL-13 T _H 2
↑	↔	TNF T _H 1
↓	↓	IFN- γ T _H 1

Tab. 4.4: Veränderung der Zytokine der Donorzellen aus Gp96- und Gp96/denat.-behandelten Balb/c-Spendertieren im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Donortieren. ↓: Abnahme der Sekretion im Vergleich zu Zellen unbehandelter Tiere; ↑: Zunahme der Sekretion im Vergleich zu Zellen unbehandelter Tiere; ↔ unveränderte Sekretion im Vergleich zu Zellen unbehandelter Tiere.

grün unterlegt: antiinflammatorische Zytokine, bzw. antiinflammatorischer Effekt

rot unterlegt: proinflammatorische Zytokine, bzw. proinflammatorischer Effekt

4.7.3.2 Gewichtsverlauf

Auch bei diesem dritten Transferversuch zeigten sich, wie auch schon im zweiten Transfer, keine so eindeutigen Gewichtsverläufe wie im ersten Transferversuch. Die Tiere, die nur PBS statt T-Zellen erhalten hatten, nahmen nach anfänglicher Gewichtszunahme ebenso stark ab wie Tiere, die CD62L⁺-Zellen aus unbehandelten Spendertieren erhalten hatten und auch nach dem Transfer ohne Behandlung blieben (Abb. 4.45). Tiere der VB Gp96/denat.-Gruppe wiesen einen sehr starken Gewichtsverlust auf (Abb. 4.45) und 3 der 6 Tiere verstarben während des Versuches. Ebenfalls 3 von 6 Tieren verstarben in der BNT Gp96/denat.-Gruppe. In der BNT Gp96-Gruppe verstarb ein Tier, in allen anderen Gruppen überlebten die Tiere bis zum Ende des Versuches. Der Unterschied im Gewichtsverlauf war bei Tieren der PBS-Gruppe im Vergleich zu Tieren der CD62L⁺-Gruppe signifikant ($p=0,01$, allgemeines lineares Modell). Einen signifikanten Unterschied im Verlauf zeigte auch die CD62L⁺-Gruppe zur VB Gp96/denat.-Gruppe ($p<0,002$, allgemeines lineares Modell). Der Unterschied im Gewichtsverlauf der anderen Gruppen zur CD62L⁺-Gruppe war jeweils nicht signifi-

kant. Auch der Verlauf der Gewichte von VB Gp96- zu VB Gp96/denat.-Tieren und der von BNT Gp96- zu VB Gp96/denat.-Tieren war nicht signifikant.

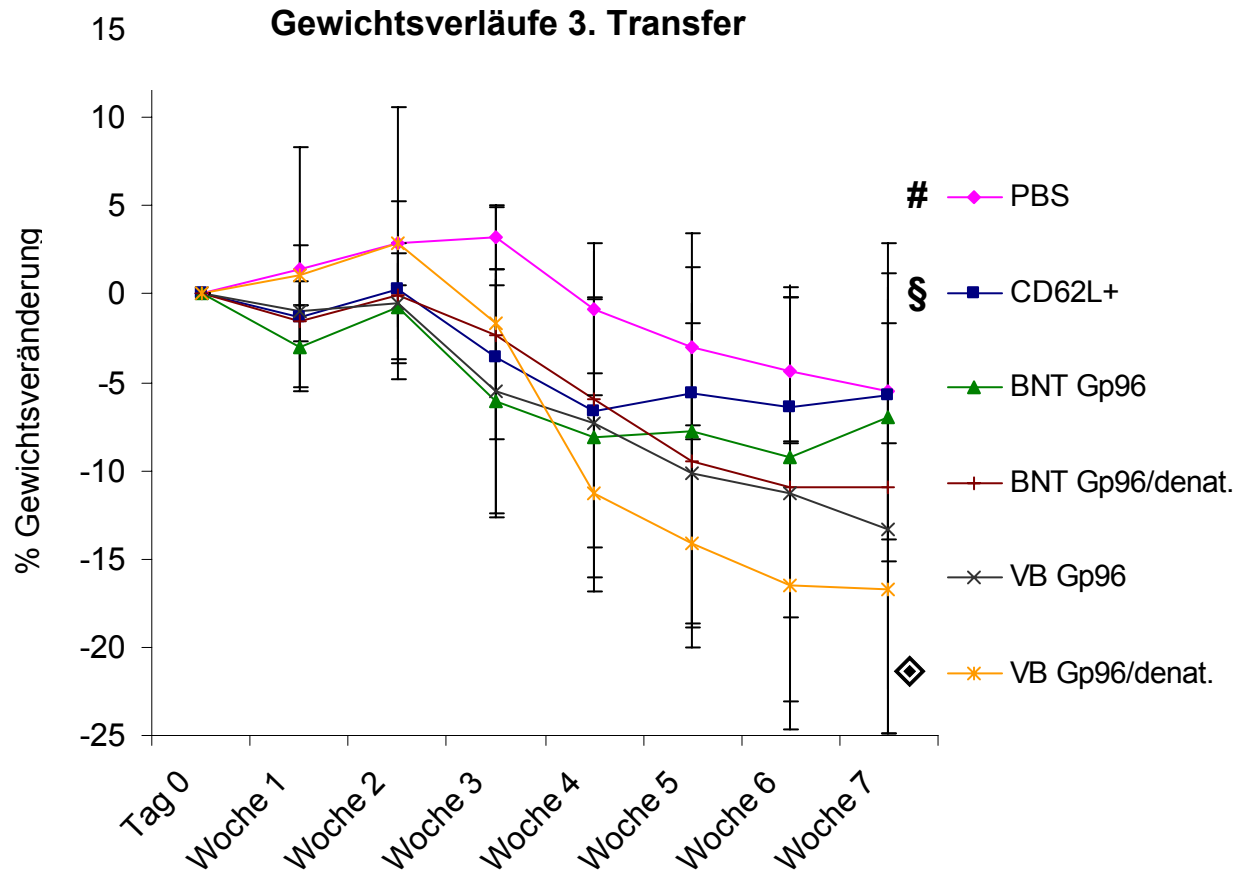


Abb. 4.45: Gewichtsverläufe der Tiere im 3. Transfer. Den stärksten Gewichtsverlust wiesen die Tiere der VB Gp96/denat.-Gruppe auf. Tiere der CD62L⁺-Gruppe zeigten nur einen relativ leichten Gewichtsverlust und auch die PBS-Tiere nahmen entgegen der Erwartung ab. Die anderen Gruppen bewegten sich mit ihren Gewichten zwischen diesen beiden Kurven. # vs. § $p=0,01$, § vs. ✱ $p<0,002$, allgemeines lineares Modell

Aufgrund der Gewichtskurven der Tiere konnte in diesem Versuch nicht auf eine entzündungshemmende Wirkung von Gp96 geschlossen werden. Da aber jeweils 50% der Tiere starben oder frühzeitig getötet werden mussten, die denaturiertes Gp96 erhalten hatten, oder die Zellen aus Gp96/denat.-behandelten Spendern erhalten hatten, konnte geschlossen werden, dass die protektive Wirkung von Gp96, die in den beiden vorangegangenen Transfers erzielt worden war, nicht auf einer unspezifischen Stimulation des Immunsystems der Tiere beruhte.

4.7.3.3 Milzgewichte und Darmlängen

Die Untersuchung der Milzgewichte ergab, dass die Milzen von Tieren der PBS-Gruppe am leichtesten waren. Die Milzen der CD62L⁺-Gruppe zeigten demgegenüber höhere Gewichte, wobei dieser Anstieg nicht signifikant war. Die Milzen der BNT Gp96-Gruppe hatten im Vergleich zur PBS-Gruppe ebenfalls ein höheres Gewicht, aber auch dieser Unterschied war nicht signifikant. Signifikant höhere Milzgewichte als Tiere der PBS-Gruppe hatten Tiere der BNT Gp96/denat.-Gruppe und Tiere der VB-Gruppen (PBS vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,002$; PBS vs. VB Gp96 $p < 0,002$; PBS vs. VB Gp96/denat. $p < 0,02$, t-Test, Abb. 4.46).

Gegenüber der CD62L⁺-Gruppe waren nur die Milzgewichte von Tieren der BNT Gp96/denat.-Gruppe und von Tieren der VB Gp96-Gruppe signifikant erhöht (CD62L⁺ vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,03$; CD62L⁺ vs. VB Gp96 $p < 0,02$, t-Test, Abb. 4.46). Im Vergleich zu den beiden vorherigen Transfer-Versuchen zeigte sich in diesem Parameter kein nennenswerter Unterschied, da auch im zweiten Transfer die Milzgewichte aus Tieren, die Zellen aus vorbehandelten Donortieren erhalten hatten, erhöht waren. Im ersten Transfer gab es keine Unterschiede bei den Milzgewichten.

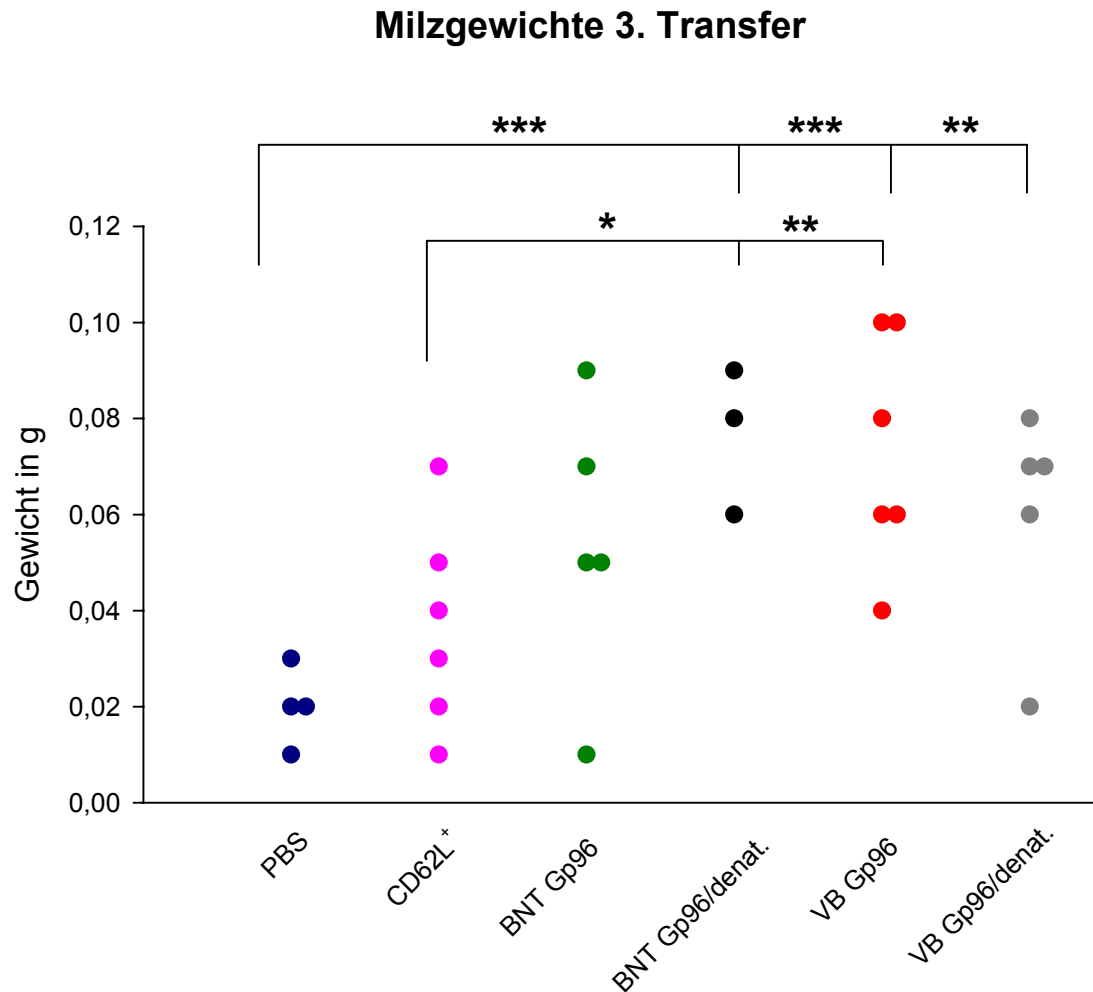


Abb. 4.46: Milzgewichte der Tiere nach dem 3. Transfer-Versuch. Alle Gruppen wiesen im Vergleich zur PBS-Gruppe erhöhte Milzgewichte auf, wobei nicht alle Unterschiede signifikant waren. Im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe waren nur die Milzgewichte der BNT Gp96/denat.-Gruppe und der VB Gp96-Gruppe signifikant erhöht. * $p < 0,03$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,002$, t-Test

Bei den Darmlängen waren in diesem Transferversuch, wie schon beim ersten Transfer, keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (nicht gezeigt). Beim zweiten Transfer waren die Därme der PBS-Gruppe gegenüber den anderen drei Gruppen länger, so wie man es auch erwarten würde, da die PBS-Tiere keine Kolitis entwickelt hatten. Zusammenfassend lässt sich aber feststellen, dass der Parameter der Darmlänge bei der Transferkolitis keinen verlässlichen Schluss auf die Ausprägung der Kolitis hat.

4.7.3.4 Histologie

Auch bei diesen Transfer wurden die histologischen Scores durch Dr. Florian Obermeier bestimmt und sind in Abb. 4.47 dargestellt. Die mit PBS behandelten Tiere hatten keine intestinale Entzündung, der Score lag bei $0,8 \pm 1,2$. Die Tiere, die Zellen aus unbehandelten Spendertieren erhalten hatten ($CD62L^+$), hatten trotz des geringen Gewichtsverlustes (siehe 4.7.3.2) mit einem Score von $2,7 \pm 0,4$ eine starke intestinale Entzündung, wie auch schon im ersten und im zweiten Transfer. Eine etwas schwächere Entzündung hatten die Tiere der VB Gp96-Gruppe. Der durchschnittliche Score von $2,2 \pm 0,5$ war höher als im ersten ($1,3 \pm 0,6$) und im zweiten ($1,6 \pm 1,2$) Transfer, und er war nicht signifikant geringer als der der $CD62L^+$ -Tiere. Einen signifikant niedrigeren Score hatten die Tiere der BNT Gp96-Gruppe. Der Score lag bei $1,6 \pm 0,7$ und war damit leicht niedriger als im ersten Versuch ($1,9 \pm 0,2$). Damit hatten die Tiere lediglich eine leichte intestinale Entzündung im Vergleich zu den Tieren der $CD62L^+$ -Gruppe ($p < 0,02$, t-Test). Tiere der VB Gp96/denat.-Gruppe hatten gegenüber der $CD62L^+$ -Gruppe und der VB Gp96-Gruppe eine stärkere intestinale Entzündung ($3,4 \pm 0,6$), wobei der Unterschied nur im Vergleich zur Vorbehandlung mit Gp96 signifikant war ($p < 0,01$, t-Test). Auch die Behandlung nach dem Transfer mit Gp96/denat. führte zu keiner Verbesserung der intestinalen Entzündung, was aufgrund der hohen Sterberate schon vermutete worden war. Der Score lag bei $3,3 \pm 0,3$ und war signifikant höher als bei der BNT Gp96-Gruppe ($p < 0,01$, t-Test). Er war aber nicht signifikant höher als bei Tieren der $CD62L^+$ -Gruppe.

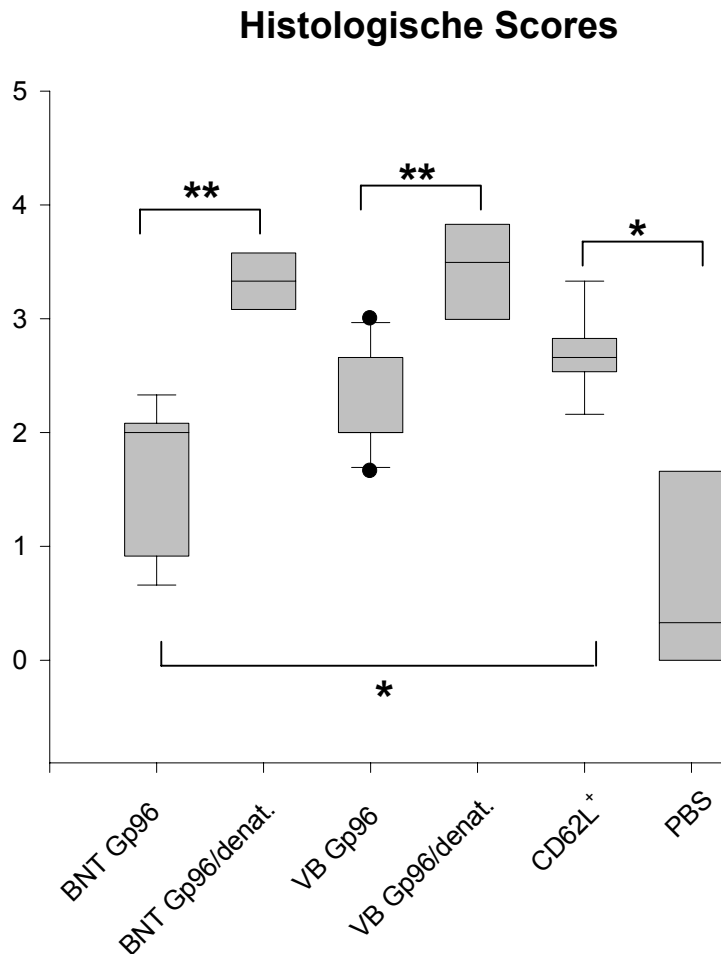


Abb. 4.47: Histologische Scores im 3. Transfer. Die BNT Gp96-Gruppe hatte in diesem Experiment den besten histologischen Score. * $p < 0,02$, ** $p < 0,01$, t-Test

In Abb. 4.48 ist exemplarisch für jede der Gruppen ein typisches Bild der Histologie gezeigt. Man erkennt bei VB Gp96/denat. und BNT Gp96/denat. einen sehr ausgeprägten Epithelschaden. Bei BNT Gp96 war kaum ein Epithelschaden zu erkennen, aber auch bei VB Gp96 war der Epithelschaden etwas weniger stark ausgeprägt als bei Tieren der CD62L⁺-Gruppe. Bei Tieren der VB Gp96-Gruppe war dagegen ein starkes Entzündungsinfiltrat zu beobachten.

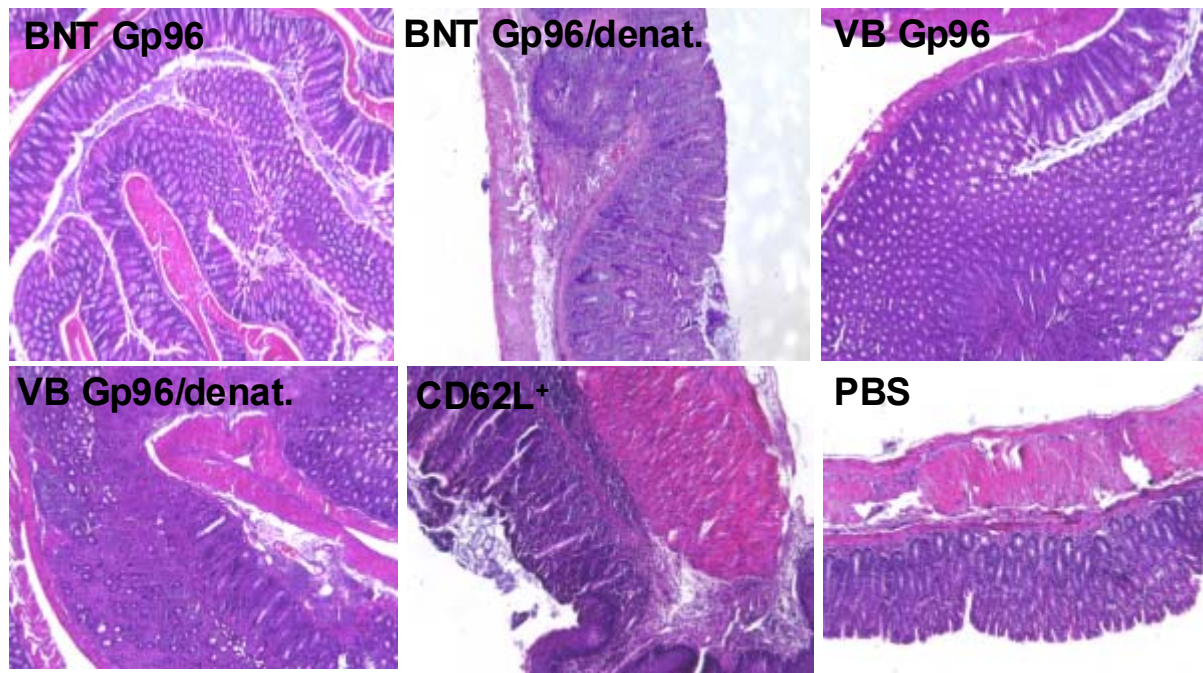


Abb.4.48: Exemplarische Darstellung eines typischen Ausschnitts der Histologie für jede Gruppe. Bei der BNT G96-Gruppe war der Epithelschaden im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe deutlich reduziert. Aber auch bei der VB Gp96-Gruppe war der Epithelschaden geringer als bei der CD62L⁺-Gruppe, wobei aber ein deutliches Entzündungsinfiltrat zu sehen war.

Bei diesem Transfer hatten die Tiere der VB Gp96-Gruppe keinen signifikant besseren Score, als die Tiere der CD62L⁺-Gruppe. Da im ersten und im dritten Transfer die Vorbehandlung der Tiere mit Gp96 zu den gleichen Zeitpunkten und mit derselben Menge erfolgt war, konnten die Scores der einzelnen Tiere des ersten und des dritten Transfers für die VB Gp96-, die CD62L⁺- und die PBS-Gruppe zusammen betrachtet werden. Wertet man diese zusammen aus, so ergibt sich insgesamt ein signifikant besserer Score für die Tiere der VB Gp96-Gruppe (CD62L⁺ vs. Gp96 $p < 0,005$, t-Test, Abb. 4.49)

Histologische Scores

1. + 3. Transfer

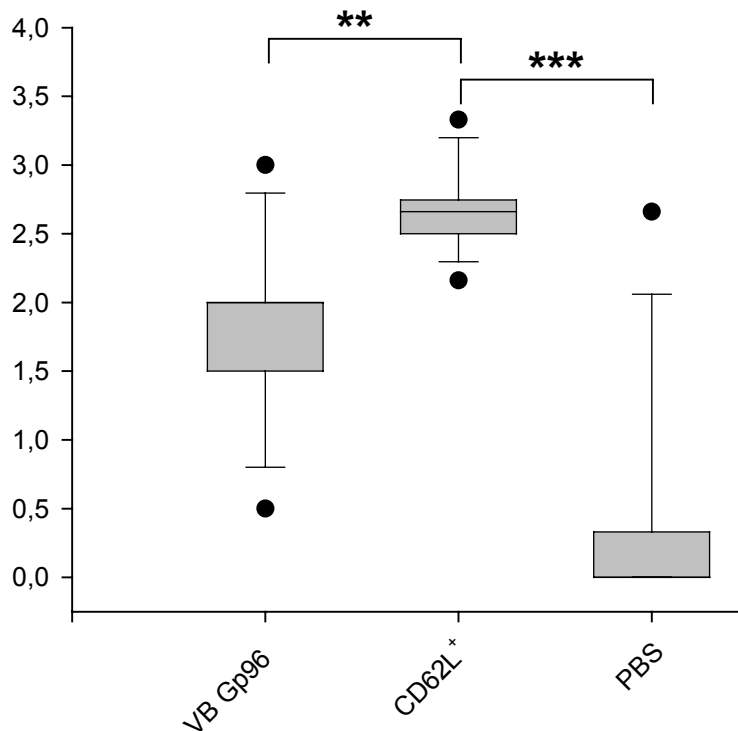


Abb. 4.49: Histologische Scores der drei identischen Gruppen des 1. und 3. Transfers. Bei gemeinsamer Auswertung der beiden Versuche ergibt sich für die Tiere der VB Gb96-Gruppe ein signifikant besserer Score als für Tiere der CD62L⁺-Gruppe. ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$, *t*-Test

4.7.3.5 Zytokinsekretion von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten

Auch bei diesem dritten Transfer wurden den Tieren nach Beendigung des Versuches die mesenterialen Lymphknoten entnommen und die Zytokinsekretion der daraus isolierten Zellen getestet. Das Vorgehen erfolgte analog zu den beiden vorhergegangenen Transfers. Die Mengen der sezernierten Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 und TNF wurden mittels der Luminex[®]-Technologie quantifiziert, die Ermittlung der IFN- γ -Sekretion erfolgte mittels ELISA. Die MLN-Zellen der PBS-Tiere reichten auch diesmal nur für die Quantifizierung der Zytokine ohne Stimulation aus.

Ohne Stimulation konnten die Werte für IL-4 nicht bestimmt werden, da sie unter der Nachweisgrenze lagen. Nach Stimulation war die IL-4-Sekretion bei Zellen aus Tieren der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen, am höchsten. Die Erhöhung war im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe signifikant ($p < 0,002$, t-Test). Die Vorbehandlung mit denaturiertem Gp96 und die Behandlung nach Transfer mit Gp96 führte zu einer erniedrigten IL-4-Sekretion, die im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe ebenfalls signifikant war ($p \leq 0,03$, t-Test, Abb. 4.50).

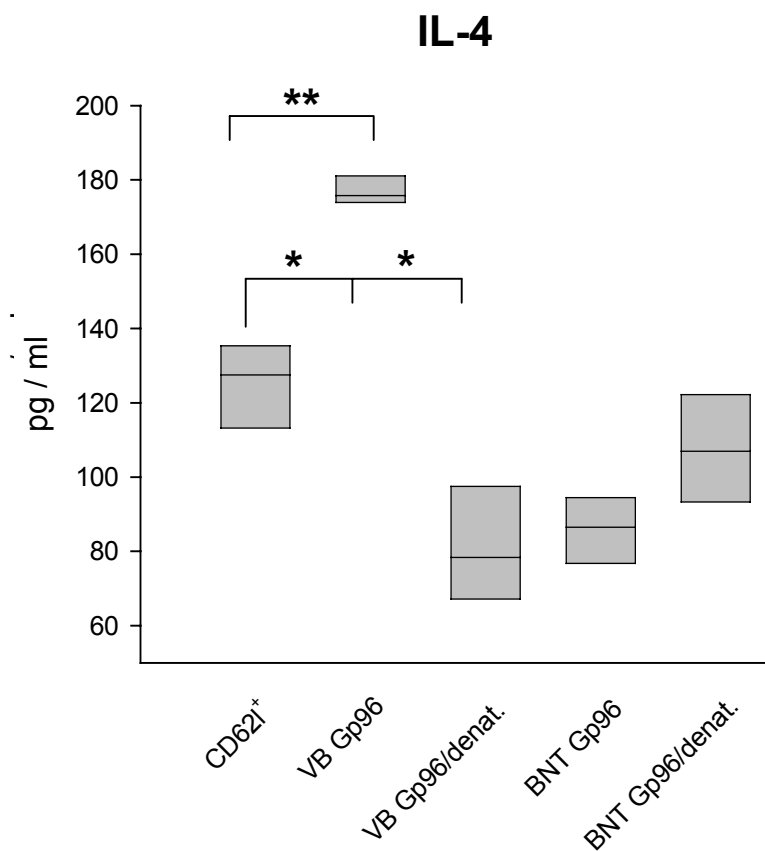


Abb. 4.50: IL-4-Sekretion der MLN-Zellen nach Stimulation. Bei MLN-Zellen der VB Gp96-Gruppe kam es zu einer erhöhten IL-4-Sekretion. Bei MLN-Zellen der VB Gp96/denat.-Gruppe und bei den BNT-Gruppen war die IL-4-Sekretion erniedrigt.
* $p < 0,03$, ** $p \leq 0,002$, t-Test.

Im Vergleich zum ersten Transfer zeigte sich ein Unterschied. Dort war die IL-4-Sekretion bei Vorbehandlung der Donortiere mit Gp96 nicht erhöht, und auch im zweiten Transfer war die Erhöhung nur tendenziell feststellbar, aber nicht signifikant.

Ohne Stimulation der Zellen war die IL-6-Sekretion aus MLN der VB-Gruppen im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe signifikant höher ($p < 0,02$, t-Test), bei den MLN-Zellen der BNT-Gruppen war sie niedriger als in der CD62L⁺-Gruppe (CD62L⁺ vs. BNT Gp96 $p < 0,01$, CD62L⁺ vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,0005$, t-Test, Abb. 4.51 A). Nach Stimulation war die IL-6-Sekretion bei MLN-Zellen der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zur

CD62L⁺-Gruppe ($p < 0,02$, t-Test) und allen anderen Gruppen signifikant höher ($p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.51 B).

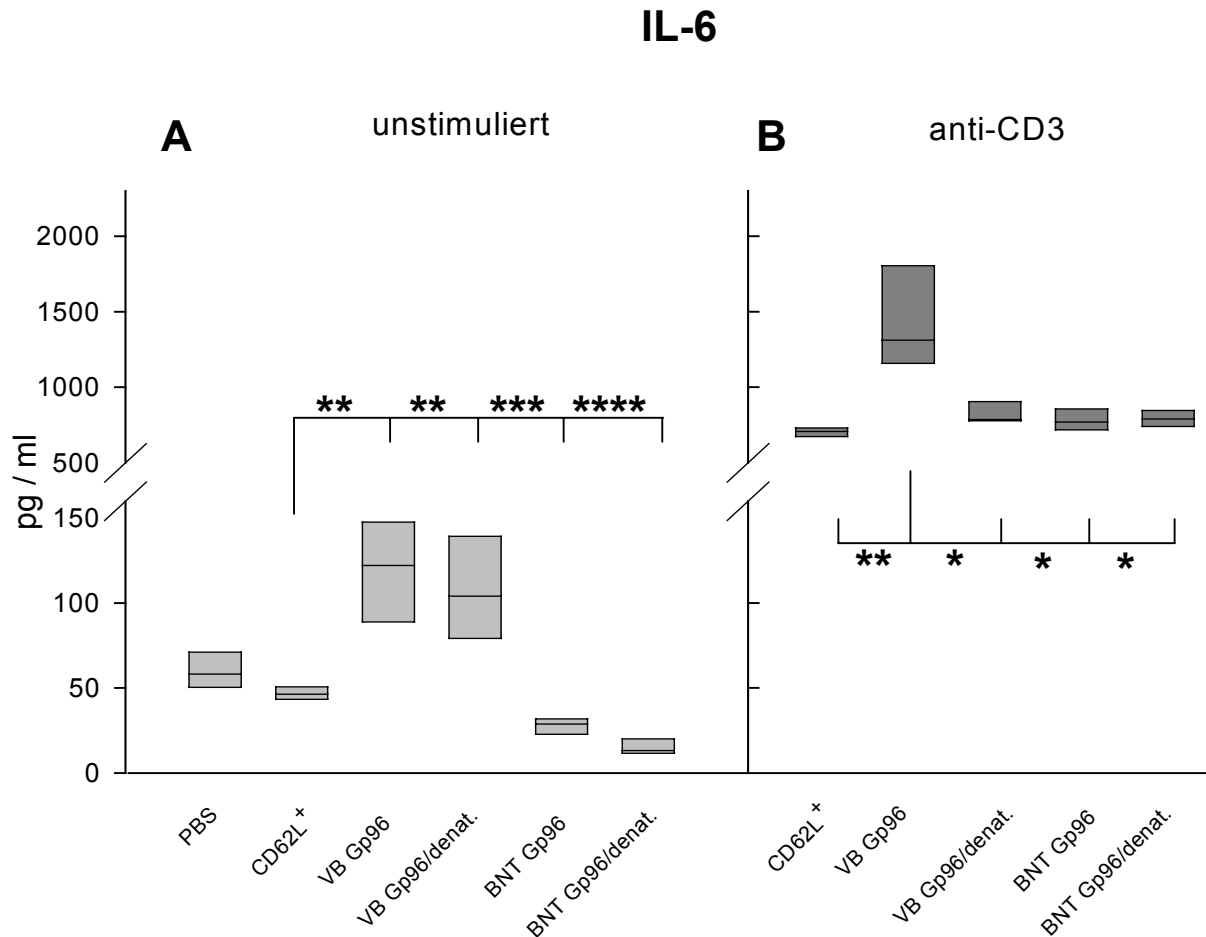


Abb. 4.51: IL-6-Sekretion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Ohne Stimulation war die IL-6-Sekretion der VB Gp96- und der VB Gp96/denat.-Gruppe erhöht, die Behandlung nach dem Transfer führte zu verminderter IL-6-Sekretion. Nach Stimulation zeigten die Zellen aus Tieren der VB Gp96-Gruppe die höchste IL-6-Sekretion. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,0005$ t-Test

Der Unterschied zum ersten Transfer ist sehr deutlich, da dort die IL-6-Sekretion nach Behandlung der Donoren mit Gp96 reduziert war, wobei sie dann im zweiten Transfer im Vergleich zu unbehandelten Tieren erhöht war.

Ohne Stimulation war die IL-10-Sekretion bei den Tieren der VB Gp96-Gruppe am höchsten, wobei der Unterschied hier nur zu den Gruppen, die nach dem Transfer behandelt worden waren, signifikant war. Die IL-10-Sekretion lag dort unter der Nachweisgrenze ($p < 0,0001$, t-Test, Abb. 4.52 A). Nach Stimulation war sie ebenfalls in der VB Gp96-Gruppe am höchsten. Gegenüber der CD62L⁺-Gruppe war dieser Unterschied zwar nicht signifikant, gegenüber den anderen Gruppen war dies der Fall (VB Gp96 vs. VB Gp96/denat. $p < 0,02$, vs. BNT Gp96 $p < 0,005$, vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,01$, t-Test, Abb. 4.52 B).

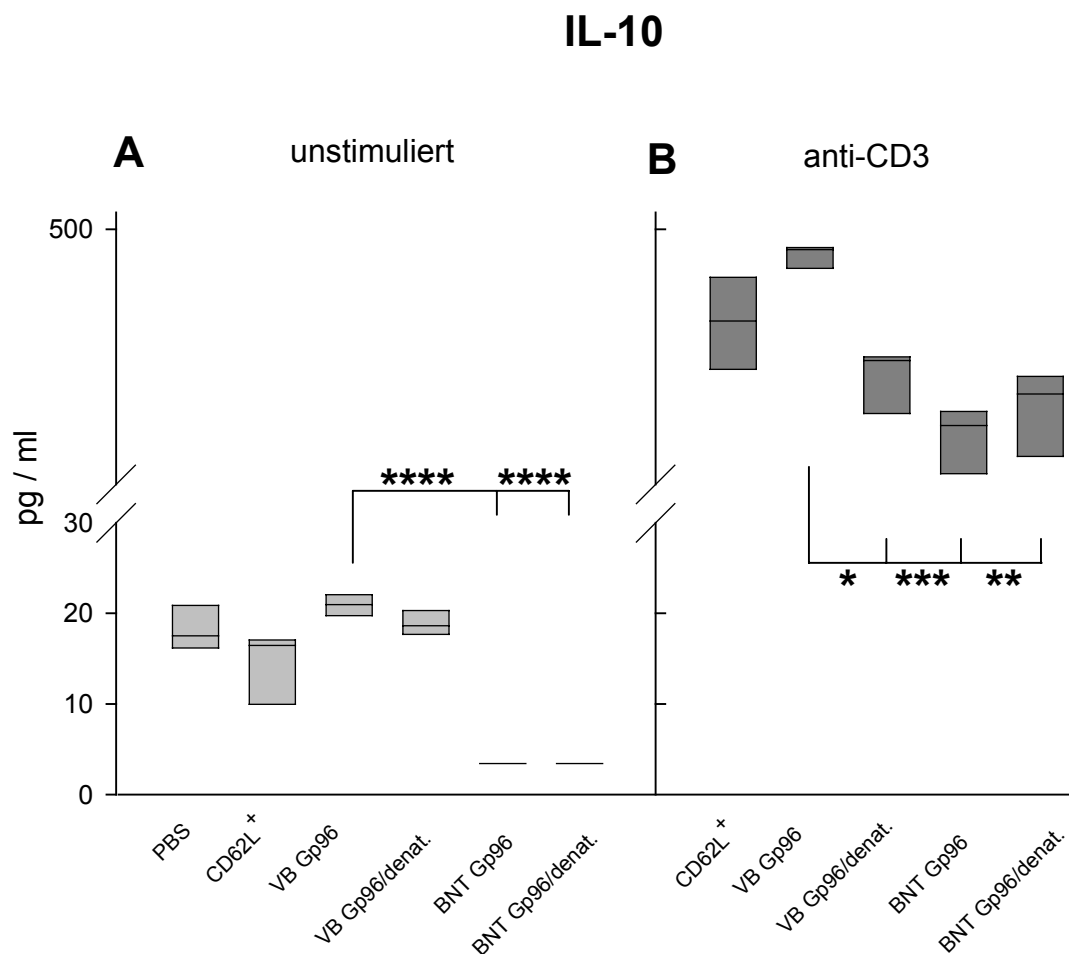


Abb. 4.52: IL-10-Sekretion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Sowohl ohne als auch mit Stimulation zeigten die Zellen aus Tieren der VB Gp96-Gruppe die höchste IL-10-Sekretion. * $p < 0,02$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ t-Test

Im Vergleich zum ersten Transfer zeigte sich nur ohne Stimulation ein Unterschied, da im ersten Transfer bei der CD62L⁺-Gruppe die höchste IL-10-Sekretion vorlag. Nach Stimulation war auch im ersten Transfer die IL-10-Produktion in der VB Gp96-Gruppe am höchsten. Im zweiten Transfer waren keine Unterschiede in der IL-10-Sekretion festzustellen.

Auch die IL-13-Sekretion war bei Behandlung der Donortiere mit Gp96 am höchsten, und zwar sowohl mit als auch ohne Stimulation der MLN-Zellen. Ohne Stimulation war der Unterschied zur CD62L⁺-Gruppe signifikant ($p < 0,0002$, t-Test) und auch gegenüber der IL-13-Sekretion der BNT-Gruppen war der Unterschied signifikant ($p < 0,001$, t-Test, Abb. 4.53 A). Gegenüber der CD62L⁺-Gruppe war der Unterschied der Zytokinsekretion nach Stimulation der MLN-Zellen nicht signifikant, gegenüber den anderen Gruppen waren die Unterschiede signifikant ($p < 0,005$, t-Test, Abb. 4.53 B).

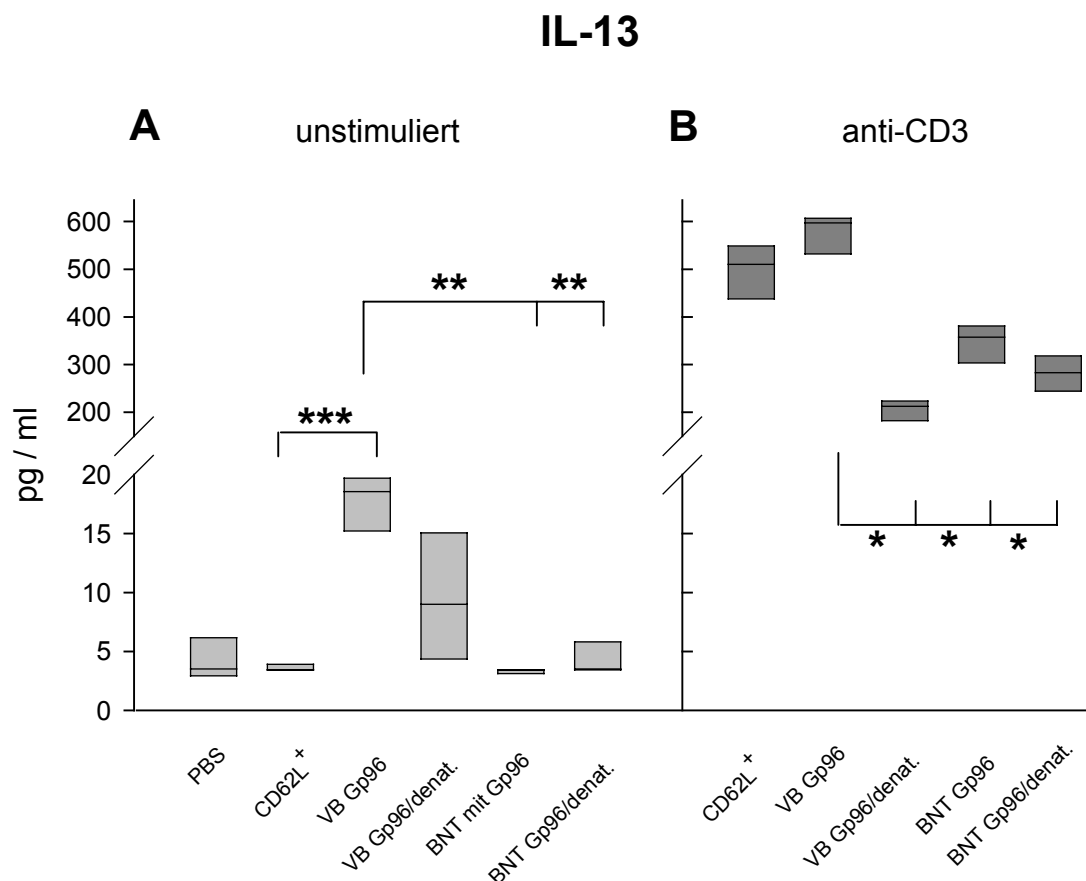


Abb. 4.53: IL-13-Sekretion der MLN-Zellen ohne (A) und mit Stimulation (B). Sowohl ohne als auch mit Stimulation zeigten die Zellen aus Tieren der VB Gp96-Gruppe die höchste IL-13-Sekretion. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0002$, t-Test

Auch im ersten Transfer war die IL-13-Sekretion bei Zellen der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zu Zellen aus unbehandelten Tieren erhöht. Im zweiten Transfer zeigte sich hingegen ein genau umgekehrtes Bild.

Die Sekretion von TNF konnte nur ohne Stimulation der Zellen bestimmt werden, da die TNF-Sekretion nach Stimulation über der nachweisbaren Menge lag. Bei MLN-Zellen der PBS-Gruppe war das meiste TNF nachzuweisen, wobei diese Menge gegenüber der CD62L⁺-Gruppe und der BNT-Gruppen signifikant höher war (PBS vs. CD62L⁺ $p < 0,05$, PBS vs. BNT $p < 0,01$, t-Test). Gegenüber der CD62L⁺-Gruppe war die TNF-Sekretion in Zellen aus den VB-Gruppen signifikant höher (CD62L⁺ vs. VB Gp96 $p < 0,05$, CD62L⁺ vs. VB Gp96/denat. $p < 0,01$, t-Test). Am niedrigsten war sie, wenn die Tiere nach dem Transfer behandelt worden waren. Der Unterschied war zur VB Gp96-Gruppe und zur CD62L⁺-Gruppe signifikant (VB Gp96 vs. BNT Gp96 $p < 0,001$, VB Gp96 vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,0005$, CD62L⁺ vs. BNT Gp96 $p < 0,0002$, CD62L⁺ vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,0001$, t-Test, Abb. 4.54).

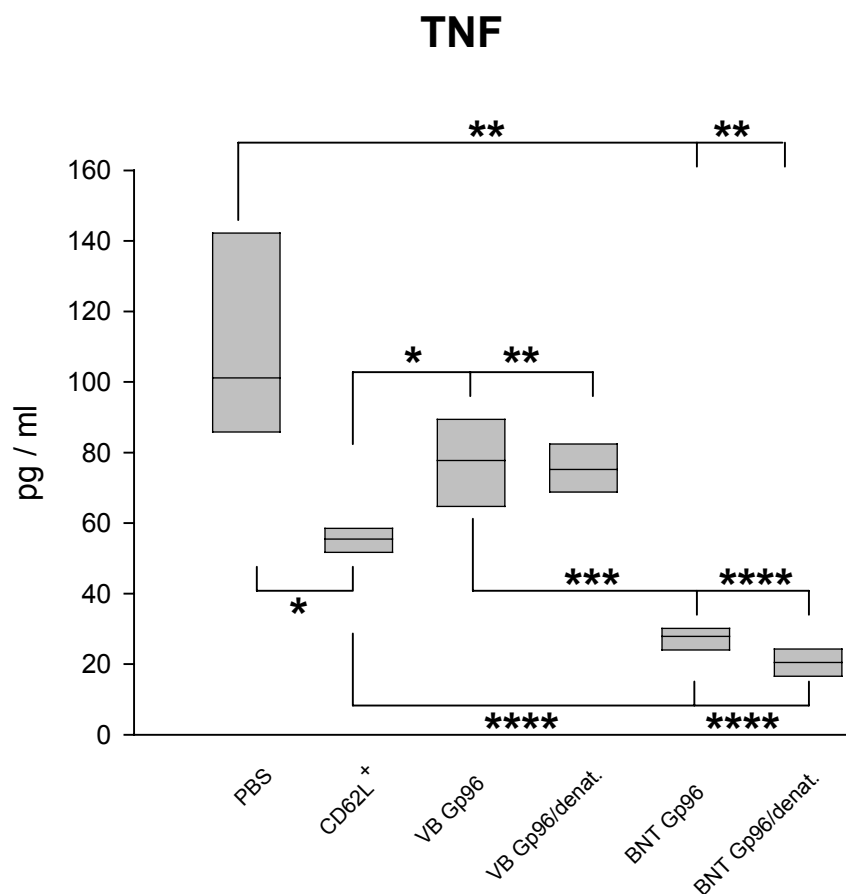


Abb. 4.54: TNF-Sekretion der MLN-Zellen ohne Stimulation. Am niedrigsten war die TNF-Sekretion wenn die Tiere nach dem Zelltransfer behandelt worden waren, am höchsten war sie in den PBS-Tieren. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p \leq 0,0005$, t-Test

Im ersten Transfer war die TNF-Sekretion der MLN-Zellen bei Behandlung der Donortiere im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe gleich stark und die Behandlung nach dem Transfer ergab eine leicht erhöhte TNF-Menge in den Zellkulturüberständen. Im zweiten Transfer war die TNF-Menge der CD62L⁺-Gruppe und der VB Gp96-Gruppe ebenfalls gleich hoch. Dies stellte also im Vergleich zu diesem dritten Transfer einen Unterschied dar.

Die IFN- γ -Sekretion der MLN-Zellen konnte ohne Stimulation der Zellen nicht bestimmt werden, da die Werte unter der Nachweisgrenze lagen. Mit Stimulation sezernierten die MLN-Zellen der VB Gp96-Gruppe das meiste IFN- γ und die Gruppen VB Gp96/denat. und BNT Gp96/denat. sezernierten am wenigsten IFN- γ . Der Unterschied der Sekretion der VB Gp96-Gruppe war zu allen anderen Gruppen signifikant höher (VB Gp96 vs. CD62L⁺ $p < 0,01$, VB Gp96 vs. VB Gp96/denat. $p < 0,0001$, VB Gp96 vs. BNT Gp96 $p = 0,0001$, VB Gp96 vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,0001$). Die IFN- γ -Sekretion der CD62L⁺-Gruppe war signifikant höher als bei VB Gp96/denat. und BNT Gp96/denat. (CD62L⁺ vs. VB Gp96/denat. $p < 0,005$, CD62L⁺ vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,005$, t-Test). Aber auch der Unterschied in der IFN- γ -Sekretion der BNT Gp96- und der BNT Gp96/denat-Gruppe unterschied sich. Bei BNT Gp96 wurde mehr IFN- γ sezerniert als bei BNT Gp96/denat., aber genauso viel wie bei der CD62L⁺-Gruppe (BNT Gp96 vs. BNT Gp96/denat. $p < 0,005$, t-Test, Abb. 4.55).

Im Vergleich zum ersten und zum zweiten Transfer gab es bei der IFN- γ -Sekretion Unterschiede. Im ersten Transfer war IFN- γ bei der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe, wie in diesem Transfer, stark erhöht. Bei BNT Gp96 im ersten Transfer war die IFN- γ -Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe erhöht, in diesem Transfer gab es keinen Unterschied. Im zweiten Transfer war die IFN- γ -Sekretion der VB Gp96-Gruppe gleich der der CD62L⁺-Gruppe.

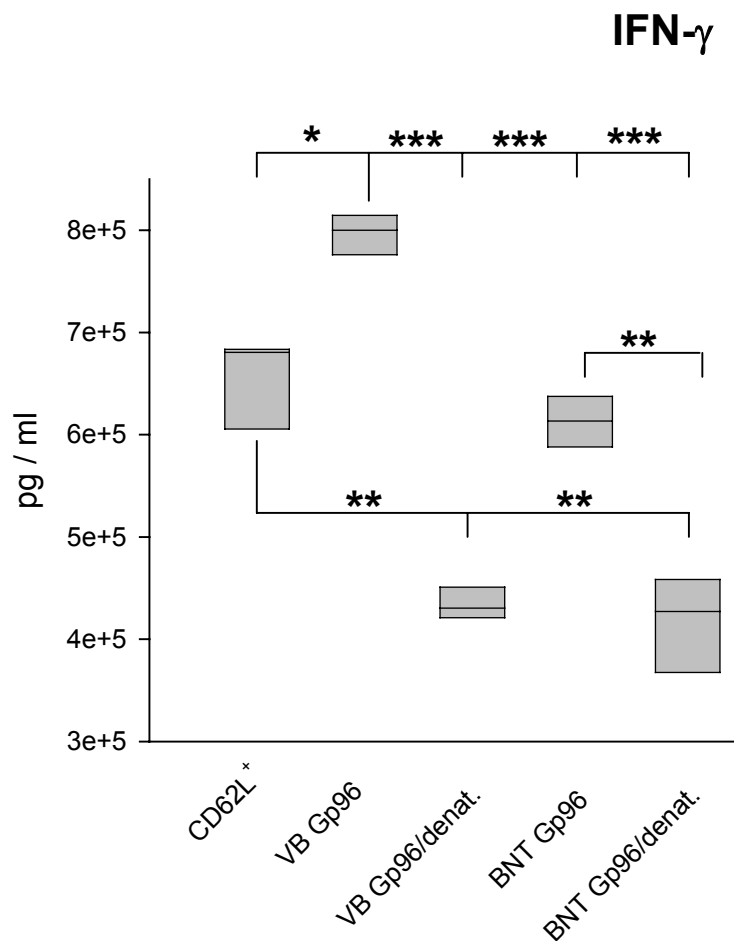


Abb. 4.55: IFN- γ -Sekretion der MLN-Zellen nach Stimulation. Am höchsten war die IFN- γ -Sekretion bei Zellen der VB Gp96-Gruppe, am niedrigsten war sie bei Zellen der Gp96/denat.-Gruppe.

* p<0,01, ** p<0,005, *** p<0,001, **** p<0,0001, t-Test

Zusammenfassend ergab sich beim Zytokinprofil der MLN-Zellen des dritten Transfers, dass die Zellen aus Tieren der VB Gp96-Gruppe im Vergleich zu Zellen der CD62L⁺-Gruppe, bei allen gemessenen Zytokinen eine erhöhte Sekretion aufwiesen. Im Vergleich zur VB Gp96/denat.-Gruppe zeigte sich ebenfalls ein Unterschied in der Zytokin-Sekretion der VB Gp96-Gruppe. MLN-Zellen der VB Gp96/denat.-Gruppe hatten ein proinflammatorisches Zytokinprofil. Bei MLN-Zellen der BNT Gp96-Gruppe waren alle Zytokine, im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe, vermindert exprimiert, wobei sich nur bei IFN- γ ein Unterschied zur BNT Gp96/denat.-Gruppe ergab (Tab. 4.5).

VB Gp96	VB Gp96/denat.	BNT Gp96	BNT Gp96/denat.	Zytokin
↑↑	↓	↓	↔	IL-4 T _H 2
↑↑	↑	↓↔	↓↔	IL-6 T _H 1
↑	↔	↓	↓	IL-10
↑	↓	↓↔	↓↔	IL-13 T _H 2
↑	↑	↓	↓	TNF T _H 1
↑↑	↓↓	↔	↓↓	IFN-γ T _H 1

grün unterlegt: antiinflammatorische Zytokine, bzw. antiinflammatorischer Effekt

rot unterlegt: proinflammatorische Zytokine, bzw. proinflammatorischer Effekt

Tab. 4.5: Veränderung der Zytokine der MLN-Zellen aus Tieren, deren Donoren mit Gp96 bzw. Gp96/denat. behandelt wurden und von Tieren, die nach dem Transfer mit Gp96 oder Gp96/denat. behandelt wurden im Vergleich zu Zellen aus Tieren deren Donoren unbehandelt waren (CD62L⁺-Gruppe). ↓: Abnahme der Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe; ↑: Zunahme der Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe; ↔ unveränderte Sekretion im Vergleich zur CD62L⁺ Gruppe.

4.8 Generierung einer konditionellen Gp96-Knock-out-Maus

Aufgrund der bisher dargestellten Ergebnisse im humanen Darm und bei der Behandlung von Mäusen, bei denen durch T-Zell-Transfer eine Kolitis induziert wurde, sollte eine konditionelle knock-out-Maus für Gp96 generiert werden, um den Einfluss von Gp96 auf die Erhaltung der Toleranz gegenüber der intestinalen Flora genauer untersuchen zu können. Der Versuch einer anderen Arbeitsgruppe, eine Gp96-knock-out-Maus zu generieren, scheiterte daran, dass diese Maus am 5. Tag der Embryonalentwicklung starb, was die Herstellung einer induzierbaren knock-out-Maus notwendig machte. Die sollte auch den Vorteil haben, dass die Gp96-Expression in verschiedenen Geweben unterdrückt werden kann, wie z.B. bei myeloiden Zellen, zu denen auch die intestinalen Makrophagen gehören.

Die Klonierungsstrategie für den Targeting-Vektor ist im Methodenteil ausführlich dargestellt (3.14). Hier sollen nur die bisher erzielten Fortschritte der einzelnen Klonierungsschritte dargestellt werden.

4.8.1 PCR der einzelnen Fragmente

Für den Targetingvektor wurden drei Teile des Gp96-Gens der Maus per PCR amplifiziert, um diese dann in einem Vektor mit der Neomycin-Resistenz zusammenzuführen. Fragment I hatte eine Größe von 2975 bp, Fragment II war 3346 bp und Fragment III 1722 bp groß. Alle Fragmente wurden per PCR aus ES-Zell-DNA amplifiziert. Die *frt*-flankierte Neomycin-Resistenz und das lox p-Element wurden aus einem Vektor, der uns von Prof. Dr. Hehlhans aus der Abteilung für Pathologie zur Verfügung gestellt wurde, amplifiziert. Die Amplifikation der genomischen Sequenzen der Maus stellten aus unklaren Gründen ein großes Problem dar, so dass im Verlauf der Arbeit viele unterschiedliche Primer, Polymerasen und PCR-Protokolle getestet wurden, bis letztendlich die Fragmente amplifiziert und kloniert waren. In dieser Arbeit sind nur die Primer und Protokolle aufgeführt, die schließlich zum Erfolg geführt haben (2.4.3 und 3.14). In Abb. 4.56 sind die nach erfolgreicher PCR erhaltenen Banden dargestellt, welche aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und in den pCR[®] II-TOPO-Vektor kloniert wurden.

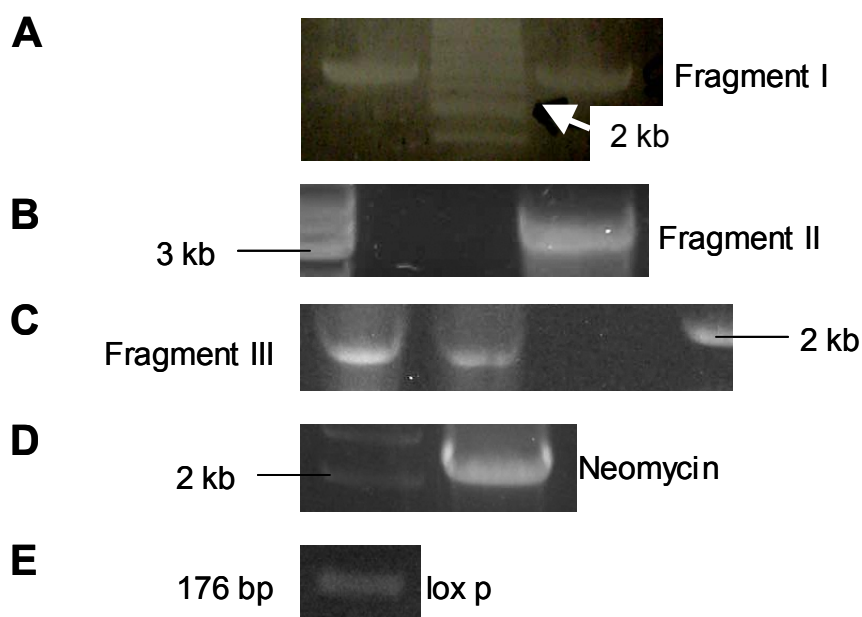


Abb. 4.56: PCR der drei Gp96-Genfragmente (A-C), von Neomycin (D) und des lox p - Elements (E).

Die Sequenzierung ergab, dass es sich um die jeweils richtigen Fragmente handelte, so dass die einzelnen Teile nun zu einem Targeting-Vektor zusammengefügt werden können.

4.9 Die Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen

Wie bereits unter 4.2 erwähnt, wurden im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe subtraktive Hybridisierungs-Versuche durchgeführt. Dabei wurde cDNA von *in vitro* differenzierten Makrophagen von Makrophagen-cDNA nicht entzündeter Patienten subtrahiert. Es zeigte sich, dass 1 von 76 erhaltenen Klonen >99% Homologie zur mRNA von TANK (*traf family member associated Nf- κ B activator*) aufwies (Referenz-Sequenz bei NCBI: NM_004180.1). Die Tatsache, dass TANK bei der Kontrolle der NF- κ B-Aktivierung eine Rolle spielt, und die Tatsache, dass NF- κ B in Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa nicht aktiviert ist, ließ den Schluss zu, dass TANK bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert wird. Da TANK an TRAF2 gebunden vorliegt, und es durch Komplexbildung mit TBK1 zur Aktivierung von NF- κ B kommt, sollte auch die Expression von TBK1 untersucht werden.

4.9.1 Affymetrix GeneChip® Analysen

Die Affymetrix GeneChip® Analysen wurden am Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik in Regensburg durchgeführt. Die Makrophagen-mRNA von drei nicht entzündeten Patienten und drei Spendern für *in vitro* differenzierte Makrophagen wurde gepoolt, um mögliche individuelle Unterschiede in der Expression auszuschließen. Die jeweilige mRNA wurde auf jeweils zwei Chips hybridisiert. Auf dem Chip waren jeweils drei *probe-sets* für TANK vorhanden, aber für keines der drei *probe-sets* gab es eine signifikant höhere mRNA-Expression von TANK. Die Expression schien bei Makrophagen aus nicht entzündetem Darm lediglich tendenziell etwas höher zu sein als in den *in vitro* differenzierten Makrophagen. (Abb. 4.57). Im Durchschnitt liegt die

Expression in intestinalen Makrophagen etwa 1,7 mal höher als in *in vitro* differenzierten Makrophagen. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des t-Tests.

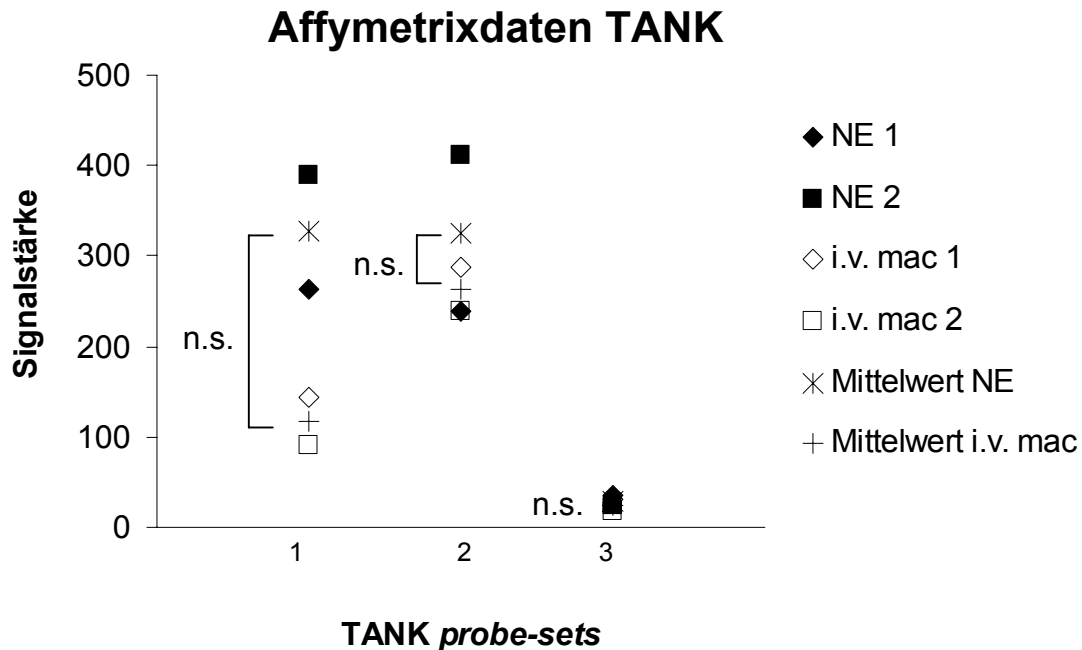


Abb. 4.57: Die Affymetrixdaten unterstützen das Ergebnis der subtraktiven Hybridisierung. Die original Signalstärken der intestinalen Makrophagen und der *in vitro* differenzierten Makrophagen für die drei TANK probe-sets sind gezeigt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die original Signalstärke auf dem Chip. Der Mittelwert ergibt sich jeweils aus den beiden Datenpunkten für intestinale Makrophagen und *in vitro* differenzierte Makrophagen. Für das probe-set 1 wurde eine 2,8-fache für das probe-set 2 eine 1,2-fache und für das probe-set 3 wurde keine Induktion gemessen. NE: nicht entzündet; i.v. mac: *in vitro* differenzierte Makrophagen, n.s.: nicht signifikant.

Abb. 4.58 zeigt die Affymetrixdaten von TBK1. Auf dem Chip war nur ein TBK1 probe-set vorhanden, aber dieses zeigte eine signifikant geringere Expression von TBK1-mRNA in intestinalen Makrophagen im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen.

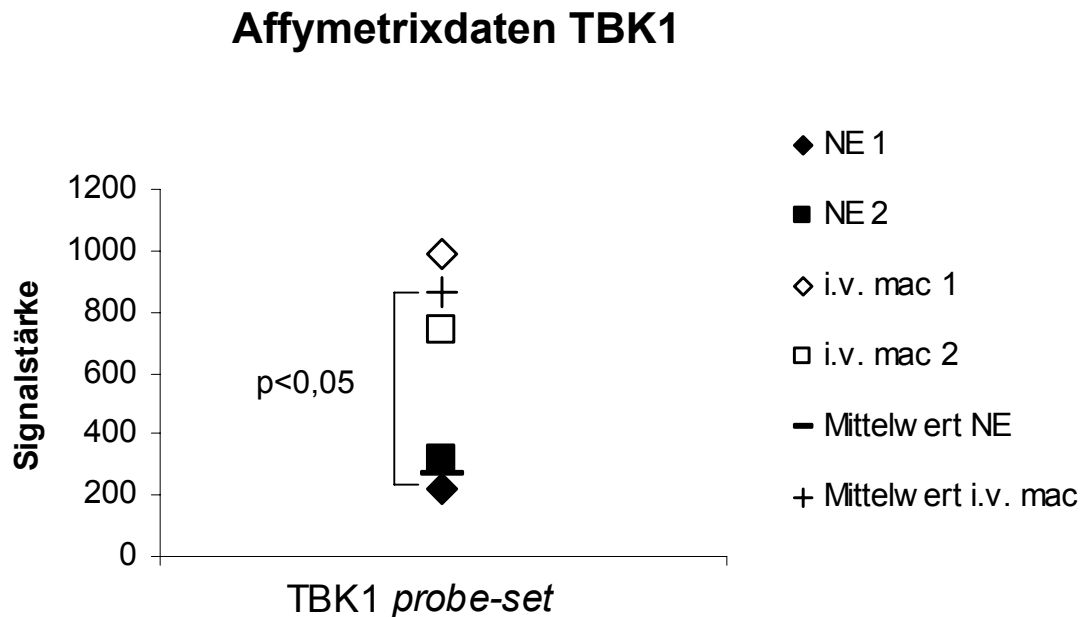


Abb. 4.58: Affymetrixdaten für TBK1. in *in vitro* differenzierten Makrophagen wird 3,2 mal mehr TBK1-mRNA exprimiert als in normalen intestinalen Makrophagen.

4.9.2 Real-time-PCR mit TaqMan® zum Nachweis von TANK in intestinalen Makrophagen

Die durch Affymetrix-Analysen erzielten Daten zur Expression der TANK mRNA sollten durch *real-time*-PCR mittels der TaqMan®-Technologie bestätigt werden. Dafür wurde mRNA aus intestinalen Makrophagen von vier Patienten mit Colitis ulcerosa, vier Patienten mit Morbus Crohn und fünf Patienten ohne intestinale Entzündung isoliert. Des Weiteren wurde mRNA aus *in vitro* differenzierten Makrophagen von zwei Spendern und Monozyten von sieben Spendern isoliert. Da TANK in zwei Varianten vorliegt (V1 und V2), die durch differenzielles Spleißen entstehen, wurde auf beide Varianten getestet. V2 besitzt einen um 306 Aminosäuren kürzeren C-Terminus und es ist nicht klar, welche biologische Funktion es ausübt. Für die bisher beschriebenen Funktionen von TANK scheint Transkriptionsvariante 1 essenziell zu sein.

In Abb 4.59 ist die Expression der beiden TANK-Varianten dargestellt. Die Expression von V1 (Abb. 4.59 A) entspricht genau der, die auch durch Affymetrix festgestellt wurde. In Monozyten und in *in vitro* differenzierten Makrophagen (i.v. MAK) war

TANK V1 im Vergleich zu intestinalen Makrophagen (CU, MC und NE = IMAK) weniger stark exprimiert. Der Unterschied war signifikant (Monozyten vs. IMAK $p < 0,005$, i.v. MAK vs. IMAK $p < 0,05$, t-Test). Innerhalb der verschiedenen Patientengruppen (CU, MC, NE) gab es jedoch keine Unterschiede.

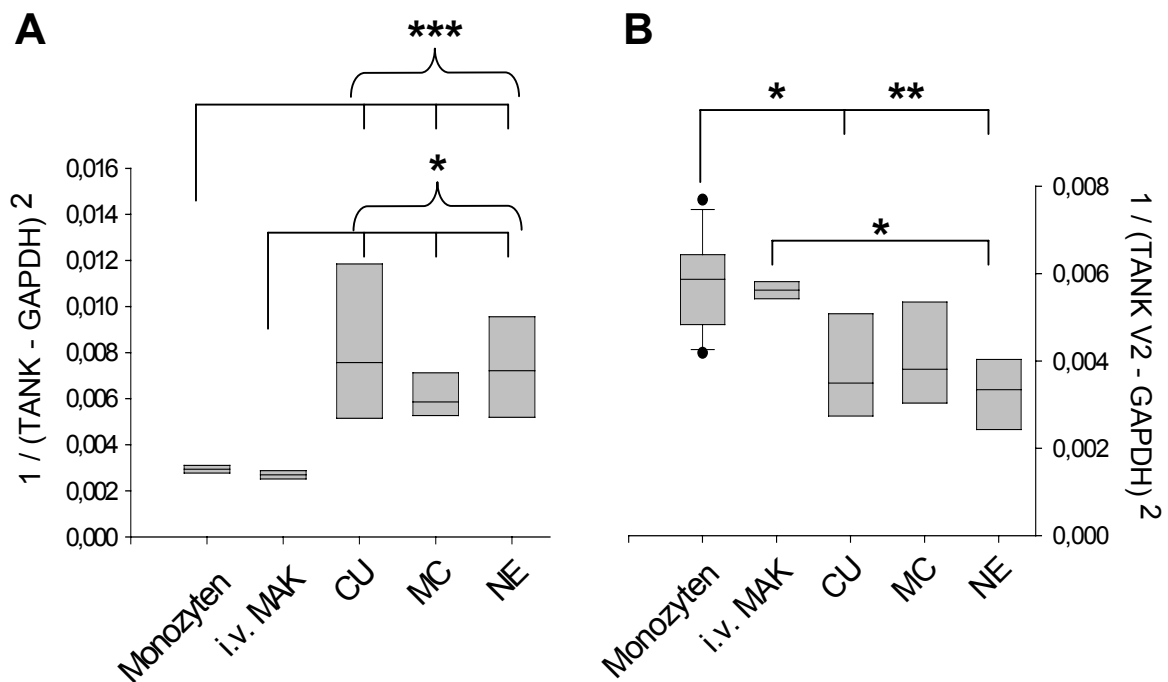


Abb. 4.59: Nachweis der TANK-Expression durch TaqMan® in Monozyten, in vitro differenzierten Makrophagen und Makrophagen aus Patienten mit MC, CU und ohne intestinale Entzündung (NE). A: Nachweis der längeren Variante 1 von TANK. In Monozyten und i.v. MAK kann weniger TANK V1-mRNA detektiert werden als in intestinalen Makrophagen. B: Nachweis der um 306 AS-Säuren kürzeren Variante 2. In Monozyten und i.v. MAK ist eine höhere TANK V2-Expression nachweisbar als in intestinalen Makrophagen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, t-Test.

Für V2 zeigte sich ein anderes Bild. Die Expression der Variante 2 war bei Monozyten am höchsten. Der Unterschied war im Vergleich zu mRNA aus Makrophagen von Patienten mit CU und ohne intestinale Entzündung (NE) signifikant (Monozyten vs. CU $p < 0,05$, Monozyten vs. NE $p < 0,01$, t-Test). Die Expression war in *in vitro* differenzierten Makrophagen gegenüber mRNA aus Makrophagen von Patienten ohne intestinale Entzündung (NE) ebenfalls signifikant höher ($p < 0,05$, t-Test, Abb. 4.59 B).

4.9.3 Nachweis der TANK-Expression in LPMNZ durch Western Blot

Da durch Microarray nachgewiesen werden konnte, dass TANK in Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa exprimiert wird und auch die TaqMan[®]-Versuche bestätigten, dass TANK in intestinalen Makrophagen exprimiert wird, sollte die Expression auf Proteinebene zunächst durch Western Blot überprüft werden.

Dafür wurde die Methode mit HEK 293-Zellen etabliert, wobei sich herausstellte, dass der polyklonale anti-TANK-Antikörper am besten für diese Zwecke geeignet war (Abb. 4.60). Die TANK-Bande sollte bei einer Größe von etwa 48 kDa nachzuweisen sein. Nachdem die Membran mit 5% Magermilchpulver in PBS blockiert worden war, erfolgte die Inkubation des Antikörpers (4 µg/ml) über Nacht bei 4° C. Als zweiter Antikörper dienten HRP-konjugierte anti-Kaninchen-Immunglobuline. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-Reagenz. Aktin wurde mit einem monoklonalen Antikörper auf derselben Membran nachgewiesen, da Aktin eine Größe von etwa 40 kDa aufwies und so keine Überlappung mit dem TANK-Nachweis zu erwarten war. Der Nachweis erfolgte ebenfalls mittels eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers mit dem ECL-Reagenz, und es stellte sich heraus, dass der Nachweis beider Proteine auf derselben Membran möglich war, was für die weiteren Versuche deshalb wichtig war, da Patientenmaterial nur begrenzt vorhanden war.

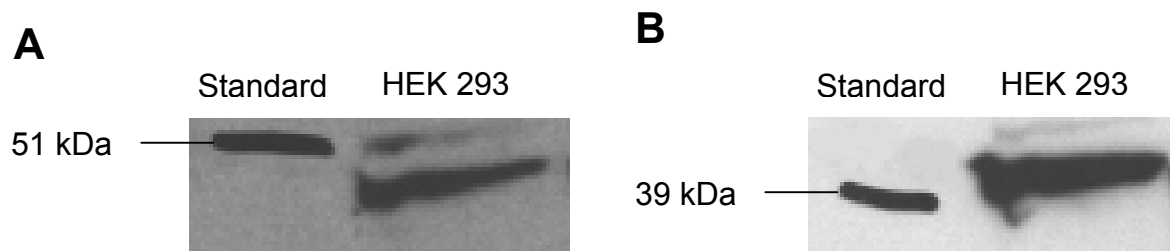


Abb. 4.60: Western Blot auf HEK 293-Zellen zum Nachweis von TANK (A). In den HEK 293-Zellen konnte eine spezifische Bande bei ca. 48 kDa nachgewiesen werden (A, rechts). Der Nachweis von Aktin (B) in HEK 293-Zellen erfolgte auf derselben Membran.

Da der Nachweis sicher und reproduzierbar funktionierte, sollten nun Makrophagen-Lysate sowie Biopsie-Lysate verschiedener Patienten im Western Blot zum Nachweis von TANK eingesetzt werden. In einem ersten Versuch wurden

Makrophagen eines Patienten ohne intestinale Entzündung (Ko 47) und eines Patienten mit MC (MC 49), sowie Biopsien eines Patienten mit MC oder CU (genaue Diagnose nicht bekannt, B 16) und eines Patienten mit CU untersucht. Von letzterem Patienten waren Biopsien aus unterschiedlich entzündeten Arealen abgenommen worden (B 17a: nicht entzündet, B 17b: stark entzündet). Als Kontrolle für den TANK-Nachweis wurde ein HEK 293-Lysat mitgeführt (Abb. 4.61). TANK konnte weder in einem der Makrophagenlysate noch in einem Biopsielysat nachgewiesen werden, es ist aber eine deutliche Bande bei den HEK 293-Zellen detektierbar, so dass geschlossen werden kann, dass der Nachweis an sich funktioniert hat (Abb. 4.61 A). Nachdem der Nachweis von Aktin im Wesentlichen dasselbe Resultat zeigte (Abb. 4.61 B), nämlich, dass Aktin nur in HEK und 293-Zellen und in Biopsie 16 nachzuweisen war, musste daraus geschlossen werden, dass sowohl Makrophagenlysate als auch Biopsielysate zu wenig Material für einen Nachweis von TANK und Aktin im Western Blot lieferten.

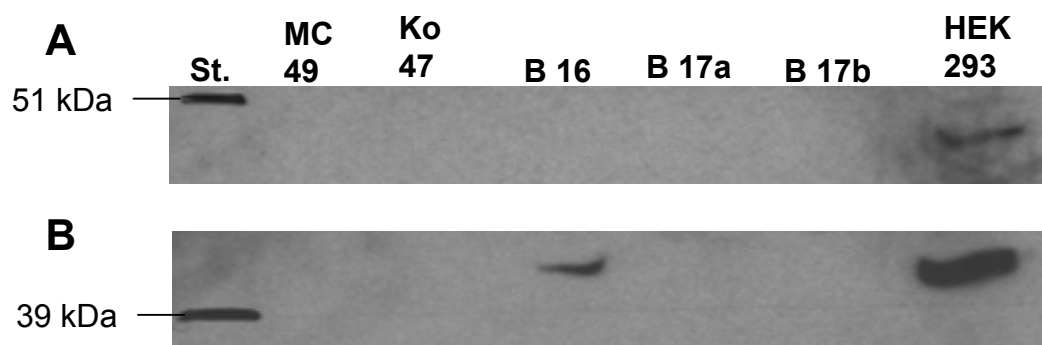


Abb. 4.61: Nachweis von TANK in Makrophagen- und Biopsielysaten verschiedener Patienten (A). Nur in der Positivkontrolle (HEK 293) gelang der Nachweis von TANK. Der Nachweis von Aktin (B) gelang nur in der Biopsie 16 (B16) und in HEK 293-Zellen. St.: Standard

Da nun fest stand, dass Makrophagen- und Biopsielysate für den Nachweis von TANK im Western Blot nicht geeignet waren, sollten im folgenden Lysate von LPMNZ aus Darmresektaten für den Nachweis von TANK im Western Blot herangezogen werden. LPMNZ wurden aus Resektaten, wie unter 3.2.1 beschrieben, isoliert und lysiert. Für den im Folgenden gezeigten Blot (Abb. 4.62) wurden LPMNZ von vier Patienten ohne intestinale Entzündung, einem Patienten mit CU und zwei Patienten mit MC untersucht. Als Positivkontrolle diente ein HEK 293-Lysat.

In Abb. 4.62 A ist die TANK-Expression der verschiedenen Patienten abgebildet und es ist zu erkennen, dass TANK bei allen Patienten ohne intestinale Entzündung nachweisbar war (unten: längere Belichtung, nur Patienten ohne intestinale Entzündung). Dasselbe galt für Patienten mit CU und MC, wobei die Banden dort stärker waren. Aktin war in LPMNZ aller Patienten detektierbar, so dass der schwache Nachweis von TANK bei den Patienten ohne intestinale Entzündung nicht auf eine mangelnde Proteinmenge zurückzuführen war (Abb. 4.62 B).

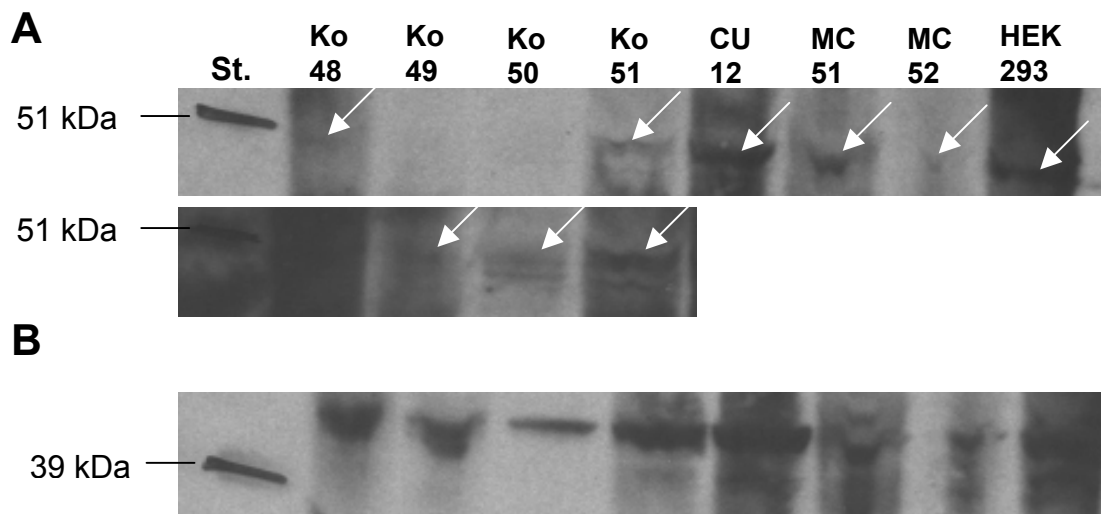


Abb. 4.62: Nachweis von TANK in LPMNZ aus Darmresektaten (A). In allen Patienten war TANK nachweisbar, wobei TANK in LPMNZ aus entzündeter Mukosa stärker exprimiert zu sein schien und es in Patienten ohne Entzündung nur nach nochmaliger längerer Exposition (A, unten) detektierbar war. Bei allen Patienten war Aktin in den LPMNZ detektierbar (B). St.: Standard

4.9.4 Immunhistochemische Analyse der TANK-Expression in humaner intestinaler Mukosa

Nachdem durch Western Blot gezeigt werden konnte, dass TANK in LPMNZ der intestinalen Mukosa exprimiert wird, und da es wegen der zu geringen Proteinmenge nicht möglich war, TANK durch Western Blot in Makrophagen nachzuweisen, sollte die Expression in intestinalen Makrophagen durch Immunhistochemie nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Untersuchung wurde auf Darm-Resektaten von drei Patienten ohne intestinale Entzündung und drei Patienten mit MC mit einem polyklo-

nalen anti-TANK Antikörper vorgenommen. Es wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und in einem ersten Markierungsschritt wurde TANK mit Vector® NovaRED® (rot) nachgewiesen. In einem zweiten Markierungsschritt wurden Makrophagen über den spezifischen Marker CD68 mit BDHC (blau, granulär) detektiert. Wie in Abb. 4.63 zu sehen ist, war TANK in intestinalen Makrophagen bei Patienten ohne intestinale Entzündung nachweisbar (Abb. 4.63 A), wohingegen TANK in Makrophagen von Patienten mit MC nicht detektierbar war. TANK konnte aber in der entzündeten Mukosa in anderen nicht näher charakterisierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.63 B, rote Pfeile TANK, blaue Pfeile Makrophagen). Die Isotypkontrolle (Kaninchen-Immunglobuline für TANK, Maus-IgG1 für CD68) zeigte keinerlei unspezifische Färbung (Abb. 4.63 C + D).

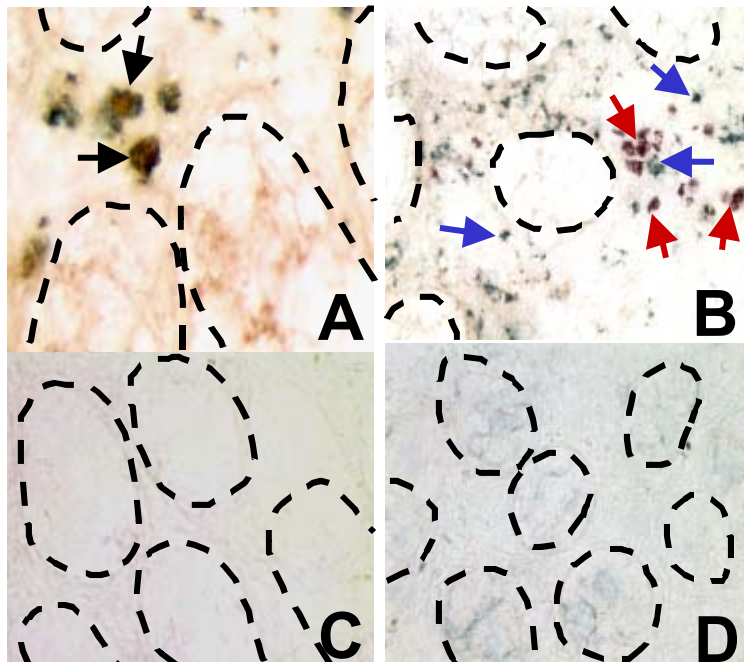


Abb. 4.63: Nachweis der TANK-Expression in intestinalen Makrophagen mit einem polyklonalen Antikörper. TANK war in intestinalen Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa nachweisbar (A), aber nicht in Makrophagen bei Patienten mit MC (B). Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifische Färbung (C + D).

*----- Krypte
(Vergrößerung x400)*

Die Expression von TBK1 konnte leider weder durch Western Blot noch durch Immunhistochemie untersucht werden, da der Antikörper, der bisher in der Arbeitsgruppe vorhanden war im Laufe der Arbeit zur Neige ging und derzeit kommerziell kein anti-TBK1 Antikörper mehr zu erwerben ist.

5 Diskussion

5.1 Aufreinigung intestinaler Makrophagen

Die Aufreinigung intestinaler Makrophagen über CD33 war schon vor einiger Zeit durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe beschrieben worden ²⁴⁴ und war auch in dieser Arbeit unerlässlich für weitere Versuche und die phänotypische und funktionelle Charakterisierung dieser Makrophagenpopulation.

In 4.1 ist die Aufreinigung der Makrophagen über CD33 gezeigt und es wird deutlich, dass eine zu über 90% reine Zellpopulation erhalten werden konnte, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass im weiteren Verlauf der Arbeit mit einer ausreichend reinen Makrophagenpopulation gearbeitet wurde, was vor allem für Untersuchungen an isolierter mRNA wichtig war.

5.2 Expression von Gp96 in der intestinalen Mukosa

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Expression des Hitzeschockproteins Gp96 bei der Differenzierung von Monozyten zu intestinalen Makrophagen induziert wird. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde deutlich, dass Gp96 in intestinalen Makrophagen bei Patienten ohne intestinale Entzündung, bei Patienten mit Divertikulitis und CU exprimiert wird, wohingegen Gp96 kaum in intestinalen Makrophagen von Patienten mit MC nachzuweisen war. Dadurch drängt sich die Vermutung auf, dass Gp96 bei der Entstehung und Perpetuation von MC eine wichtige Rolle zukommt. Beim Transfer-Kolitis Maus-Modell wurde Gp96 in Mac-3 positiven Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa gefunden, nicht jedoch in aktivierten F4/80 positiven Makrophagen bei Mäusen mit einer intestinalen Entzündung. Dadurch kann geschlossen werden, dass auch bei der Maus die Regulation der Gp96-Expression ähnlich der im Menschen abläuft.

Bisher wurde die Gp96-Expression hauptsächlich im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen, wie dem Kolorektalen Karzinom ²⁴⁹, oder dem malignen Me-

sotheliom²⁵⁰ untersucht. In beiden Fällen war die Gp96-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem nicht malignem Gewebe erhöht, was den Schluss nahe legt, dass Gp96 dort beim Peptid-Transfer auf MHC Klasse II und der Antigenpräsentation involviert ist.

Da bekannt ist, dass Gp96 bei der Kreuzpräsentation von Antigenen und auch bei der Induktion von Toleranz eine Rolle spielt, ist die Expression in intestinalen Makrophagen sehr interessant. Nach den vorliegenden Daten zu urteilen, wird Gp96 bei der Differenzierung von Monozyten zu intestinalen Makrophagen induziert, wodurch ihm eine spezielle Rolle im intestinalen Immunsystem zuzukommen scheint.

Weiterhin wird Gp96 in großen Mengen in intestinalen Makrophagen unter Bedingungen der mukosalen Toleranz gegenüber luminalen Antigenen gefunden, wohingegen es bei Morbus Crohn, bei dem keine Toleranz gegenüber der eigenen Darmflora herrscht, nur stark reduziert zu finden ist. Bisher sind keine Untersuchungen zu Gp96 im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gemacht worden, wobei das cytosolische Homolog Hsp 90 sehr wohl schon im Zusammenhang mit MC und CU betrachtet wurde. Bei diesen Studien stellte sich heraus, dass es keinen Unterschied in der Expression von Hsp 90 in entzündeter sowie nicht entzündeter Mukosa gibt²⁵¹.

Dagegen steht eine Arbeit von Stange und Mitarbeitern, die eine erhöhte Expression von Hsp 70 in Epithelzellen bei MC und CU unabhängig vom Grad der Entzündung festgestellt haben²⁵². Des Weiteren zeigten Peetermans und Mitarbeiter eine erhöhte Hsp 60 Expression in B7-positiven mononukleären Zellen in der Mukosa von Patienten mit IBD²⁵³ und eine weitere Arbeit zeigte eine erhöhte Expression von Hsp 60 in Epithelzellen bei CU²⁵⁴. All diese Arbeiten zeigten aber keinen Zusammenhang dieser Hsp's mit einer chronischen Darmentzündung.

Sehr interessant ist die Untersuchung der Expression von HSP60 in PBMNCs von verschiedenen Rattenstämmen. *Arthritis-prone-Lewis*-Ratten sind resistent gegenüber der Heraufregulation von HSP60 in PBMNCs, Splenozyten und Zellen aus dem Synovium des Fußgelenkes, wohingegen dies bei Fischer-Ratten nicht der Fall ist. Letztere sind dabei resistent gegenüber der Entwicklung von Arthritis²⁵⁵. Dies deutet darauf hin, dass es genetische Variationen in der Expression von HSPs gibt, obwohl das HSP selber keine genetische Variabilität aufweist. Eine weitere Studie zur Expression von HSP60 in Kindern mit neonataler Autoimmunthrombozytopenie, ebenfalls einer Autoimmunerkrankung, zeigte, dass nur eins von 29 Kindern HSP60

in Lymphozyten exprimierte, wohingegen in allen 30 Kontrollpatienten die HSP60-Expression nachzuweisen war²⁵⁶. Obwohl diese Studien keine direkten Beweise liefern, kann dennoch vermutet werden, dass HSPs eine entscheidende Rolle in der Regulation von Immunantworten haben und bei der Protektion gegen Autoimmunerkrankungen wichtig sind.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Expression von Gp96 in der intestinalen Mukosa im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Im Gegensatz zu anderen Studien, die eine unveränderte oder erhöhte Expression von Hsp's in IBD feststellten, ist Gp96 in intestinalen Makrophagen bei MC herunterreguliert, wobei verschiedene Gründe für dieses Fehlen von Gp96 in Frage kommen. Eine erste Möglichkeit ist, dass Gp96 von den aktivierten Makrophagen sezerniert, und dann in der entzündeten Mukosa sehr schnell degradiert wird. Bei den Microarray-Untersuchungen stellte sich heraus, dass in intestinalen Makrophagen aus nicht entzündeter Mukosa im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen Proteasom-assoziierte Proteine herunterreguliert sind (Daten nicht gezeigt). Es bleibt zu untersuchen, ob diese Gene in Makrophagen der entzündeten Mukosa heraufreguliert sind, so dass die Proteindegradation erhöht sein könnte und Gp96 möglicherweise sogar in der Zelle selber degradiert wird. Die qualitative PCR zeigte, dass Gp96-mRNA sowohl in intestinalen Makrophagen der entzündeten als auch der nicht entzündeten Mukosa nachzuweisen war. Wegen der sehr niedrigen Zellzahlen nach der Makrophagenseparation und der daraus resultierenden geringen Menge an mRNA und cDNA (unter Detektionslevel mit Ribogreen und Picogreen), musste mit einer hohen Zyklenzahl bei der RT-PCR gearbeitet werden, um überhaupt z.B. ein Haushaltsgen nachweisen zu können. Daher kann bei dieser Methode keinerlei Aussage über die Menge an vorhandener mRNA getroffen werden. Die Daten der Taqman-Versuche bestätigen die Ergebnisse der schon früher durchgeführten subtraktiven Hybridisierungen und der in dieser Arbeit durchgeführten Microarrays, die alle eine deutlich erhöhte Gp96 Expression in intestinalen Makrophagen im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen zeigten. Untersuchungen zu Unterschieden in der 5'- und der 3'-nicht-codierenden Region des Gp96-Genes könnten Aufschluss geben, ob dort bei Patienten mit MC möglicherweise Signalelemente für einen schnelleren Abbau der mRNA vorliegen, so dass dies zu einer geringeren Proteinmenge führt.

Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit, dass Gp96 im MZS-Modell bei Differenzierung von Monozyten in einen, den intestinalen Makrophagen ähnlichen Phänotyp induziert wird. Bei der Entzündung wandern Monozyten in die Mukosa ein, wobei diese Monozyten kein Gp96 exprimieren. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung sein, warum in der entzündeten Mukosa kein Gp96 in den Makrophagen gefunden werden kann, obwohl die mRNA-Expression induziert wird. Dagegen steht, dass bei CU und Divertikulitis auch Monozyten in die entzündeten Areale der Lamina propria einwandern, wobei dort aber Gp96 in den intestinalen Makrophagen exprimiert wird. Daher kann das Fehlen von Gp96 in intestinalen Makrophagen bei MC nicht ausschließlich mit der Invasion von Monozyten erklärt werden. Eine weitere, noch zu untersuchende Möglichkeit für die Abwesenheit von Gp96 in intestinalen Makrophagen bei MC könnten veränderte posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulationswege sein.

Die Herabregulation von Gp96 in intestinalen Makrophagen bei MC könnte eine Rolle beim Verlust der Toleranz gegenüber luminalen Antigenen spielen. Dafür sprechen Untersuchungen von Chandawarkar und Mitarbeitern, die beobachtet haben, dass die Gabe einer 5-10-fach höheren Dosis als der immunisierenden Dosis von Gp96 an Mäuse zu einer Toleranz gegenüber dem Tumor führt, aus dem das Gp96 isoliert wurde und nicht, wie bisher gezeigt, zu einer Immunisierung. Schon damals vermuteten die Autoren, dass dies ein T-Zell-abhängiger Prozess sei.¹²⁷ Kürzlich zeigte dieselbe Gruppe, dass die Immunisierung mit 100 µg Gp96 die Entstehung einer *myelin basic protein*- und einer Proteolipid Protein-induzierten Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) in SJL-Mäusen verhindert, wohingegen die Tiere EAE entwickeln, wenn sie mit nur 10 µg behandelt wurden. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die Behandlung von *non-obese diabetic* (NOD) Mäusen, die spontan einen Diabetes entwickeln, mit 100 µg Gp96 die Entwicklung des Diabetes verhindert. In NOD-Mäusen kann diese „Immunsuppression“ durch adoptiven Transfer von CD4⁺-T-Zellen auf andere NOD-Mäuse übertragen werden¹²⁸. Die dabei übertragenen Zellen müssen noch näher charakterisiert werden, aber es ist anzunehmen, dass durch hohe Gp96-Mengen regulatorische T-Zellen generiert werden.

Die Oberflächenexpression von Gp96 in transgenen Mäusen führt zu einer Lupus-ähnlichen Autoimmunerkrankung, wobei extrazelluläres Gp96, welches keine prozessierten Peptide gebunden hat, als Aktivator von APCs fungiert. Die chronische Aktivierung von APCs könnte ebenfalls zu einem Durchbrechen der Toleranz führen

²⁵⁷. Solch ein Mechanismus ist natürlich auch im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, im Speziellen mit MC, denkbar.

Erst kürzlich wurde die immunmodulatorische Rolle eines anderen Glycoproteins (HC gp39) beschrieben, welches in *ex vivo* Versuchen in der Lage war, die Antwort von zytotoxischen T-Zellen zu unterdrücken, so dass die Autoren schlossen, dass die HC gp39-gerichtete Immunantwort in gesunden Individuen einen regulatorischen Phänotyp generiert. Dabei exprimierten HC gp39-spezifische CD4⁺-T-Zellen CD25, GITR, CTLA-4 und Foxp3 und sie waren in der Lage andere Immunantworten zu unterdrücken ²⁵⁸. Aufgrund dessen kann man vermuten, dass Gp96 in der intestinalen Mukosa eine ähnliche Funktion haben könnte.

Eine weitere Studie zeigte kürzlich, dass Gp96 auch in der Lage ist MHC Klasse II spezifische Peptide zu binden und an MHC Klasse II zu übertragen, wobei die peptidspezifischen T-Zellen zwar proliferieren, aber keine Effektorzytokine wie IFN- γ oder IL-4 exprimieren ²⁴⁸.

5.3 Behandlung von Mäusen mit Gp96 im Transfer-Kolitis Maus-Modell

Die Idee für die Versuche, Spendermäuse vor einem T-Zell-Transfer mit Gp96, Gp96/Peptid-Komplexen und denaturiertem Gp96 zu behandeln, begründete sich auf Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Chandawarkar. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Behandlung von *non-obese diabetic* (NOD) Mäusen, die spontan einen Diabetes entwickeln, mit 100 μ g Gp96 die Entwicklung des Diabetes verhindert, und dass diese protektive Wirkung durch adoptiven Transfer von CD4⁺-T-Zellen auf andere NOD-Mäuse übertragen werden kann ¹²⁸. In einem T-Zell-Transfer-Modell einer chronischen Kolitis, das bereits in den 90er Jahren etabliert und 2002 durch Mudter und Mitarbeiter modifiziert wurde, wird die chronische intestinale Entzündung durch den Transfer CD4⁺ CD62L⁺-T-Zellen in immundefiziente CB17 Scid-Mäuse induziert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Transfer regulatorischer T-Zellen in diesem Entzündungsmodell die Kolitis inhibiert werden kann ²⁴². Unter der Annahme, dass die Gabe von Gp96 in der Lage ist, *in vivo* regulatorische T-Zell-vermittelte Mechanismen zu induzieren, formulierten wir die Hypothese, dass die Applikation von

Gp96 in Spendertieren eine T-Zell-Population mit regulatorischen Fähigkeiten induzieren könnte, die dann in der Lage ist, nach Transfer in Scid-Mäuse die Entwicklung einer Kolitis zu inhibieren. Unterschiedliche Versuchsansätze wurden hierfür getestet: Zum einen sollte versucht werden, die Empfängertiere nach dem Transfer normaler $CD4^+ CD62L^+$ -Zellen mit Gp96 und denaturiertem Gp96 zu behandeln, zum anderen sollten, in Anlehnung an die Ergebnisse von Chandawarkar, die Spendertiere mit Gp96, peptidbeladenem Gp96 oder denaturiertem Gp96 behandelt werden, um einen möglicherweise regulatorischen T-Zelltyp zu erzeugen, der in den Empfängertieren keine, oder nur eine schwache Kolitis induziert. In den Arbeitsgruppen von Dr. Ulrike Strauch und Dr. Florian Obermeier war das Transfer-Kolitis Maus-Modell gut etabliert, so dass die Experimente in Kooperation mit diesen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden.

5.3.1 Behandlung der Spendertiere mit Gp96, Gp95/Pep und Gp96/denat.

Die Behandlung der Spendertiere für den Transfer von $CD4^+CD62L^+$ -T-Zellen mit Gp96 erfolgte in drei unabhängigen Transferexperimenten. In zweien dieser Versuche wurden die Spendertiere zweimal und in einem der Versuche wurden die Spendertiere dreimal mit jeweils 100 μ g Gp96 behandelt. Die Injektionen erfolgten *subcutan* im Abstand von jeweils einer Woche. Die Wahl der Menge und der Injektionszeitpunkte war dabei der Arbeit von Chandawarkar und Mitarbeitern abgeleitet, die in Ihren Versuchen NOD-Mäuse mit diesen Mengen behandelt hatten.

Für die Beurteilung der Schwere der Entzündung wurden verschiedene Parameter untersucht. Zunächst wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Ein Gewichtsverlust kann dabei ein klinischer Hinweis auf eine Darmentzündung sein, da die Tiere eine Diarrhö entwickeln. Im ersten Transfer-Versuch war eine erwartete Gewichtsentwicklung erzielt worden. Die PBS-Tiere nahmen stetig an Gewicht zu, wohingegen die $CD62L^+$ -Tiere ab der zweiten Woche nach T-Zell-Transfer Gewicht zu verlieren begannen. Die Gewichtsentwicklung der Tiere, die Zellen aus Gp96-vorbehandelten Donoren erhalten hatten, und die, die nach Transfer behandelt worden waren, lagen zwischen diesen Kontrollgruppen. Diese Beobachtung ließ bereits während des Versuchs darauf schließen, dass die Tiere eine schwächere intestinale Entzündung entwickelten als die $CD62L^+$ -Tiere. In den beiden folgenden Transfer-

Versuchen waren die Gewichtsverläufe nicht mehr so eindeutig. Vor allem die Tiere der CD62L⁺-Gruppe verloren nicht mehr so stark an Gewicht. Die PBS-Tiere verloren im dritten Transfer sogar genauso an Gewicht wie die Tiere der CD62L⁺-Gruppe, so dass während des laufenden Versuchs anhand des Gewichtsverlaufs kein Rückschluß auf mögliche Unterschiede in der Schwere der Entzündung zwischen den Gruppen gezogen werden konnte. Mögliche Ursachen für die Unterschiede in den Gewichtskurven der verschiedenen Experimente könnten äußere Faktoren, wie die Verweildauer im Tierstall vor dem Versuch und das Alter der Tiere sein. Je länger die Mäuse im hauseigenen Tierstall vor dem Versuch verweilen, desto weniger stark verlieren sie an Gewicht. Das kann z.B. an der Futterumstellung vom Lieferanten zum „neuen“ Tierstall liegen. Vor allem bei der Dextran-Natriumsulfat (DSS)-Kolitis ist es wichtig den Tieren vor Beginn des Versuchs eine Eingewöhnungsphase zu gönnen, damit sie nicht so rasch an Gewicht verlieren. Aber auch bei der Transfer-Kolitis sollte man aufgrund dieser Ergebnisse die Verweildauer im Tierstall und das Alter der Tiere möglichst einheitlich gestalten, um mögliche dadurch bedingte Unterschiede in den Gewichtskurven zu vermeiden. Da es sich nicht um einen SPF-Tierstall handelt, kann auch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Scid-Mäuse bereits bei der Lieferung an einer Infektion litten.

Weiterhin wurden, nachdem die Tiere getötet worden waren, die Milzgewichte ermittelt und die Darmlängen gemessen. Letzteres ist bei der DSS-induzierten Kolitis bei Mäusen ein guter Anhaltspunkt für eine bestehende Darmentzündung bei den Tieren, da sich der Darm in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung verkürzt und verdickt. Bei der Transfer-Kolitis korrelieren beide Parameter jedoch nicht verlässlich mit dem Schweregrad der Kolitis. Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Lediglich im zweiten Transfer waren die Därme der Tiere, die histologisch eine Entzündung aufwiesen, im Vergleich zur PBS-Gruppe, signifikant verkürzt. In den beiden anderen Transfer-Experimenten war dies nicht der Fall. Für die Zukunft können bei Transfer-Experimenten diese beiden Parameter außer Acht gelassen werden.

5.3.1.1 Behandlung der Spendertiere: Histologie

Den wichtigsten Parameter für die Beurteilung des Schweregrades der Darmentzündung stellt die histologische Untersuchung des Kolons dar. Dabei wird das gesamte Kolon auf Entzündungsinfiltrate und Epithelschäden untersucht und ein Score gebildet. Je niedriger der Score, desto geringer die Entzündung.

Die Tiere der VB Gp96-Gruppen wiesen im ersten ($1,3 \pm 0,6$) und im zweiten Transfer ($1,6 \pm 1,2$), im Vergleich zu Tieren der CD62L⁺-Gruppe ($2,6 \pm 0,25$ und $2,8 \pm 0,4$), einen signifikant besseren Score auf. Im dritten Transfer war der Score der Tiere der VB Gp96-Gruppe nicht statistisch signifikant niedriger ($2,2 \pm 0,5$), wobei der Score der CD62L⁺-Gruppe dem der ersten beiden Transfer-Experimente entsprach ($2,7 \pm 0,4$). Da beim ersten und dritten Transfer die Vorbehandlung der Spendertiere auf die gleiche Weise erfolgt war, können die Scores dieser Gruppe, und der Kontrollgruppen (PBS und CD62L⁺) zusammengefasst werden. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied im histologischen Score und damit im Grad der intestinalen Entzündung. Die Tiere der Gp96-Gruppe hatten einen Score von $1,8 \pm 0,7$, die der CD62L⁺-Gruppe einen von $2,7 \pm 0,3$. Eine dreimalige oder zweimalige Behandlung der Spendertiere mit je 100 µg Gp96 machte somit keinen Unterschied in der Ausprägung der intestinalen Entzündung. Warum die Tiere im dritten Transferversuch histologisch keine deutliche Verbesserung der intestinalen Entzündung aufwiesen, lässt sich nur schwer nachvollziehen. Möglicherweise kam es bei diesem Experiment zu einer Infektion. Diese Vermutung ergibt sich aus der Beobachtung, dass Tiere der VB Gp96/denat.-Gruppe, die eine starke Kolitis entwickelten und zudem eine Konjunktivitis aufwiesen, mit Tieren der anderen Gruppen in einem Käfig saßen. Es war zu beobachten, dass nach einigen Tagen die Konjunktivitis auch auf die Tiere der VB Gp96-Gruppe übertragen wurde. Dies könnte eine mögliche Ursache für die starke intestinale Entzündung der Tiere sein.

Die Behandlung der Spender mit peptidbeladenem Gp96 erbrachte im ersten Transfer ebenfalls eine statistisch signifikante Verbesserung der Entzündung ($1,5 \pm 0,9$), wobei der Unterschied beim zweiten Transfer keine Signifikanz zeigte ($2,0 \pm 0,8$). Da beim ersten Transfer die Behandlung zweimal und beim zweiten Transfer dreimal erfolgte, kann man die Ergebnisse korrekterweise nicht zusammenfassen, obwohl dies zu einem signifikanten Unterschied im Entzündungsgrad führen würde.

(Gp96/Pep [$1,8 \pm 0,9$] vs. CD62L+ [$2,7 \pm 0,4$] $p < 0,01$). Die Beladung von Gp96 mit Peptiden scheint demnach keinen Vorteil für die Inhibition der intestinalen Entzündung zu bringen. Eine Möglichkeit wäre dass die Peptide, da sie nicht kovalent an Gp96 gebunden sind, möglicherweise dissoziieren, so dass bei der Behandlung der Mäuse ein Teil der Peptide nicht an Gp96 gebunden transferiert wurde, sondern als freies Antigen. Dies könnte eine gegen diese *E.coli*-Peptide gerichtete aktive Immunantwort auslösen und zu reaktiven T-Zellen führen, die im Darm der Empfänger-Tiere eine Entzündung auslösen. Das vorhandene freie Gp96 - und möglicherweise auch das peptidbeladene Gp96 - tragen aber vermutlich zusätzlich zur Generierung eines regulatorischen T-Zell-Typs bei, so dass die Entzündung bei Behandlung der Spendertiere mit Gp96/Pep dennoch leicht verbessert wird. Dass im zweiten Transfer die intestinale Entzündung der Empfängertiere, die Zellen von mit Gp96/Pep behandelten Donormäusen erhielten, ausgeprägter war, als im ersten Transfer, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass das verwendete peptidbeladene Gp96 zum Zeitpunkt des zweiten Experiments bereits längere Zeit gelagert worden war. Dadurch könnte sich mehr Peptid von Gp96 gelöst haben, als dies beim ersten Transfer der Fall war, als das Gp96 noch frisch war.

Die Behandlung der Donortiere mit denaturiertem Gp96 führte, wie erwartet, zu keiner Verbesserung der intestinalen Entzündung. Gp96/denat. diente als Kontrolle dafür, dass Gp96 nur im nativen Zustand zu einer Modulation der Immunantwort in der Lage ist, was im dritten Transfer gezeigt werden konnte.

5.3.1.2 Behandlung der Spendertiere: Zytokinsekretion

Zur Beurteilung des T-Zell-Typs, der nach Gp96-Behandlung in den Spendertieren erzeugt wurde, wurden die zu transferierenden Zellen auf die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF und IFN- γ untersucht. Die Sekretion derselben Zytokine wurde auch bei aus den Scid-Tieren nach Transfer isolierten MLN-Zellen gemessen, um feststellen zu können, welchen Phänotyp die Zellen nach dem Transfer aufwiesen. Da Scid-Tiere keine funktionsfähigen T-Zellen besitzen, werden bei der Isolation der MLN u.a. die einige Wochen zuvor transferierten T-Zellen isoliert.

In unseren Experimenten konnte bei der Betrachtung der Zytokine kein so eindeutiges Ergebnis erzielt werden, wie bei den histologischen Scores. Im ersten

Versuch wurden die transferierten Donorzellen nicht auf ihre Zytokinsekretion untersucht. Im zweiten Transfer zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen $CD4^+CD62L^+$ -Zellen von Donoren nach Behandlung mit Gp96 und unbehandelten Tieren. Erstere produzierten signifikant vermehrt antiinflammatorische (IL-4, IL-10, IL-13) und weniger proinflammatorische Zytokine (IL-6, TNF, IFN- γ). Auch nach Behandlung der Spendertiere mit Gp96/Pep zeigte sich ein ähnliches Bild. Im dritten Transfer zeigte sich eine andere Situation: Durch Gp96 konnte dort kein antiinflammatorisches Zytokinprofil in den T-Zellen erzeugt werden. Lediglich die IFN- γ -Sekretion war herabgesetzt. Dies zeigte sich jedoch auch nach Behandlung mit denaturiertem Gp96. Möglicherweise erklärt dieses unveränderte Zytokinprofil der transferierten T-Zellen, weshalb es in diesem Transferversuch zu keiner deutlichen Verbesserung der intestinalen Entzündung kam. Da im ersten Transfer die T-Zellen nicht auf die Zytokinsekretion hin charakterisiert wurden, kann kein eindeutiger Schluss auf die Wirkung von Gp96 gezogen werden. Weil aber im ersten Transfer, genauso wie im zweiten, eine Verbesserung der Entzündung erzielt wurde, kann vermutet werden, dass Gp96 das Zytokinprofil auch im ersten Transfer moduliert hat. Warum wir dieses Phänomen im dritten Versuch nicht nachvollziehen konnten, bleibt unklar. Es wurde eine andere Charge Gp96 verwendet als im ersten und zweiten Transfer. Es kann, trotz der Kontrollen der Firma Immatics Biotechnologies, nicht ausgeschlossen werden, dass die Endotoxin-Menge dieser Charge höher war als in der ersten Charge. Des Weiteren kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Balb/c-Spendertiere eine unerkannte Infektion hatten - diese kann z.B. schon bei Lieferung der Tiere bestanden haben - und dass dadurch reaktive T-Zellen generiert wurden. Dafür spricht auch der starke Gewichtsverlust und die schlechtere Histologie. Um die Frage definitiv zu klären, ob Gp96 in der Lage ist, regulatorische T-Zellen zu generieren, müssen auf jeden Fall weitere Transfer-Versuche, mit der Untersuchung der Zytokine der zu transferierenden Zellen, durchgeführt werden. Ein weiteres regulatorisches Zytokin, TGF- β , kann dabei ergänzend untersucht werden. Zusätzlich können die $CD4^+CD62L^+$ -T-Zellen auch auf die Expression von Foxp3 (*forkhead box P3*) und der regulatorischen T-Zell-Marker GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), CTLA4 (*cytotoxic t-lymphocyte antigen*) und CD30 betrachtet werden.

Die MLN-Zellen wurden bei allen drei Versuchen isoliert und ebenfalls auf die Sekretion der oben genannten Zytokine untersucht. Meist ergab sich dabei kein Un-

terschied in der Relation der Mengen zwischen den unterschiedlichen Gruppen, wenn die MLN-Zellen stimuliert wurden oder unstimuliert blieben, lediglich die Gesamtmenge war nach Stimulation höher. Im ersten und dritten Transfer war das Zytokinprofil der MLN-Zellen bei Tieren, die Zellen aus mit Gp96 behandelten Spendern erhalten hatten, ähnlich. IL-4, IL-10 und IL-13 war, im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe, in beiden Versuchen erhöht. Somit ließ sich also feststellen, dass in den Scid-Tieren vermehrt T_H2-Zytokine gebildet wurden, wenn sie Zellen aus zweimal mit Gp96 behandelten Spendern erhalten hatten. Der zweite Transfer unterschied sich deutlich vom ersten und dritten Transfer was die Zytokinsekretion betraf. Obwohl die transferierten Zellen gerade in diesem Transfer ein antiinflammatorisches Zytokinmuster hatten, war dies für die MLN-Zellen nicht der Fall. Im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe war IL-6 erhöht und IL-13 erniedrigt. Alle anderen Zytokine zeigten dieselbe Sekretionsrate wie in der CD62⁺-Gruppe. Aufgrund der Zytokinsekretion der MLN-Zellen lässt sich also im zweiten Transfer die Verbesserung der intestinalen Entzündung nicht erklären. Da aber alle Tiere, auch die, die Zellen aus mit Gp96 behandelten Donortieren erhalten hatten, und die, die nach dem Transfer mit Gp96 behandelt worden waren, eine, wenn auch schwächere, intestinale Entzündung hatten, ist anzunehmen, dass Gp96 nicht in der Lage war, alle transferierten Zellen zu modifizieren. Dies legt den Schluß nahe, dass immer regulatorische T-Zellen zusammen mit aktivierten T-Zellen kotransferiert wurden. Es ist möglich, dass im Vergleich zu aktivierten T-Zellen relativ wenige regulatorische T-Zellen vorlagen, so dass das Zytokinmuster nicht stark verändert wurde. Die wenigen regulatorischen T-Zellen könnten aber dennoch im Gewebe, bei Zell-Zell-Kontakt, einen starken protektiven Effekt aufweisen. Nur weitere Versuche mit Gp96-Behandlung der Donortiere können über die Relevanz der bisherigen Ergebnisse Aufschluss geben. Auch die MLN-Zellen sollten dann auf die Produktion von TGF- β und die Expression von FoxP3, GITR, CTLA4 und CD30 untersucht werden. Die Untersuchung dieser Marker lässt einen genaueren Schluss über den Phänotyp und die Funktion der generierten T-Zellen zu.

5.3.2 Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer

Ein weiterer Ansatz war die Behandlung der Scid-Tiere nach dem Transfer von CD4⁺CD62L⁺-T-Zellen. Im ersten Transfer wurden die Tiere an Tag 1 und 7 nach

dem Transfer mit jeweils 100 µg Gp96 behandelt. Im dritten Transfer wurden sie viermal mit je 100 µg Gp96, oder denaturiertem Gp96 behandelt. Im zweiten Transfer wurde zugunsten größerer Gruppen auf eine Gruppe, die nach dem Transfer behandelt wurde, verzichtet. Die Behandlung im ersten Transfer lehnte sich an die Arbeit von Chandawarkar und Mitarbeiter an ¹²⁸. Durch die viermalige Gabe von Gp96 im dritten Transfer sollte eine weitere Verbesserung der Entzündung erreicht werden. Anhand der Gewichtskurve im ersten Transfer konnte auf einen Erfolg der Behandlung mit Gp96 geschlossen werden, da die Tiere im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe weniger stark an Gewicht verloren. Im dritten Transfer wiesen die Tiere, die mit Gp96 behandelt wurden, einen stärkeren Gewichtsverlust auf, als die Tiere der CD62L⁺-Gruppe. Die Tiere, die mit denaturiertem Gp96 behandelt worden waren, verloren noch stärker an Gewicht und drei der sechs Tiere verstarben schon während des laufenden Versuchs. In diesem Transfer war es anhand der Gewichtskurven nicht möglich Rückschlüsse auf einen möglichen Therapie-Erfolg durch die Behandlung mit Gp96 zu ziehen. Für die unterschiedlichen Gewichtsverläufe bei der Behandlung nach Transfer können die gleichen Faktoren wie bei der Behandlung der Donortiere ursächlich gewesen sein: unterschiedliche Verweildauer der Mäuse nach Lieferung im Tierstall, Probleme der Tiere mit der Futterumstellung, unterschiedliches Alter und unterschiedliche Anfangsgewichte der Tiere bei Versuchsbeginn. Auch die, möglicherweise durch die mit Gp96/denat. behandelten Tiere übertragene Konjunktivitis könnte ursächlich sein. Weiterhin kommt auch bei diesen Tieren eine mögliche Infektion in Frage, die schon bei der Lieferung bestanden haben könnte.

5.3.2.1 Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer: Histologie

Die Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer verbesserte sowohl im ersten, als auch im dritten Transfer die Kolitis, wie sich in einem histologischen Score im Vergleich zur CD62L⁺-Gruppe zeigte. Im ersten Transfer war der Score mit $1,9 \pm 0,2$ etwas schlechter als im dritten Transfer. Dort lag er bei $1,6 \pm 0,7$. Der Unterschied zur CD62L⁺-Gruppe war in beiden Versuchen statistisch signifikant. Erfolgte die Behandlung mit denaturiertem Gp96, kam es zu keiner Veränderung des histologischen Scores im Vergleich zur Kontrollgruppe, so dass daraus geschlossen werden kann, dass durch die Applikation von Gp96 keine unspezifische Stimulation des Immunsys-

tems erfolgte, sondern ein spezifischer Effekt zur Verbesserung der Entzündung führte. Der Unterschied zwischen dem ersten und dem dritten Transfer ist nicht signifikant. Es kann somit geschlossen werden, dass eine Behandlung nach Transfer die Ausprägung einer Kolitis mildern kann, wobei es keinen Unterschied macht, ob die Behandlung zwei- oder viermal erfolgt.

Unter 4.6 wurde gezeigt, dass bei der durch T-Zell-Transfer ausgelösten Kolitis kein Gp96 in der intestinalen Mukosa der Maus nachzuweisen war. Durch das nach dem Transfer applizierte Gp96 wird dem Organismus möglicherweise das fehlende Gp96 zugeführt, so dass es seine entzündungshemmende Funktion ausüben kann.

Der Erfolg der Behandlung mit Gp96 nach dem T-Zell-Transfer kann wahrscheinlich noch verbessert werden. Chandawarkar und Mitarbeiter vermuteten, dass der Zeitpunkt der Applikation sehr wichtig sei und dass bereits eine Immunreaktion vorliegen müsse, damit Gp96 diese modulieren kann¹²⁸. Somit ist zu vermuten, dass die Behandlung mit Gp96 nach dem Transfer zu früh begonnen wurde, und dass es sinnvoller wäre mit der Behandlung erst zwei bis drei Wochen nach dem T-Zell-Transfer zu beginnen, wenn es bereits zur Generierung aktivierter T-Zellen gekommen ist.

5.3.2.2 Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer: Zytokinsekretion

Die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF und IFN- γ der MLN-Zellen wurde auch bei der Behandlung der Tiere nach dem Transfer gemessen. Dabei unterschied sich die Produktion einiger Zytokine zwischen den beiden Versuchen. Bei zweimaliger Behandlung nach dem Transfer waren IL-4, IL-13 und IFN- γ herauf-, IL-6 und IL-10 herabreguliert. Das stellt eine Erklärung für den Behandlungserfolg dar, da die transferierten T-Zellen durch das applizierte Gp96 wohl zu einem regulatorischen T-Zell-Typ mit entsprechendem Zytokinprofil ausdifferenzierten und keine eben-sostarke Entzündung auslösten, wie T-Zellen ohne die Gabe von Gp96. Bei viermaliger Behandlung mit Gp96 waren alle gemessenen Zytokine herabreguliert. Die Herabregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF ist dabei als positiv für den Verlauf der Entzündung zu bewerten, wohingegen die verminderte Produktion von IL-4, IL-10 und IL-13 den Behandlungserfolg nicht erklären kann. Möglicherweise

werden durch die mehrfache Gabe von Gp96 die T-Zellen völlig inaktiviert und sezernieren daraufhin generell kaum noch Zytokine, so dass sie zwar keine aktiven regulatorischen Eigenschaften, durch Sekretion entsprechender Zytokine, mehr ausüben, aber auch nicht entzündungsfördernd wirken. Erstaunlich ist dabei aber, dass auch nach Gabe des denaturierten Gp96 alle Zytokine herabreguliert wurden. Diese Tiere hatten eine sehr starke intestinale Entzündung entwickelt, so dass man schließen muss, dass das Gp96 in den Tieren, die nach Transfer behandelt worden waren, nicht ausschließlich auf T-Zellen wirkt, sondern andere regulatorische Mechanismen zum Tragen kommen. Es ist nicht auszuschließen, dass APCs durch das Gp96 direkt inaktiviert werden und keine gewebsdestruktiven Funktionen mehr ausüben. Möglich ist auch, dass nach nur zweimaliger Gabe von Gp96 nur ein Einfluss auf die T-Zellen erfolgt, welche dann ein antiinflammatorisches Zytokinprofil zeigen. Bei der viermaligen Gabe wird dieser Effekt vielleicht verstärkt, indem die T-Zellen anerg werden und die gesamte Zytokinproduktion herabregulieren. Zusätzlich ist vielleicht erst die mehrfache Gabe dazu in der Lage, auch APCs zu inaktivieren. Dafür spricht, dass nach viermaliger Behandlung die Entzündung nochmals verbessert wurde, als nach nur zweimaliger Gabe von Gp96, auch wenn diese Verbesserung nicht signifikant war.

5.3.3 Mögliche Wirkweise von Gp96 bei der Behandlung der Transfer-Kolitis

Die Behandlung der Balb/c-Donortiere mit Gp96 und die Behandlung nach dem T-Zell-Transfer, bringen eine Verbesserung der intestinalen Entzündung mit sich, wobei es wohl Gp96 alleine zuzuschreiben ist und nicht von den auf Gp96 geladenen Peptiden abhängt, ob die Entzündung verbessert wird. Dass der therapeutische Effekt von Gp96 nicht antigenspezifisch ist, wurde schon früher gezeigt und konnte in diesen Versuchen bestätigt werden. Das ist insofern interessant, als die Vermittlung einer Immunantwort gegenüber Tumoren von den an Gp96 gebundenen Peptiden abhängt (siehe dazu 1.5.1) und somit als relativ antigenspezifisch zu betrachten ist.

Die Behandlung der Spendertiere mit Gp96 könnte also einen T-Zell-Typ generieren, der die Entwicklung von Kolitis-regulierenden Immunphänomenen in den Empfängertieren vermittelt. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, dass beim zweiten Transfer, die transferierten Zellen vermehrt IL-4 und IL-13 sezernieren. Beide Zytokine gelten als Inhibitoren der Makrophagen-Aktivierung und sind in der Lage

die TNF- und IFN- γ -Sekretion zu unterdrücken^{109, 212}. IL-4 und IL-13 scheinen also die Expression von IL-6, TNF und IFN- γ in Schach zu halten, so dass vermutet werden kann, dass durch Gp96 ein T-Zell-Typ generiert wird, der in den Scid-Mäusen die Ausprägung der Kolitis vermindert und somit regulatorische Funktionen haben könnte. Bisher wurden hauptsächlich regulatorische T-Zellen beschrieben, die IL-10 exprimieren. Dazu gehören vor allem natürlich vorkommende CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen, aber auch induzierbare CD25⁻ T-Zellen (Tr1) (siehe dazu 1.3.1.3.1). Da die transferierten Zellen auch auf den Oberflächenmarker CD25 untersucht wurden, und festgestellt wurde, dass dieser auf den transferierten CD4⁺ CD62L⁺ T-Zellen aus Gp96-behandelten Tieren ebensowenig exprimiert wird (4.7), wie auf Zellen der Kontrolltiere, kann angenommen werden, dass die durch Gp96-Behandlung induzierten T-Zellen keinen klassischen CD25⁺-Phänotyp aufweisen. Sowohl CD25⁺ als auch CD25⁻ regulatorische T-Zellen sind in der Lage im Transfer-Modell die Entstehung einer Kolitis zu inhibieren, wobei der regulatorische Effekt vor allem dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 zugeschrieben wird^{39, 50}. Interessanterweise ist nach Behandlung der Spendertiere mit Gp96 die Sekretion von IL-10 in den T-Zellen nicht erhöht. Somit scheint durch Gp96-Behandlung ein T-Zell-Typ mit regulatorischen Eigenschaften generiert zu werden, der seine regulatorische Fähigkeit nicht über Sekretion von IL-10 vermittelt. Es ist aber auch möglich, dass Gp96 T-Zellen generiert, die anerg sind und keinerlei aktivierende Eigenschaften mehr besitzen. Diese These wird durch eine Publikation von Doody und Mitarbeitern gestützt, in der gezeigt wurde, dass Gp96-gebundene Peptide auf MHC Klasse II Moleküle übertragen werden können. Diese Peptide werden CD4⁺ T-Zellen präsentiert, wobei die T-Zellen dabei nicht aktiviert werden, sondern Anergie aufweisen²⁴⁸.

Das Zytokinprofil der MLN-Zellen zeigte in drei verschiedenen Transfer-Versuchen, sowohl bei Behandlung der Spendertiere, als auch bei Behandlung nach Transfer, deutliche Unterschiede. Lediglich beim ersten und dritten Transfer gab es bei der Gruppe, die Zellen aus mit Gp96 behandelten Spendertieren bekommen hatte, Übereinstimmungen in der Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13. Die Unterschiede in den Ergebnissen der Transfer-Versuche könnten daher rühren, dass man bei der Behandlung mit Gp96 möglicherweise am unteren Limit der notwendigen Gp96-Dosis ist, die für die Induktion von Toleranz notwendig ist, und man noch mehr Gp96 einsetzen muss, um den Effekt deutlicher herauszustellen.

Die in dieser Arbeit verwendete Dosis wurde in Anlehnung an eine Studie eingesetzt, in der durch Gabe von 100 µg Gp96 die Entstehung eines Diabetes in NOD-Mäusen verhindert wurde¹²⁸. Da es sich dabei um eine andere Erkrankung handelt, ist nicht auszuschließen, dass dort andere Mengen zum gewünschten Erfolg führen, als bei einer intestinalen Entzündung. Es sollte daher eine Behandlung der Donortiere mit höheren, aber auch mit niedrigeren Dosen von Gp96 durchgeführt werden, um die Ergebnisse weiter zu bestätigen. Die genaue Wirkweise von Gp96 bleibt dabei zu untersuchen.

Dass Gp96 Immunität erzeugen kann, und dass dies auf der Anwesenheit von Peptiden beruht, wurde bereits sehr ausführlich gezeigt^{141, 131, 146, 154, 126, 259, 260}. Im Gegensatz dazu ist für die Vermittlung von Suppressorfunktionen keine besondere Spezifität in Form eines bestimmten Peptids nötig. Das konnten Chandawarkar und Mitarbeiter zeigen, als sie Gp96 für die Vermittlung von Toleranz gegenüber eines Tumors einsetzten, das zum einen aus Tumorgewebe zum anderen aus normalem, gesunden Gewebe gewonnen worden war¹²⁸.

Es gibt einige tierexperimentelle Untersuchungen mit HSP 60 und 70, in denen gezeigt werden konnte, dass diese HSPs ebenfalls immunregulatorische Funktionen ausüben. Dabei scheint es eine Rolle zu spielen, dass HSPs phylogenetisch hoch konserviert sind²⁶¹. Im Zusammenhang mit Rheumatoider Arthritis, Diabetes Typ I und Atherosklerose wurde in Tierstudien schon mehrfach gezeigt, dass eine Behandlung mit HSP60 bzw. 70, oder deren Überexpression, die Entstehung dieser Erkrankungen unterbindet^{262, 263, 264, 265, 266, 267}. Der protektive Effekt der HSPs ist dabei unabhängig davon, gegen welche Antigene die Autoimmunerkrankung gerichtet ist²⁶¹. Bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis wurden HSP60-reaktive T-Zellen gefunden, die einen regulatorischen Phänotyp aufweisen. Dabei exprimierten von Patienten in Remission gewonnene T-Zellen nach Stimulation mit HSP60 die Oberflächenantigene CD25 und CD30 und sezernieren die regulatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und TGF-β²⁶⁸. Obwohl es erst wenige humane Daten gibt, zeichnet sich ein Bild ab, in dem die Expression von HSPs mit einer Unterdrückung von Entzündungen in Zusammenhang steht. In Abb. 5.1 ist die mögliche Wirkweise von HSPs bei der Induktion von Toleranz dargestellt.

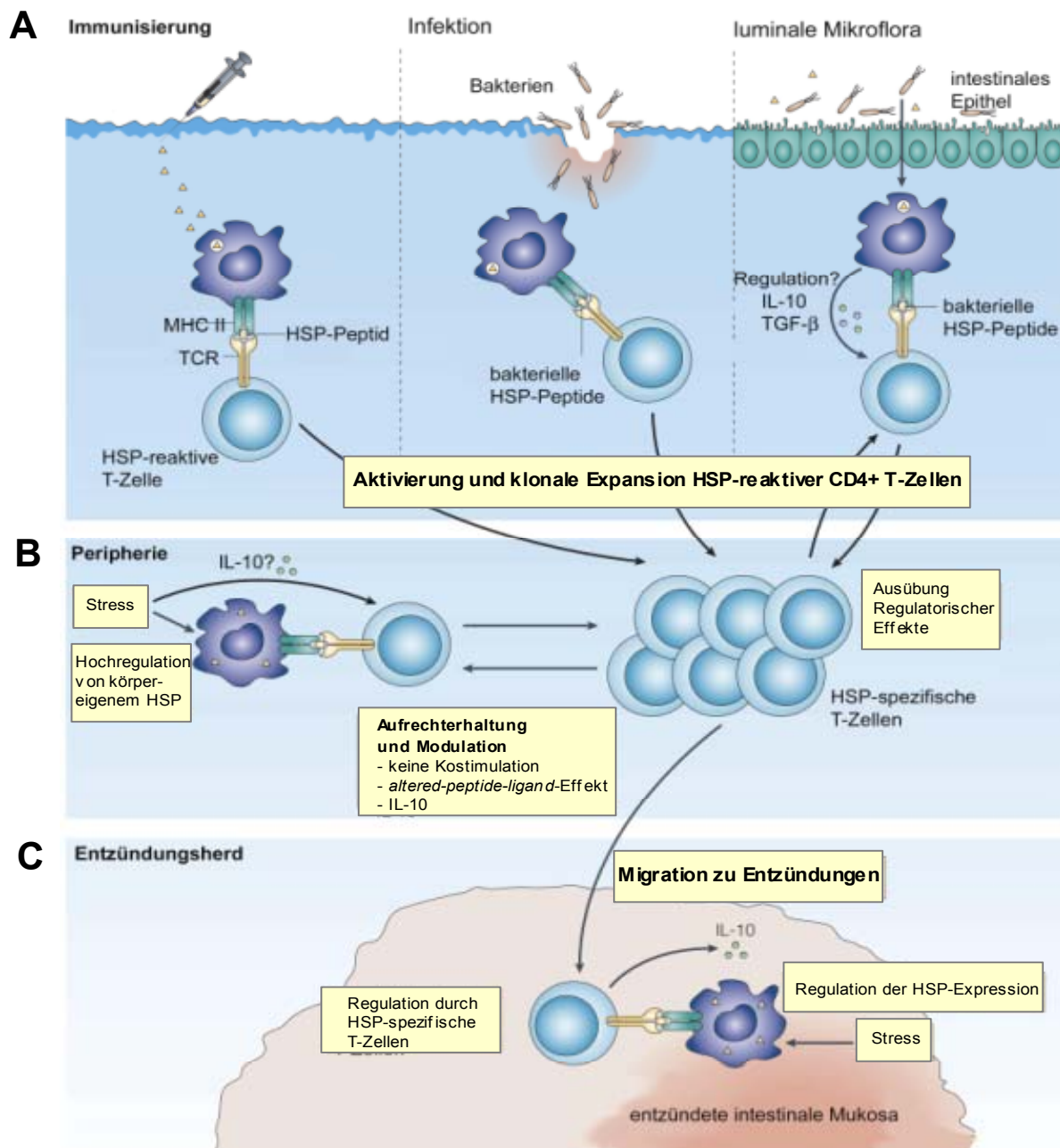


Abb. 5.1: Zelluläre Interaktionen zur Induktion regulatorischer HSP-spezifischer T-Zellen. A: T-Zellen, spezifisch für mikrobielle HSPs, können durch natürlichen Kontakt zu HSPs der bakteriellen Darmflora, bei Infektionen oder durch Immunisierung mit HSPs geprimed und aktiviert werden, so dass sie klonal expandieren. Gerade im MALT des Darmes können dabei vermutlich regulatorische Mechanismen in Gang gesetzt werden. B: In der Peripherie kann durch Exposition der T-Zellen zu APCs, die in Folge von Stress eigene HSP hochreguliert haben, die Toleranz weiter gefördert werden, vor allem wenn den APCs kostimulatorische Moleküle fehlen. C: In entzündetem Gewebe können die T-Zellen ihren regulatorischen Effekt einsetzen, wenn aufgrund von Stress körpereigene HSPs hochreguliert sind²⁶¹.

Für Mitglieder der HSP90-Familie ist bislang, außer in der Studie von Chandawarkar¹²⁸, keine immunregulatorische Wirkung beschrieben worden. Dennoch ist auf der Basis der dargestellten Ergebnisse anzunehmen, dass auch für Gp96 ein immunregulatorischer Mechanismus existiert, der analog dem von HSP60 und 70 funktioniert.

Der Wirk-Mechanismus von Gp96 ist noch unklar und es erfordert weitere Studien um ihn aufzuklären. Dies könnte z.B. durch Kokultur-Versuche von APCs mit T-Zellen unter Zugabe von Gp96 *in vitro* geschehen. Bisher ist lediglich bekannt, dass Gp96 an die Scavenger-Rezeptoren CD91, CD36^{160, 269, 270} und an die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4¹⁶² binden kann, wobei vor allem immunaktivierende Mechanismen getriggert werden. Weitere, bisher unbekannte Rezeptoren für Gp96 werden diskutiert¹⁶¹.

Körpereigene Peptide, oder bakterielle Peptide im Darm, können nach Applikation des Gp96 im Organismus daran binden. Nach Aufnahme in eine APC können die Peptide, wie neueste Studien zeigen, CD4⁺-T-Zellen präsentiert werden. Dies vermittelt keine Aktivierung der T-Zellen, sondern Anergie bei Herabregulation proinflammatorischer Zytokine²⁴⁸. Möglicherweise wirkt Gp96 in den gezeigten Transferversuchen auf diese Weise auf CD4⁺-T-Zellen und führt bei diesen zu Anergie. Der direkte Effekt von Gp96 auf T-Zellen ist noch nicht gut untersucht. Anhand des des beta-Galaktosidase- (beta-GAL) Modell-Systems konnte gezeigt werden, dass ein rekombinates Gp96/beta-GAL Fusionsprotein nicht in der Lage ist beta-GAL-spezifische T-Zellen *in vivo* zu generieren, wobei Gp96 aus einer beta-GAL-positiven Zell-Linie dazu aber in der Lage war^{271, 272}. Die Daten weisen darauf hin, dass es im Fall CD4⁺-T-Zellen auf die Art des an Gp96 gebundenen Peptides ankommt ob Anergie oder Immunität der Zellen erzeugt wird.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Rezeptoren für Gp96 auch auf Thrombozyten exprimiert werden¹⁴⁹, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch diese in den Prozess der Regulation des Immunsystems involviert sind. Humane Thrombozyten interagieren spezifisch mit Gp96. Die Anwesenheit von Thrombozyten während der Aktivierung von DCs reduziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Aktivierung der DCs. Der Effekt ist unabhängig von einem Zell-Zell-Kontakt zwischen den Thrombozyten und DCs. Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, dass dies ein regulatorischer Mechanismus ist, durch den Gp96 systemisch neutralisiert wird. Gerade bei Verletzungen, wenn chronische Entzündungen und

Immunantworten gegen körpereigenen Antigene verhindert werden müssen, kann dieser Mechanismus eine Rolle spielen ¹⁴⁹.

Möglicherweise führen hohe Dosen von Gp96 aber auch zur Entwicklung einer „CD4⁺-Super-Suppressorzelle“, die in der Lage ist, jede Art von Immunantwort zu unterdrücken ¹²⁸. Solch eine Zelle ist bisher noch nicht beschrieben worden und es bleibt zu untersuchen ob ein solcher Zelltyp existiert.

Bisher wurde oft davon ausgegangen, dass regulatorische Funktionen bei T-Zellen mit dem Oberflächenantigen CD25 in Zusammenhang stehen, wobei dies durch die Entdeckung der Tr1- und Th3-Zellen bereits widerlegt werden konnte (siehe dazu 1.3.1.3). Auch im Zusammenhang mit der Immunisierung mit hohen Gp96-Dosen scheinen keine CD25⁺ regulatorischen T-Zellen induziert zu werden, wie unter 4.7. (Abb. 4.12) gezeigt wurde. Dies wurde auch von Chandawarkar und Mitarbeitern in ihrem Modell beschrieben, wobei die Gruppe noch keine durch Gp96 induzierte regulatorische T-Zelle beschreiben konnte ¹²⁸.

Die gezeigten Daten weisen darauf hin, dass Gp96 bei der Unterdrückung von intestinalen Entzündungen eine Rolle spielt, wobei der genaue Mechanismus noch aufgeklärt werden muss.

5.4 Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen

In dieser Arbeit wurde neben Gp96 die Expression der im NF- κ B Signalweg involvierten Moleküle TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen untersucht. In der Arbeitsgruppe war bereits im Vorfeld durch subtraktive Hybridisierung festgestellt worden, dass TANK in intestinalen Makrophagen exprimiert wird. Durch Affymetrix GeneChip[®] Arrays und quantitative PCR wurde die Expression von TANK in intestinalen Makrophagen bestätigt. Bei der Auswertung der Affymetrix GeneChip[®] Analysen stellte sich heraus, dass die Expression einer weiteren Kinase, TBK1, in intestinalen Makrophagen unterdrückt ist. Das TANK-Protein konnte in LPMNZ und in intestinalen Makrophagen durch Western Blot und Immunhistochemie nachgewiesen werden. Leider war dies für TBK1 nicht möglich, da kommerziell kein Antikörper zu erwerben war, um diese Versuche durchzuführen.

Die Expression von TANK (Variante 1) in intestinalen Makrophagen bei gleichzeitiger Herabregulation von TBK1 ist ein Weg zur Deaktivierung des NF- κ B Signalweges. Schon seit längerem ist bekannt, dass NF- κ B in intestinalen Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa inaktiv und in denen der entzündeten Mukosa aktiv ist ²³⁵. Diese Regulation kann zum einen dadurch zustande kommen, dass Moleküle wie die *toll-like*-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 auf intestinalen Makrophagen nicht exprimiert werden ¹⁷ und es so nicht zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges kommen kann, zum anderen ist zur sicheren Deaktivierung von NF- κ B wahrscheinlich noch ein intrazellulärer Mechanismus notwendig, da nicht alle Rezeptoren, die zur Aktivierung dieses Signalweges führen, auf Makrophagen in der nicht entzündeten Mukosa herabreguliert sind. Damit es also nicht zur Aktivierung von NF- κ B, vor allem durch TNF, IL-1 oder CD40 kommt, könnte TANK in den intestinalen Makrophagen eine inhibitorische Rolle spielen, indem es TRAF2 bindet. Diese Bindung allein ist dabei inhibitorisch für die Signalweiterleitung ¹⁹². Da nun TBK1 nicht exprimiert wird, kann sich kein aktiver ternärer Komplex bestehend aus TBK1, TANK und TRAF2 bilden und es erfolgt keine Aktivierung der NIK-IKK-Kaskade (Abb. 5.2) ¹⁹⁴. Welche Rolle dabei die kürzere Variante 2 von TANK spielt ist nicht klar und bedarf weiterer Untersuchungen.

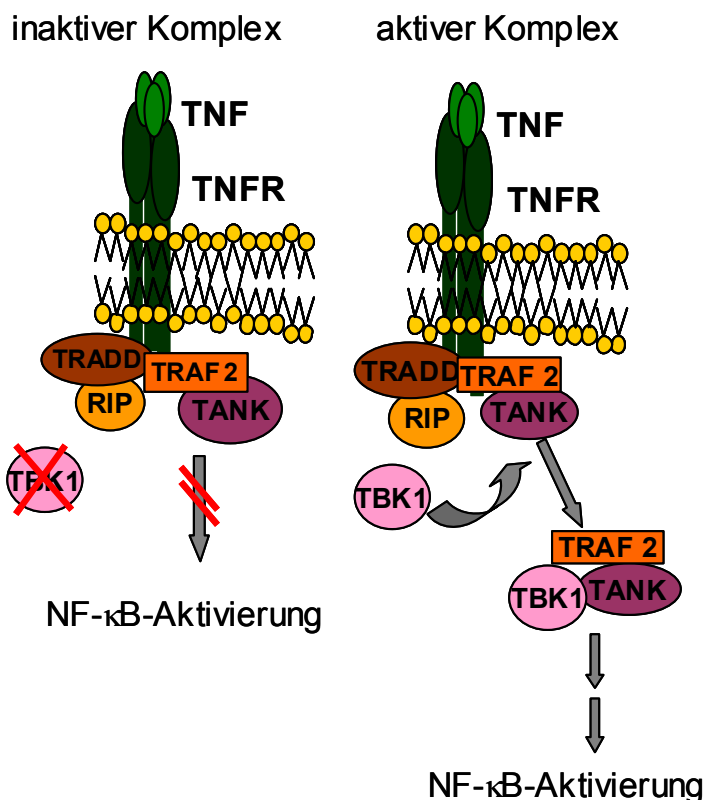


Abb. 5.2: Schema für das Zusammenwirken von TANK und TBK1 in der Aktivierung von NF- κ B. In Abwesenheit von TBK1 liegt TANK an TRAF2 gebunden vor und es kommt, trotz Ligandenbindung an den Rezeptor, nicht zur Signalweiterleitung und zur Aktivierung von NF- κ B. Diese Situation liegt in intestinalen Makrophagen vor. Bei Expression von TBK1 kommt es nach Ligandenbindung an den Rezeptor zur Bildung eines aktiven ternären Komplexes und in Folge zur Aktivierung von NF- κ B.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression und Funktion des Glykoproteins Gp96 in intestinalen Makrophagen bei Patienten mit und ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen untersucht. Dabei wurde zunächst die Expression in humaner intestinaler Mukosa untersucht und später die Wirkung von Gp96 auf den Entzündungsverlauf im Transfer-Kolitis-Maus-Modell. Weiterhin wurde die Expression der im NF- κ B Signalweg eingreifenden Proteine TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen betrachtet. Konstrukte für einen Targeting-Vektor einer Gp96-knock-out-Maus wurden hergestellt.

6.1 Expression von Gp96 in intestinaler Mukosa

Die Expression von Gp96 in intestinalen Makrophagen wurde mittels Affymetrix GeneChip[®] Analysen, RT-PCR, *real-time*-PCR (TaqMan[®]) und immunhistochemischer Färbungen in intestinalen Makrophagen, sowohl im humanen, als auch im murinen System untersucht. Gp96 wird in intestinalen Makrophagen exprimiert und bei der Differenzierung zu diesen induziert. Um dies zu prüfen, wurde die Gp96-Expression in Monozyten und in *in vitro* differenzierten Makrophagen mittels *real-time*-PCR und RT-PCR analysiert. Im MZS-Modell zur Differenzierung von Monozyten in intestinale Makrophagen wurde gezeigt, dass Gp96 differenzierungsspezifisch für intestinale Makrophagen ist. Gp96-Protein ist in intestinalen Makrophagen bei MC nicht nachzuweisen, bei anderen intestinalen Entzündungen, wie CU und Divertikulitis, ist es exprimiert. Daher kann man vermuten, dass Gp96 essenziell für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber luminalen Antigenen ist.

6.2 Behandlung von Mäusen mit einer durch T-Zell-Transfer induzierten Kolitis

Gp96 wurde zur Behandlung von immundefizienten Scid-Mäusen, bei denen durch den Transfer von $CD4^+ CD62L^+$ -Zellen eine Kolitis induziert wurde, eingesetzt. Des Weiteren wurden Balb/c-Donortiere mit Gp96, peptidbeladenem Gp96 oder denaturiertem Gp96 behandelt und die T-Zellen auf Scid-Tiere übertragen. Es konnte festgestellt werden, dass die Behandlung der T-Zell-Spendertiere mit Gp96 einen positiven Effekt auf die Ausprägung der intestinalen Entzündung mit sich bringt. Auch die Behandlung der Tiere nach dem T-Zell-Transfer mit Gp96 führte zu diesem Ergebnis. Vor allem der histologische Score dieser Tiere war signifikant besser als der von Kontrolltieren. Auch die Analyse der Zytokinprofile der Donorzellen und der mesenterialen Lymphknotenzellen aus den Scid-Tieren zeigte, dass durch Gp96 T-Zellen generiert werden, die hauptsächlich T_H2 -Zytokine produzieren (IL-4, IL-10, IL-13) und somit regulatorische Funktion haben können. Die Transfer-Experimente lassen den Schluss auf eine essenzielle Rolle von Gp96 in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber luminalen Antigenen zu. Da Gp96 in intestinalen Makrophagen bei MC und der Transfer-Kolitis fehlt, kann vermutet werden, dass der Verlust von Toleranz für die Pathophysiologie bei MC wichtig ist.

6.3 Generierung einer konditionellen knock-out-Maus für Gp96

Die für den Targeting-Vektor benötigten drei Fragmente aus dem Maus-Genom, die Neomycin-Resistenz und das lox p-Element wurden per PCR amplifiziert und in jeweils einen Topo-Vektor kloniert. Die Sequenzierungen ergaben, dass es sich um die gewünschten Gensequenzen handelt, so dass die Klonierung des Targeting-Vektors fortgesetzt werden kann.

6.4 Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen

Die Expression von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen wurde zunächst mit Affymetrix GeneChip® Analysen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von TANK in intestinalen Makrophagen, im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen, erhöht, die von TBK1 erniedrigt war. Durch Western Blot wurde gezeigt, dass TANK in LPMNZ der intestinalen Mukosa sowohl bei Entzündung als auch ohne Entzündung exprimiert wird. Durch Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass TANK in intestinalen Makrophagen vorkommt, wenn keine Entzündung vorherrscht. Bei MC wurde TANK in anderen noch nicht näher charakterisierten Zellen gefunden. Die Heraufregulation von TANK, bei gleichzeitiger Herabregulation von TBK1, in normalen intestinalen Makrophagen könnte zur Inhibierung einer TRAF2 vermittelten NF-κB-Aktivierung führen, was die Differenzierung in einen anergen Makrophagentyp unterstützt. Das Fehlen von TANK in intestinalen Makrophagen bei MC könnte eine erhöhte TRAF2 vermittelte NF-κB Aktivität zu Folge haben.

7 Ausblick

7.1 Funktionelle Bedeutung von Gp96 bei der Aufrechterhaltung der Toleranz im Darm

Aus den erarbeiteten Ergebnissen ergeben sich eine Reihe von Folgeuntersuchungen: Bei den Experimenten im Transfer-Kolitis-Modell mit Gp96 vorbehandelten Spendertieren haben sich aufgrund der erzielten Ergebnisse neue Ansatzpunkte zur Fortführung der Experimente herausgestellt. In Zukunft soll zuerst nach einer optimalen Gp96-Dosis zur Vorbehandlung der Donortiere gesucht werden. Dabei können sowohl höhere (150 µg, 200 µg und 250 µg) als auch niedrigere Dosen (50 µg, 30 µg und 10 µg) zum Einsatz kommen. Weiterhin sollten auch den Tieren, die nach dem Transfer mit Gp96 behandelt werden, höhere (150 µg, 200 µg und 250 µg) und niedrigere (50 µg, 30 µg und 10 µg) Dosen appliziert werden. Die Behandlung soll 2-3 Wochen nach dem Transfer begonnen werden, da andere Autoren beschreiben, dass Gp96 am besten therapeutisch wirkt, wenn schon eine leichte Entzündung besteht ¹²⁸.

Außerdem soll der Mechanismus von Gp96 in diesem Zusammenhang durch *in vitro*-Versuche aufgeklärt werden. Dafür können frisch isolierte intestinale Makrophagen aus Patienten mit und ohne intestinale Entzündung herangezogen werden. Diese werden mit verschiedenen Gp96-Dosen (10 µg, 30 µg, 50 µg, 100 µg, 150 µg und 200µg) inkubiert und mit naiven CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Durch die Analyse der sezernierten Zytokine (z.B. IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF, IFN-γ und TGF-β), durch Proliferationsmessungen und FACS-Analysen (GITR, CTLA4 und CD30) kann der resultierende Phänotyp und Aktivierungszustand der T-Zellen bestimmt werden. Die Menge primärer Makrophagen ist limitiert, daher ist es sinnvoll, zunächst Kokultur-Versuche in einem von humanem Primärmaterial unabhängigen Modell durchzuführen. Hierzu kann man *in vitro* generierte dendritische Zellen der Maus und CD4⁺ CD62L⁺-Zellen desselben Mausstammes verwenden. Die DCs und die CD4⁺CD62L⁺-Zellen können in Kokulturen unter Zugabe unterschiedlicher Gp96-Mengen kultiviert werden. Die Überstände können auf Zytokine (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF, IFN-γ und TGF-β) und die T-Zellen im Durchflusszytometer auf Oberflä-

chenmarker wie CTLA4, GITR, CD103 und CD30 untersucht werden. Die so erzielten Ergebnisse lassen sich direkt auf die bereits durchgeführten Transfer-Versuche übertragen, da auch hier CD4⁺CD62L⁺-Zellen verwendet wurden.

Im Weiteren soll eine konditionelle Gp96-*knock-out*-Maus hergestellt werden. Die gentechnisch veränderte Maus mit den lox p-Elementen im Gp96-Gen wird mit einer *cre*-Rekombinase-Maus gekreuzt, die die Rekombinase in myeloiden Zellen trägt. So kann Gp96 selektiv in Monozyten und Makrophagen ausgeschaltet werden. Der Phänotyp der Gp96-*knock-out*-Maus kann Aufschluss über die Funktion von Gp96 bei Autoimmunerkrankungen oder intestinalen Entzündungen geben. Die Gabe von Gp96 bei der *knock-out*-Maus kann, analog der Behandlung von Scid-Tieren nach T-Zell-Transfer, getestet werden. Entwickelt die *knock-out*-Maus keine spontane Kolitis, kann durch Gabe von DSS im Trinkwasser eine Kolitis induziert werden. Dann kann untersucht werden, ob die *knock-out*-Mäuse ohne Gp96 in den Makrophagen einen höheren Entzündungs-Score entwickeln.

7.2 Untersuchung der Funktion von TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen

Zunächst muss die fehlende Expression von TBK1 in intestinalen Makrophagen verifiziert werden. Dafür werden *real-time*-PCR-Untersuchungen mit cDNA aus intestinalen Makrophagen verschiedener Patienten mit und ohne intestinale Entzündung, mit Monozyten und *in vitro* differenzierten Makrophagen durchgeführt. Zudem soll die verminderte Expression von TBK1 in intestinalen Makrophagen auf Protein-Ebene bestätigt werden. Da kein anti-TBK1-Antikörper kommerziell zu erwerben ist, muss zunächst ein Antikörper gegen TBK1 generiert werden. Danach soll die Expression von TBK1 in der intestinalen Mukosa immunhistochemisch auf Gefrier- oder Paraffinschnitten von intestinale Gewebe analysiert werden. Dabei kann durch Doppelfärbungen der TBK1-exprimierende Zelltyp charakterisiert werden. Im MZS-Modell zur Differenzierung von Monozyten in intestinale Makrophagen kann untersucht werden, ob TANK bei der Differenzierung zu intestinalen Makrophagen induziert, und TBK1 gleichzeitig herabreguliert wird. Der Nachweis von TANK und TBK1 kann dabei durch immunhistochemische Färbungen erfolgen.

Nachdem geklärt wurde, in welchen Zellen TANK und TBK1 exprimiert wird, kann TANK und/oder TBK1 in einer entsprechenden Zelllinie (z.B. MonoMac 6) überexprimiert werden. Durch einen NF- κ B-Reporter-Assay soll der Effekt dieser Überexpression auf die NF- κ B-Aktivität untersucht werden. Aber auch die Analyse der IL-8-Expression kann Aufschluss über die NF- κ B-Aktivität geben. Durch Versuche mit si-RNA zur Blockierung der TANK- und TBK1-Expression können die Überexpressionsversuche ergänzt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Schild H and Rammensee HG, gp96--the immune system's Swiss army knife, *Nat Immunol* 2000, **1**: 100-1
- 2 Aderem A and Ulevitch RJ, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 2000, **406**: 782-7
- 3 Aderem A and Underhill DM, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol* 1999, **17**: 593-623
- 4 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
- 5 Febbraio M, Hajjar DP and Silverstein RL, CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism, *J Clin Invest* 2001, **108**: 785-91
- 6 Herz J and Strickland DK, LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor, *J Clin Invest* 2001, **108**: 779-84
- 7 Beck, G. and Habicht, G, Das Wirbeltierimmunsystem: Vorformen bei Wirbellosen, *Spektrum der Wissenschaft* 1997, 30-36
- 8 Janeway, C. and Travers, P., Immunobiology, 5th Edition, Garland Publishing, New York, 2001.
- 9 Fanger MW, Shen L, Graziano RF, *et al.*, Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG, *Immunol Today* 1989, **10**: 92-9
- 10 Bonta IL and Ben-Efraim S, Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity, *J Leukoc Biol* 1993, **54**: 613-26
- 11 Andus, T., Rogler, G., Daig, R., *et al.*, The role of macrophages, Inflammatory Bowel Disease, Kluwer Academic Publisher, Boston, London, 1995, 281-297
- 12 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
- 13 Clarkson SB and Ory PA, CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes, *J Exp Med* 1988, **167**: 408-20
- 14 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
- 15 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
- 16 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
- 17 Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, *et al.*, Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation, *Gastroenterology* 2002, **122**: 1987-2000

- 18 Hausmann M, Spottl 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
- 19 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
- 20 Spottl T, Hausmann M, Kreutz M, *et al.*, Monocyte differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells, *J Leukoc Biol* 2001, **70**: 241-51
- 21 Hozumi N and Tonegawa S, Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, **73**: 3628-32
- 22 Havran WL and Boismenu R, Activation and function of gamma delta T cells, *Curr Opin Immunol* 1994, **6**: 442-6
- 23 Arstila TP, Casrouge A, Baron V, *et al.*, A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity, *Science* 1999, **286**: 958-61
- 24 Zinkernagel RM and Doherty PC, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system, *Nature* 1974, **248**: 701-2
- 25 Schwartz JC, Zhang X, Nathenson SG, *et al.*, Structural mechanisms of costimulation, *Nat Immunol* 2002, **3**: 427-34
- 26 Schoenberger SP, van der Voort EI, Krietemeijer GM, *et al.*, Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells, *J Immunol* 1998, **161**: 3808-12
- 27 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, *et al.*, Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD), *Clin Exp Immunol* 1995, **102**: 448-55
- 28 Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, *et al.*, Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12, *Eur J Immunol* 1996, **26**: 934-8
- 29 Elson CO, Cong Y, Iqbal N, *et al.*, Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma, *Semin Immunol* 2001, **13**: 187-94
- 30 Faria AM and Weiner HL, Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications, *Adv Immunol* 1999, **73**: 153-264
- 31 Sadlack B, Merz H, Schorle H, *et al.*, Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene, *Cell* 1993, **75**: 253-61
- 32 Kuhn R, Lohler J, Rennick D, *et al.*, Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis, *Cell* 1993, **75**: 263-74
- 33 Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, *et al.*, CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells, *J Exp Med* 1993, **178**: 237-44
- 34 Powrie F, Leach MW, Mauze S, *et al.*, Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells, *Immunity* 1994, **1**: 553-62
- 35 Powrie F, Leach MW, Mauze S, *et al.*, Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice, *Int Immunol* 1993, **5**: 1461-71

- 36 Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, *et al.*, Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity, *J Exp Med* 1994, **179**: 589-600
- 37 Powrie F, Carlino J, Leach MW, *et al.*, A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB^{low} CD4⁺ T cells, *J Exp Med* 1996, **183**: 2669-74
- 38 Asseman C, Read S and Powrie F, Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4⁺ regulatory T cells and IL-10, *J Immunol* 2003, **171**: 971-8
- 39 Groux H, O'Garra A, Bigler M, *et al.*, A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature* 1997, **389**: 737-42
- 40 Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, *et al.*, Type 1 T regulatory cells, *Immunol Rev* 2001, **182**: 68-79
- 41 Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, *et al.*, Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 2000, **43**: 617-27
- 42 Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, *et al.*, Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora, *J Immunol* 2002, **169**: 6112-9
- 43 Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, *et al.*, Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis, *J Exp Med* 2002, **196**: 505-15
- 44 Li MC and He SH, IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol* 2004, **10**: 620-5
- 45 Weiner HL, Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells, *Immunol Rev* 2001, **182**: 207-14
- 46 Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, *et al.*, CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood, *J Immunol* 2001, **167**: 1245-53
- 47 Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, *et al.*, Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood, *J Exp Med* 2001, **193**: 1303-10
- 48 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.*, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J Immunol* 1995, **155**: 1151-64
- 49 Zhang X, Izikson L, Liu L, *et al.*, Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration, *J Immunol* 2001, **167**: 4245-53
- 50 Read S, Malmstrom V and Powrie F, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation, *J Exp Med* 2000, **192**: 295-302
- 51 Shevach EM, Regulatory T cells in autoimmunity*, *Annu Rev Immunol* 2000, **18**: 423-49
- 52 Hori S, Nomura T and Sakaguchi S, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* 2003, **299**: 1057-61
- 53 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, *et al.*, An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, *Nat Immunol* 2003, **4**: 337-42

-
- 54 Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat Immunol* 2003, **4**: 330-6
- 55 Allez M, Brimnes J, Dotan I, *et al.*, Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells, *Gastroenterology* 2002, **123**: 1516-26
- 56 Filaci G, Bacilieri S, Fravega M, *et al.*, Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus, *J Immunol* 2001, **166**: 6452-7
- 57 Filaci G and Suci-Foca N, CD8+ T suppressor cells are back to the game: are they players in autoimmunity?, *Autoimmun Rev* 2002, **1**: 279-83
- 58 Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, *et al.*, Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells, *Int Immunol* 1998, **10**: 775-83
- 59 Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, *et al.*, Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4, *Nat Immunol* 2002, **3**: 237-43
- 60 Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, *et al.*, Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells, *Hum Immunol* 1999, **60**: 568-74
- 61 Colovai AI, Liu Z, Ciubotariu R, *et al.*, Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells, *Transplantation* 2000, **69**: 1304-10
- 62 Miller A, Lider O, Roberts AB, *et al.*, Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**: 421-5
- 63 Grdic D, Hornquist E, Kjerrulf M, *et al.*, Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8+ T cells in the normal gut mucosa, *J Immunol* 1998, **160**: 754-62
- 64 Chen Y, Inobe J and Weiner HL, Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression, *J Immunol* 1995, **155**: 910-6
- 65 Lider O, Santos LM, Lee CS, *et al.*, Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes, *J Immunol* 1989, **142**: 748-52
- 66 Najafian N, Chitnis T, Salama AD, *et al.*, Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model, *J Clin Invest* 2003, **112**: 1037-48
- 67 Poussier P, Ning T, Banerjee D, *et al.*, A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity, *J Exp Med* 2002, **195**: 1491-7
- 68 Rocha B, von Boehmer H and Guy-Grand D, Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**: 5336-40
- 69 Toy LS, Yio XY, Lin A, *et al.*, Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease, *J Clin Invest* 1997, **100**: 2062-71
- 70 Mills KH, Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?, *Nat Rev Immunol* 2004, **4**: 841-55
- 71 Rock KL and Goldberg AL, Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu Rev Immunol* 1999, **17**: 739-79

-
- 72 Klein J, Satta Y, O'HUigin C, *et al.*, The molecular descent of the major histocompatibility complex, *Annu Rev Immunol* 1993, **11**: 269-95
- 73 Parham P, Adams EJ and Arnett KL, The origins of HLA-A,B,C polymorphism, *Immunol Rev* 1995, **143**: 141-80
- 74 Trowsdale J and Campbell RD, Complexity in the major histocompatibility complex, *Eur J Immunogenet* 1992, **19**: 45-55
- 75 Campbell RD and Trowsdale J, Map of the human MHC, *Immunol Today* 1993, **14**: 349-52
- 76 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
- 77 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**: 1035-48
- 78 Rammensee HG, Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules, *Curr Opin Immunol* 1995, **7**: 85-96
- 79 Lehner PJ and Cresswell P, Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules, *Curr Opin Immunol* 1996, **8**: 59-67
- 80 Madden DR, The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes, *Annu Rev Immunol* 1995, **13**: 587-622
- 81 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
- 82 Rudensky A, Preston-Hurlburt P, Hong SC, *et al.*, Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules, *Nature* 1991, **353**: 622-7
- 83 Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, *et al.*, Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA, *Science* 1994, **265**: 106-9
- 84 Watts C, Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules, *Annu Rev Immunol* 1997, **15**: 821-50
- 85 Schubert U, Anton LC, Gibbs J, *et al.*, Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 2000, **404**: 770-4
- 86 Reits EA, Vos JC, Gromme M, *et al.*, The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins, *Nature* 2000, **404**: 774-8
- 87 Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, *et al.*, Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products, *J Exp Med* 2001, **194**: 1-12
- 88 Emmerich NP, Nussbaum AK, Stevanovic S, *et al.*, The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate, *J Biol Chem* 2000, **275**: 21140-8
- 89 Binder RJ, Blachere NE and Srivastava PK, Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules, *J Biol Chem* 2001, **276**: 17163-71
- 90 Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, *et al.*, Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming, *Immunogenetics* 1994, **39**: 93-8

- 91 Powis SJ, Young LL, Joly E, *et al.*, The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER, *Immunity* 1996, **4**: 159-65
- 92 Sant AJ and Miller J, MHC class II antigen processing: biology of invariant chain, *Curr Opin Immunol* 1994, **6**: 57-63
- 93 Neefjes J, CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading, *Eur J Immunol* 1999, **29**: 1421-5
- 94 Denzin LK and Cresswell P, HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading, *Cell* 1995, **82**: 155-65
- 95 McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, *et al.*, Biology of human papillomaviruses, *Int J Exp Pathol* 2001, **82**: 15-33
- 96 Rensing ME, Sette A, Brandt RM, *et al.*, Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides, *J Immunol* 1995, **154**: 5934-43
- 97 Brossart P and Bevan MJ, Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines, *Blood* 1997, **90**: 1594-9
- 98 Carbone FR and Bevan MJ, Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo, *J Exp Med* 1990, **171**: 377-87
- 99 Huang AY, Bruce AT, Pardoll DM, *et al.*, In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter, *Immunity* 1996, **4**: 349-55
- 100 Jondal M, Schirmbeck R and Reimann J, MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens, *Immunity* 1996, **5**: 295-302
- 101 Kurts C, Cannarile M, Klebba I, *et al.*, Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo, *J Immunol* 2001, **166**: 1439-42
- 102 Rock KL, Gamble S and Rothstein L, Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules, *Science* 1990, **249**: 918-21
- 103 Rock KL, A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world, *Immunol Today* 1996, **17**: 131-7
- 104 Staerz UD, Karasuyama H and Garner AM, Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein, *Nature* 1987, **329**: 449-51
- 105 Bevan MJ, Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming, *J Immunol* 1976, **117**: 2233-8
- 106 Bevan MJ, Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay, *J Exp Med* 1976, **143**: 1283-8
- 107 Heath WR and Carbone FR, Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming, *Curr Opin Immunol* 1999, **11**: 314-8
- 108 Sigal LJ, Crotty S, Andino R, *et al.*, Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen, *Nature* 1999, **398**: 77-80
- 109 Abbas, AK and Lichtman, AH, Cellular and Molecular Immunology, Elsevier Science, Philadelphia, 5th Edition

- 110 Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, *et al.*, Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens, *Science* 1994, **264**: 961-5
- 111 Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, *et al.*, Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells, *Eur J Immunol* 1997, **27**: 280-8
- 112 Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, *et al.*, Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages, *Immunity* 1995, **3**: 783-91
- 113 Ke Y and Kapp JA, Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake, *J Exp Med* 1996, **184**: 1179-84
- 114 Albert ML, Sauter B and Bhardwaj N, Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs, *Nature* 1998, **392**: 86-9
- 115 Bellone M, Iezzi G, Rovere P, *et al.*, Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes, *J Immunol* 1997, **159**: 5391-9
- 116 Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, *et al.*, Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells, *J Exp Med* 1997, **186**: 239-45
- 117 Kurts C, Heath WR, Carbone FR, *et al.*, Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity, *Novartis Found Symp* 1998, **215**: 172-81; discussion 181-90
- 118 Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, *et al.*, A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, *Nature* 2000, **405**: 85-90
- 119 Sauter B, Albert ML, Francisco L, *et al.*, Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells, *J Exp Med* 2000, **191**: 423-34
- 120 Steinman RM, DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells, *Cell* 2000, **100**: 491-4
- 121 Kotera Y, Shimizu K and Mule JJ, Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization, *Cancer Res* 2001, **61**: 8105-9
- 122 Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, *et al.*, Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha β 5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med* 1998, **188**: 1359-68
- 123 Basu S, Binder RJ, Suto R, *et al.*, Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway, *Int Immunol* 2000, **12**: 1539-46
- 124 Srivastava PK, Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and in antigen presentation, *Adv Cancer Res* 1993, **62**: 153-77
- 125 Arnold D, Wahl C, Faath S, *et al.*, Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96, *J Exp Med* 1997, **186**: 461-6
- 126 Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, *et al.*, Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis, *J Exp Med* 2000, **191**: 1965-74
- 127 Chandawarkar RY, Wagh MS and Srivastava PK, The dual nature of specific immunological activity of tumor-derived gp96 preparations, *J Exp Med* 1999, **189**: 1437-42

- 128 Chandawarkar RY, Wagh MS, Kovalchin JT, *et al.*, Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis, *Int Immunol* 2004, **16**: 615-24
- 129 Kurts C, Heath WR, Kosaka H, *et al.*, The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1), *J Exp Med* 1998, **188**: 415-20
- 130 Gupta RS, Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species, *Mol Biol Evol* 1995, **12**: 1063-73
- 131 Robert J, Menoret A, Basu S, *et al.*, Phylogenetic conservation of the molecular and immunological properties of the chaperones gp96 and hsp70, *Eur J Immunol* 2001, **31**: 186-95
- 132 Altmeyer A, Maki RG, Feldweg AM, *et al.*, Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96, *Int J Cancer* 1996, **69**: 340-9
- 133 Robert J, Menoret A and Cohen N, Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved, *J Immunol* 1999, **163**: 4133-9
- 134 Lammert E, Arnold D, Nijenhuis M, *et al.*, The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP, *Eur J Immunol* 1997, **27**: 923-7
- 135 Lammert E, Arnold D, Rammensee HG, *et al.*, Expression levels of stress protein gp96 are not limiting for major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation, *Eur J Immunol* 1996, **26**: 875-9
- 136 Prodromou C, Roe SM, Piper PW, *et al.*, A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone, *Nat Struct Biol* 1997, **4**: 477-82
- 137 Qu D, Mazarella RA and Green M, Analysis of the structure and synthesis of GRP94, an abundant stress protein of the endoplasmic reticulum, *DNA Cell Biol* 1994, **13**: 117-24
- 138 Linderoth NA, Popowicz A and Sastry S, Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94), *J Biol Chem* 2000, **275**: 5472-7
- 139 Spee P and Neefjes J, TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin, *Eur J Immunol* 1997, **27**: 2441-9
- 140 Menoret A, Li Z, Niswonger ML, *et al.*, An endoplasmic reticulum protein implicated in chaperoning peptides to major histocompatibility of class I is an aminopeptidase, *J Biol Chem* 2001, **276**: 33313-8
- 141 Srivastava PK, DeLeo AB and Old LJ, Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**: 3407-11
- 142 Srivastava PK, Chen YT and Old LJ, 5'-structural analysis of genes encoding polymorphic antigens of chemically induced tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**: 3807-11
- 143 Palladino MA, Jr., Srivastava PK, Oettgen HF, *et al.*, Expression of a shared tumor-specific antigen by two chemically induced BALB/c sarcomas, *Cancer Res* 1987, **47**: 5074-9
- 144 Tamura Y, Peng P, Liu K, *et al.*, Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations, *Science* 1997, **278**: 117-20

- 145 Udono H, Levey DL and Srivastava PK, Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8+ T cells in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 3077-81
- 146 Arnold D, Faath S, Rammensee H, *et al.*, Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96, *J Exp Med* 1995, **182**: 885-9
- 147 Singh-Jasuja H, Hilf N, Arnold-Schild D, *et al.*, The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system, *Biol Chem* 2001, **382**: 629-36
- 148 Basu S and Srivastava PK, Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses, *Cell Stress Chaperones* 2000, **5**: 443-51
- 149 Hilf N, Singh-Jasuja H, Schwarzmaier P, *et al.*, Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation, *Blood* 2002, **99**: 3676-82
- 150 Radsak MP, Hilf N, Singh-Jasuja H, *et al.*, The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions, *Blood* 2003, **101**: 2810-5
- 151 Srivastava PK and Maki RG, Stress-induced proteins in immune response to cancer, *Curr Top Microbiol Immunol* 1991, **167**: 109-23
- 152 Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, *et al.*, Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity, *J Exp Med* 1997, **186**: 1315-22
- 153 Udono H and Srivastava PK, Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity, *J Exp Med* 1993, **178**: 1391-6
- 154 Nieland TJ, Tan MC, Monne-van Muijen M, *et al.*, Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 6135-9
- 155 Blachere NE, Udono H, Janetzki S, *et al.*, Heat shock protein vaccines against cancer, *J Immunother* 1993, **14**: 352-6
- 156 Heikema A, Agsteribbe E, Wilschut J, *et al.*, Generation of heat shock protein-based vaccines by intracellular loading of gp96 with antigenic peptides, *Immunol Lett* 1997, **57**: 69-74
- 157 Ciupitu AM, Petersson M, O'Donnell CL, *et al.*, Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med* 1998, **187**: 685-91
- 158 Berwin B and Nicchitta CV, To find the road traveled to tumor immunity: the trafficking itineraries of molecular chaperones in antigen-presenting cells, *Traffic* 2001, **2**: 690-7
- 159 Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, *et al.*, Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells, *J Immunol* 1999, **162**: 3757-60
- 160 Binder RJ, Han DK and Srivastava PK, CD91: a receptor for heat shock protein gp96, *Nat Immunol* 2000, **1**: 151-5
- 161 Berwin B, Hart JP, Pizzo SV, *et al.*, Cutting edge: CD91-independent cross-presentation of GRP94(gp96)-associated peptides, *J Immunol* 2002, **168**: 4282-6
- 162 Vabulas RM, Wagner H and Schild H, Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors, *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **270**: 169-84

-
- 163 Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, *et al.*, The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway, *J Biol Chem* 2002, **277**: 20847-53
- 164 Sen R and Baltimore D, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell* 1986, **46**: 705-16
- 165 Brown RT, Ades IZ and Nordan RP, An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma, *J Biol Chem* 1995, **270**: 31129-35
- 166 Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, *et al.*, Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli, *Embo J* 1995, **14**: 2876-83
- 167 Baldi L, Brown K, Franzoso G, *et al.*, Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha, *J Biol Chem* 1996, **271**: 376-9
- 168 Chen CG, Malliaros J, Katerelos M, *et al.*, Inhibition of NF-kappaB activation by a dominant-negative mutant of IkappaBalpha, *Mol Immunol* 1996, **33**: 57-61
- 169 Messer G and Rupec RA, [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). II. Pathophysiologic meaning], *Hautarzt* 2001, **52**: 746-52; quiz 753-5
- 170 Baldwin AS, Jr., The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol* 1996, **14**: 649-83
- 171 Ito CY, Kazantsev AG and Baldwin AS, Jr., Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha, *Nucleic Acids Res* 1994, **22**: 3787-92
- 172 Le Bail O, Schmidt-Ullrich R and Israel A, Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family, *Embo J* 1993, **12**: 5043-9
- 173 Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, *et al.*, NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway, *Science* 1993, **259**: 1912-5
- 174 Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, *et al.*, Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation, *Cell* 1998, **93**: 1231-40
- 175 Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, *et al.*, IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex, *Nature* 1998, **395**: 297-300
- 176 Mercurio F, Murray BW, Shevchenko A, *et al.*, IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex, *Mol Cell Biol* 1999, **19**: 1526-38
- 177 Zandi E and Karin M, Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex, *Mol Cell Biol* 1999, **19**: 4547-51
- 178 Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, *et al.*, MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1, *Nature* 1997, **385**: 540-4
- 179 Lee FS, Peters RT, Dang LC, *et al.*, MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**: 9319-24
- 180 Nakano H, Shindo M, Sakon S, *et al.*, Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**: 3537-42

- 181 Nemoto S, DiDonato JA and Lin A, Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase, *Mol Cell Biol* 1998, **18**: 7336-43
- 182 Zhao Q and Lee FS, Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta, *J Biol Chem* 1999, **274**: 8355-8
- 183 Regnier CH, Song HY, Gao X, *et al.*, Identification and characterization of an IkappaB kinase, *Cell* 1997, **90**: 373-83
- 184 Woronicz JD, Gao X, Cao Z, *et al.*, IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK, *Science* 1997, **278**: 866-9
- 185 Ling L, Cao Z and Goeddel DV, NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**: 3792-7
- 186 Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB, Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death, *Genes Dev* 1998, **12**: 2821-30
- 187 Rothe M, Sarma V, Dixit VM, *et al.*, TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40, *Science* 1995, **269**: 1424-7
- 188 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, *et al.*, TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1, *Nature* 1996, **383**: 443-6
- 189 Nakano H, Oshima H, Chung W, *et al.*, TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor, *J Biol Chem* 1996, **271**: 14661-4
- 190 Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, *et al.*, Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 9792-6
- 191 Cheng G and Baltimore D, TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation, *Genes Dev* 1996, **10**: 963-73
- 192 Rothe M, Xiong J, Shu HB, *et al.*, I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 8241-6
- 193 Kaye KM, Devergne O, Harada JN, *et al.*, Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 11085-90
- 194 Pomerantz JL and Baltimore D, NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase, *Embo J* 1999, **18**: 6694-704
- 195 Shimada T, Kawai T, Takeda K, *et al.*, IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases, *Int Immunol* 1999, **11**: 1357-62
- 196 Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, *et al.*, NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation, *Genes Cells* 2000, **5**: 191-202
- 197 Adler G. Morbus Crohn - Colitis ulcerosa, Springer Verlag, 2. Auflage, 1996
- 198 Binder V and Orholm M, Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease, *Neth J Med* 1996, **48**: 53-6
- 199 Neurath MF and Schurmann G, [Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases], *Chirurg* 2000, **71**: 30-40

- 200 Schreiber S, Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankung: Gestörte Homöostase von Entzündungsmediatoren?, *Aspekte im Gespräch - Extracta aus Wissenschaft und KLinik* 1998, **10**: 9-17
- 201 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
- 202 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
- 203 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
- 204 Russel MG, Volovics A, Schoon EJ, *et al.*, Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group, *Inflamm Bowel Dis* 1998, **4**: 182-6
- 205 Stichtenoth D.O., Pharmakologie der Substanzgruppen. In: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis, Georg Thieme Verlag, 2004, 139-157
- 206 Rogler G and Andus T, Cytokines in inflammatory bowel disease, *World J Surg* 1998, **22**: 382-9
- 207 Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, *et al.*, Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 1995, **108**: 1434-44
- 208 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 [corrected] genotype 2, *Gut* 1997, **41**: 651-7
- 209 Casini-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
- 210 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
- 211 Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, *et al.*, Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4, *J Exp Med* 1989, **170**: 577-82
- 212 Lehn M, Weiser WY, Engelhorn S, *et al.*, IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-gamma, *J Immunol* 1989, **143**: 3020-4
- 213 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
- 214 West GA, Matsuura T, Levine AD, *et al.*, Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity, *Gastroenterology* 1996, **110**: 1683-95
- 215 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
- 216 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
- 217 Gross V, Andus T, Caesar I, *et al.*, Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease, *Gastroenterology* 1992, **102**: 514-9

- 218 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
- 219 Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, *et al.*, IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *J Immunol* 1991, **147**: 3815-22
- 220 Maeda M, Watanabe N, Neda H, *et al.*, Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease, *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992, **14**: 451-61
- 221 Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, *et al.*, Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation, *Lancet* 1992, **339**: 89-91
- 222 Andus T, Targan SR, Deem R, *et al.*, Measurement of tumor necrosis factor alpha mRNA in small numbers of cells by quantitative polymerase chain reaction, *Reg Immunol* 1993, **5**: 11-7
- 223 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
- 224 Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, *et al.*, IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells, *J Immunol* 2001, **166**: 5530-9
- 225 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
- 226 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 U S A* 2003, **100**: 5324-9
- 227 Wilson SB, Kent SC, Patton KT, *et al.*, Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes, *Nature* 1998, **391**: 177-81
- 228 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
- 229 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
- 230 Capobianchi MR, Fais S, Mercuri F, *et al.*, Interferon-alpha (IFN-alpha) production by human intestinal mononuclear cells. Response to virus in control subjects and in Crohn's disease, *Gut* 1992, **33**: 897-901
- 231 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
- 232 Nielsen OH, Elmgreen J and Ahnfelt-Ronne I, Serum interferon activity in inflammatory bowel disease. Arachidonic acid release and lipoxygenation activated by alpha-class interferon in human neutrophils, *Inflammation* 1988, **12**: 169-79
- 233 Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, *et al.*, Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease, *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997, **9**: 893-9
- 234 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**: 1105-11

- 235 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
- 236 Bull DM and Bookman MA, Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells, *J Clin Invest* 1977, **59**: 966-74
- 237 Buckner D, Graw RG, Jr., Eisel RJ, *et al.*, Leukapheresis by continuous flow centrifugation (CFC) in patients with chronic myelocytic leukemia (CML), *Blood* 1969, **33**: 353-69
- 238 Kaneene JM, Johnson DW, Anderson RK, *et al.*, Kinetics of in vitro bovine lymphocyte immunostimulation with a *Brucella abortus* antigen, *Am J Vet Res* 1978, **39**: 235-9
- 239 Sanderson RJ, Bird KE, N.F. P, *et al.*, Design principles for a counterflow centrifugation cell separation chamber, *Anal. Biochem.* 1976, **71**: 615-622
- 240 Andreesen R, Picht J and Lohr GW, Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes, *J Immunol Methods* 1983, **56**: 295-304
- 241 Carlsson J and Yuhas JM, Liquid-overlay culture of cellular spheroids, *Recent Results Cancer Res* 1984, **95**: 1-23
- 242 Mudter J, Wirtz S, Galle PR, *et al.*, A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis, *Pathobiology* 2002, **70**: 170-6
- 243 Stoilova D, Jie D, de Crom R, *et al.*, Haplosufficiency or functional redundancy of a heat shock protein gp96 gene in the adaptive immune response, *Cell Stress Chaperones* 2000, **5**: 395
- 244 Rogler G, Hausmann M, Vogl D, *et al.*, Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages, *Clin Exp Immunol* 1998, **112**: 205-15
- 245 Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, *et al.*, Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies, *J Immunol Methods* 1994, **174**: 5-19
- 246 Gordon S, Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation, *Immunol Lett* 1999, **65**: 5-8
- 247 Vermaelen K and Pauwels R, Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights, *Cytometry* 2004, **61A**: 170-77
- 248 Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, *et al.*, Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function, *J Immunol* 2004, **172**: 6087-92
- 249 Heike M, Frenzel C, Meier D, *et al.*, Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer, *Int J Cancer* 2000, **86**: 489-93
- 250 Singhal S, Wiewrodt R, Malden LD, *et al.*, Gene expression profiling of malignant mesothelioma, *Clin Cancer Res* 2003, **9**: 3080-97
- 251 Stahl M, Ludwig D, Fellermann K, *et al.*, Intestinal expression of human heat shock protein 90 in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, *Dig Dis Sci* 1998, **43**: 1079-87
- 252 Ludwig D, Stahl M, Ibrahim ET, *et al.*, Enhanced intestinal expression of heat shock protein 70 in patients with inflammatory bowel diseases, *Dig Dis Sci* 1999, **44**: 1440-7

- 253 Peetermans WE, D'Haens GR, Ceuppens JL, *et al.*, Mucosal expression by B7-positive cells of the 60-kilodalton heat-shock protein in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 1995, **108**: 75-82
- 254 Winrow VR, Mojdehi GM, Ryder SD, *et al.*, Stress proteins in colorectal mucosa. Enhanced expression in ulcerative colitis, *Dig Dis Sci* 1993, **38**: 1994-2000
- 255 Miyata M, Sato H, Sato Y, *et al.*, Significance of endogenous heat shock protein in adjuvant arthritis, *J Rheumatol* 1999, **26**: 2210-4
- 256 Xiao C, Chen S, Yuan M, *et al.*, Expression of the 60 kDa and 71 kDa heat shock proteins and presence of antibodies against the 71 kDa heat shock protein in pediatric patients with immune thrombocytopenic purpura, *BMC Blood Disord* 2004, **4**: 1
- 257 Liu B, Dai J, Zheng H, *et al.*, Cell surface expression of an endoplasmic reticulum resident heat shock protein gp96 triggers MyD88-dependent systemic autoimmune diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**: 15824-9
- 258 Toes R, van Bilsen J, van Dongen H, *et al.*, Cellular-based immune modulation in arthritis, *Arthritis Res Ther* 2004, **6**: 18
- 259 Ishii T, Udono H, Yamano T, *et al.*, Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96, *J Immunol* 1999, **162**: 1303-9
- 260 Breloer M, Marti T, Fleischer B, *et al.*, Isolation of processed, H-2Kb-binding ovalbumin-derived peptides associated with the stress proteins HSP70 and gp96, *Eur J Immunol* 1998, **28**: 1016-21
- 261 van Eden W, van der Zee R and Prakken B, Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation, *Nat Rev Immunol* 2005, **5**: 318-30
- 262 Maron R, Sukhova G, Faria AM, *et al.*, Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice, *Circulation* 2002, **106**: 1708-15
- 263 Harats D, Yacov N, Gilburd B, *et al.*, Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates Mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions, *J Am Coll Cardiol* 2002, **40**: 1333-8
- 264 Wendling U, Paul L, van der Zee R, *et al.*, A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue, *J Immunol* 2000, **164**: 2711-7
- 265 Tanaka S, Kimura Y, Mitani A, *et al.*, Activation of T cells recognizing an epitope of heat-shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis, *J Immunol* 1999, **163**: 5560-5
- 266 Billingham ME, Carney S, Butler R, *et al.*, A mycobacterial 65-kD heat shock protein induces antigen-specific suppression of adjuvant arthritis, but is not itself arthritogenic, *J Exp Med* 1990, **171**: 339-44
- 267 van den Broek MF, Hogervorst EJ, Van Bruggen MC, *et al.*, Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein, *J Exp Med* 1989, **170**: 449-66
- 268 de Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers GT, *et al.*, The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10, *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 2001-10

-
- 269 Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, *et al.*, CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin, *Immunity* 2001, **14**: 303-13
- 270 Panjwani NN, Popova L, Febbraio M, *et al.*, The CD36 scavenger receptor as a receptor for gp96, *Cell Stress Chaperones* 2000, **5**:
- 271 More S, Breloer M, Fleischer B, *et al.*, Activation of cytotoxic T cells in vitro by recombinant gp96 fusion proteins irrespective of the 'fused' antigenic peptide sequence, *Immunol Lett* 1999, **69**: 275-82
- 272 Breloer M, Fleischer B and von Bonin A, In vivo and in vitro activation of T cells after administration of Ag-negative heat shock proteins, *J Immunol* 1999, **162**: 3141-7

Anhang

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Publikationen sind im Folgenden aufgelistet:

Posterbeiträge:

1. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, The glycoprotein (gp) 96 is absent in intestinal macrophages from patients with inflammatory bowel disease (IBD), *Digestive disease week (DDW), American Gastroenterological Association (AGA) Orange County Convention Center*, May 17-22 2003, Orlando, Florida, USA
2. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, The glycoprotein (gp) 96 is absent in intestinal macrophages from patients with inflammatory bowel disease (IBD), Falk Symposium No. 133, 10.-11. Juni 2003, Berlin
3. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Ulrike Strauch, Werner Falk, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Das Glykoprotein (Gp) 96 fehlt in intestinalen Makrophagen bei der intestinalen Entzündung, 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), 17.-20. September 2003, Nürnberg
4. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Frauke Bataille, Ulrike Strauch, Werner Falk, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Das Glycoprotein (Gp) 96 ist differenzierungsspezifisch für intestinale Makrophagen und fehlt bei der intestinalen Entzündung, 110. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 17.-21. April 2004, Wiesbaden
5. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Ulrike Strauch, Frauke Bataille, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, The glycoprotein (gp) 96 is induced during the differentiation of intestinal macrophages (IMACS) and absent during mucosal inflammation, *Digestive disease week (DDW), American Gastroenterological Association (AGA)*, May 15-20 2004, New Orleans, Louisiana, USA

6. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Upregulation of a mechanism that inhibits NF- κ B activation during differentiation of intestinal macrophages (IMAC), *Digestive disease week (DDW,) American Gastroenterological Association (AGA)*, May 15-20 2004, New Orleans, Louisiana, USA
7. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Tanja Spöttl, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Regulation eines NF- κ B-inhibierenden Mechanismus während der Differenzierung intestinaler Makrophagen (IMAC), 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), 1.-4. September 2004, Leipzig
8. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Tanja Spöttl, Ulrike Strauch, Frauke Bataille, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Das Glycoprotein Gp96 wird während der Differenzierung zu intestinalen Makrophagen (IMAC) induziert und fehlt während der intestinalen Entzündung, 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), 1.-4. September 2004, Leipzig
9. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Tanja Spöttl, Ulrike Strauch, Frauke Bataille, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, The glycoprotein (gp) 96 is induced during the differentiation of intestinal macrophages (IMACS) and absent during Crohn's disease, *4th european mucosal immunology group meeting*, 8.-10. Oktober 2004, Lyon, France
10. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Regulation eines NF- κ B-inhibierenden Mechanismus während der Differenzierung von intestinalen Makrophagen (IMAK), 111. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 02.-06. April 2005, Wiesbaden

Vorträge

1. Katja Schreiter, Martin Hausmann, Ulrike Strauch, Florian Obermeier, Werner Falk, Hans Herfarth, Juergen Schoelmerich, Gerhard Rogler, Glycoprotein (gp) 96 prevents development of colitis in mice, *Digestive disease week (DDW,) American Gastroenterological Association (AGA)*, May 14-19 2005, Chicago, Illinois, USA

Originalarbeiten:

1. M. Hausmann, F. Obermeier, **K. Schreiter**, T. Spöttl, W. Falk, J. Schölmerich, H. Herfarth, P. Saftig, G. Rogler, Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136: 157-167.
2. M. Hausmann, F. Bataille*, T. Spoettl, **K. Schreiter**, W. Falk, J. Schoelmerich, H. Herfarth, G. Rogler, A physiological role of macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha induction during maturation of intestinal macrophages, *J Immunol*, im Druck
3. **K. Schreiter**, M. Hausmann, T. Spoettl, U.G. Strauch, F. Bataille, J. Schoelmerich, H. Herfarth, W. Falk, G. Rogler, Glycoprotein (gp) 96 expression: induced during differentiation of intestinal macrophages but impaired in Crohn's disease *Gut*, im Druck

Originalarbeiten in Vorbereitung:

- K. Schreiter**, M. Hausmann, U.G. Strauch, F. Obermeier, J. Schoelmerich, H. Herfarth, W. Falk, G. Rogler, Glycoprotein (gp) 96 impairs development of colitis in mice
- K. Schreiter**, M. Hausmann, U.G. Strauch, F. Obermeier, J. Schoelmerich, H. Herfarth, W. Falk, G. Rogler, Upregulation of a mechanism inhibiting NF- κ B activation in intestinal macrophages

Originalarbeiten ohne Bezug zur vorliegenden Arbeit

1. J. Bruenke, B. Fischer, K. Barbin, **K. Schreiter**, Y. Wachter, K. Mahr, F. Titgemeyer, M. Niederweis, M. Peipp, SJ Zunino, R. Repp, T. Valerius, GH Fey, A recombinant bispecific single-chain Fv antibody against HLA class II and Fc γ RIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells. *Br J Haematol.* 2004 Apr;125(2):167-79.

Danksagung

Mein Dank gilt allem voran Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit.

Mein spezieller Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler. Die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die Aufmunterungen bei Rückschlägen waren mir eine große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. rer.nat. Susanne Modrow danke ich für Bereitschaft die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen der Inneren Med I für die Abnahme von Biopsien, den Mitarbeitern der Chirurgie für die „Lieferung“ von Darmpräparaten und denen der Pathologie für den Zuschnitt der Präparate. Besonders danke hier Frau Dr. med. Frauke Bataille für die Hilfe bei den Immunfluoreszenzen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Werner Falk danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen nicht nur die Arbeit betreffend. Frau Dr. med. Ulrike Strauch danke ich für die immerwährende Unterstützung bei Fragen speziell zu „Mausproblemen“ und anderen Dingen des Lebens. Herrn Dr. med. Florian Obermeier danke ich für die Begutachtung der Histologien.

Ich danke den Angehörigen der AG Rogler für die sehr gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft. Im Besonderen danke ich Herrn Dr. rer. nat. Martin Hausmann für die Diskussionsbereitschaft und Unterstützung vor allem am Anfang der Arbeit. Ganz besonders danke ich Manuela Gunckel und Dipl.-Biol. Katrin Menzel für die Aufmunterungen, Gespräche und Cocktail-Sessions....

Meinen Labor-„Mitbewohnerinnen“ Nadja Dunger und Nicole Grunwald danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in ihrer Mitte, die aufmunternden Worte gerade in der Schlussphase und die wirklich große Hilfe bei den Mausversuchen – ohne Euch wäre ich untergegangen!!! DANKE!

Außerdem danke ich Birte Sievers für die ausführlichen Telefonate wenn's mal nicht so lief. Katrin Kümmel danke ich für das Lektorat der Arbeit und ebenfalls für die ausführlichen Gespräche über „den Ernst des Lebens“.

Meinem Freund Gerch danke ich für seine unendliche Geduld, seine Liebe und sein Verständnis, vor allem in der letzten Zeit dieser Arbeit!

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir das Studium ermöglicht haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Mama für ihre Aufmunterungen, auch hier vor allem gegen Ende der Arbeit und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht, vor allem wenn es mal wieder eng wurde auf dem Konto...!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, 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 des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

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

Regensburg, 22.04.2005

(Katja Schreiter)