

Aus dem Lehrstuhl für Immunologie

Prof. Dr. Daniela N. Männel

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

CHARAKTERISIERUNG UND FUNKTIONELLE ANALYSE MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN MAUS-LIGHT

Inauguraldissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

vorgelegt von
Josef Federhofer

2010

Aus dem Lehrstuhl für Immunologie

Prof. Dr. Daniela N. Männel

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

CHARAKTERISIERUNG UND FUNKTIONELLE ANALYSE MONOKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN MAUS-LIGHT

Inauguraldissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

vorgelegt von
Josef Federhofer

2010

Vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2006 bis August 2008 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlgans am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Regensburg erstellt.

Dekan der Fakultät: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hehlgans
2. Berichterstatter: Prof. Edward K. Geissler, PhD
Prüfungstermin: 29. Juli 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Immunologische Forschung – Wege zu neuen Therapien bei nicht-infektiösen, entzündlichen Darmerkrankungen	1
1.1 ,Turning on LIGHT' – Die TNF/TNFR-Superfamilie	1
1.1.1 Die Signaltransduktion durch Lymphotoxin (LT).....	2
1.1.2 LIGHT-Signalling – ein verzweigtes System mit breitem Wirkspektrum	4
1.1.3 Ein komplexes Kommunikationsnetzwerk.....	7
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	8
1.2.1 Das intestinale Immunsystem – ein Balanceakt.....	9
1.2.2 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	11
1.2.3 Pathophysiologisches Wissen um CED	12
1.3 Therapeutische Optionen bei CED.....	15
1.4 Ziele der Arbeit	18
 2. Materialien und Reagenzien	 19
2.1 Chemische Substanzen	19
2.2 Puffer und Lösungen	20
2.3 Zellkulturbedarf und Zelllinien	22
2.4 Detektionsantikörper	23
2.5 Versuchs-Kits	23
2.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
 3. Experimentelle Methoden, Versuchstechniken	 25
3.1 Proteinchemische Verfahren.....	25
3.1.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	25
3.1.2 Western Blot und Immundetektion	26
3.1.3 Dot Blot.....	27
3.1.4 Coomassie-Färbung	27
3.1.5 Immunpräzipitation	27
3.1.6 Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA	28

3.2	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes Maus-LIGHT	29
3.2.1	Kultivieren der Hybridomzellen.....	30
3.2.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung monoklonaler Antikörper	30
3.3	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT.....	31
3.3.1	Eigenschaften des Expressionsvektors.....	31
3.3.2	Aufreinigungsprotokoll für rekombinantes Maus-LIGHT	32
3.4	Austestung der monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper im zellbiologischen Neutralisationsassay.....	33
3.5	Durchflusszytometrische Untersuchung der Antikörperbindungsfähigkeit	34
3.5.1	Transfektion von CHO-Zellen mit Maus-LIGHT	34
3.5.2	Stimulation von Primärzellen und Vorbereiten der FACS-Proben	35
3.5.3	Das Verfahren der Durchflusszytometrie.....	35
3.6	Anti-Maus-LIGHT-Antikörper im Tiermodell der akuten DSS-Colitis.....	36
3.6.1	Versuchsplanung.....	36
3.6.2	Präparationstechnik, Isolierung von Primärzellen.....	37
3.6.3	Parameter zur Quantifizierung des Schweregrades der Colitis	37
3.6.3.1	Gewichtsbestimmung während der Versuchsdauer	37
3.6.3.2	Dickdarmlängenbestimmung	38
3.6.3.3	Bestimmung des histologischen Scores	38
3.6.3.4	Messung der Myeloperoxidaseaktivität	38
3.6.4	Erstellung von Zytokinexpressionsprofilen nach akuter DSS-induzierter Colitis.....	39
3.7	Statistische Analysen.....	39
4.	Ergebnisse.....	40
4.1	Proteinchemische Charakterisierung der Antikörperbindung.....	40
4.1.1	Detektion von rekombinantem Human- bzw. Maus-LIGHT im Dot Blot	40
4.1.2	Western-Blot Analysen mit rekombinantem Human- und Maus-LIGHT	41
4.1.3	Nachweis einer Immunkomplexbildung mittels Immunpräzipitation	42
4.2	Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern und rekombinantem LIGHT	43
4.2.1	Aufreinigung der monoklonalen Antikörper.....	43
4.2.2	Ergebnisse der Aufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT.....	44

4.3	Anti-Maus-LIGHT-Antikörper in Neutralisationsassays	46
4.3.1	Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit rekombinantem Maus-LIGHT.....	46
4.3.2	Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit rekombinantem Human-LIGHT.....	48
4.4	Durchflusszytometrische Antikörpercharakterisierung	49
4.4.1	FACS-Analysen der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper auf stimulierten Milzzellen.....	49
4.4.2	FACS-Analysen der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper auf transfizierten CHO-Zellen	51
4.5	Effekte einer Behandlung mit Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis.....	53
4.5.1	Gewichtsverlauf während der Versuchsdauer	54
4.5.2	Dickdarmlängenbestimmung	54
4.5.3	Histologischer Score	55
4.5.4	Messung der Myeloperoxidaseaktivität	56
4.5.5	Zytokinsekretion nach DSS-induzierter Colitis	58
5.	Diskussion.....	59
5.1	Charakterisierung und funktionelle Analyse der monoklonalen Anti-Maus- LIGHT-Antikörper.....	59
5.2	Die Rolle von membranungebundenem, löslichem LIGHT im Organismus.....	62
5.3	Eine neue Therapieoption bei intestinalen Entzündungserkrankungen?.....	65
6.	Zusammenfassung	69
7.	Verzeichnisse · Nachweise.....	71
7.1	Auflösung der Abkürzungen.....	71
7.2	Literaturverzeichnis.....	72
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	80
7.4	Publikationen.....	82
7.5	Curriculum vitae	83
	Danksagung	84

1. Immunologische Forschung – Wege zu neuen Therapien bei nicht-infektiösen, entzündlichen Darmerkrankungen

Calor, Dolor, Rubor, Tumor und *Functio laesa* – diese fünf makroskopischen Kardinalzeichen waren es, mit denen der griechische Arzt GALENOS VON PERGAMON φλεγμονή, Entzündung, charakterisierte. Verloren ist die Gültigkeit dieser beinahe 2000 Jahre alten Beobachtungen keineswegs, auch wenn uns der Fortschritt in Medizin und insbesondere Immunologie heute einen neuartigen Mikrokosmos von Zellinteraktionen, Signalnetzwerken und Regulationsmechanismen des Organismus erschließt. Mag sie im Vergleich zu anderen Wissenschaften noch als jung gelten, so brachte doch die Immunologie in den vergangenen beiden Jahrzehnten durch ihre molekulare Herangehens- und Betrachtungsweise grundlegendes Verständnis in zahlreichen medizinischen Bereichen, sei es bei onkologischen, infektiologischen oder autoimmunologischen Fragestellungen. Die Entdeckung des Tumornekrosefaktor-Systems in den 1980-er Jahren setzte einen Meilenstein der Erforschung molekularer Ursachen von Entzündung und lieferte Erkenntnisse über die fundamentalen Mechanismen, deren Auswirkungen bereits GALEN beschrieb.

Heute umfasst die potente Tumornekrosefaktorsuperfamilie mehr als 40 strukturell verwandte Moleküle – „lebendige“ Bausteine, die in einem komplexen Zusammenspiel Inflammation generieren, modulieren oder inhibieren. – Und ein Mitspieler in diesem System ist LIGHT.

1.1 ‚Turning on LIGHT’ – Die TNF/TNFR-Superfamilie

Ligand- und Rezeptorstrukturen der Tumornekrosefaktorsuperfamilie (TNFSF) zeigen ein weites Spektrum der Regulation biologischer Aktivität von Immunzellen. Ihnen unterliegt die Kontrolle der Differenzierung, der Funktionalität, der Proliferation sowie der Apoptose verschiedener Typen von Abwehrzellen. Als Mediatoren stellen sie für die hochmotilen Effektoren des Immunsystems essentielle Kommunikationssignale dar (Hehlhans, 2005).

Membrangebundene oder lösliche Liganden der TNFSF können mit einem und z.T. auch mit mehreren verschiedenen, membranständigen oder löslichen Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNFR) in Wechselwirkung treten. Aktuell sind 20 solcher Ligandmoleküle mit insgesamt 29 korrespondierenden Rezeptoren molekularbiologisch charakterisiert, deren überwiegender Teil auf Immunzellen zur Expression kommt (Bertazza, 2008). Als Liganden in diesem umfassenden Signalnetzwerk fungieren Typ-II Transmembranproteine mit intrazellulärem N-Terminus, die durch Aggregation zu nicht-kovalent gebundenen Trimeren biologische Aktivität erlangen. Teilweise

werden sie proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten und erreichen in löslicher Form ihre Zielstrukturen (Peschon, 1998). Tumornekrosefaktor (TNF) etwa, die namensgebende und bekannteste Komponente dieser Molekülfamilie, wirkt als Schlüsselement oder „Sentinel-Zytokin“ für Inflammation modulierend bzw. verstärkend in der unspezifischen Erregerabwehr und hat parallel große Bedeutung für die Vernetzung von angeborener mit adaptiver Immunantwort (Idriss, 2000).

Die Extrazellulärdomänen der TNFR-Familie weisen typischerweise cysteinreiche Anteile auf, welche die Interaktion mit dem/den spezifischen Liganden ermöglichen (Locksley, 2001). Die Rezeptoren lassen sich nach Art bzw. Effekt der intrazellulären Signaltransduktion in drei Kategorien gliedern: zum Einen membranungebundene Moleküle ohne Signalwirkung auf Zellen, zweitens apoptoseinduzierende Rezeptoren mit intrazellulärer „death domain“, die die Caspase-Kaskade aktivieren können, und als dritte und größte Gruppe solche Rezeptoren, die über den NF κ B-Signalweg die Aktivität zahlreicher inflammatorischer Gene steuern und damit entscheidend Entzündungsreaktionen regulieren (Dempsey, 2003). Voraussetzung für eine erfolgreiche Kommunikation über dieses System ist ein Clustering von drei oder mehr Rezeptoren auf der Membran, induziert durch die Bindung korrespondierender, trivalenter Liganden (Bodmer, 2002; s. Abbildung 1).

In physiologischer Hinsicht vermittelt das TNF/TNFR-System die Einleitung einer Entzündungsreaktion in von Infektionserkrankungen affizierten Geweben und bringt so schützende Wirkungen für den Organismus mit sich. Während der Genese sekundär lymphatischer Gewebe beeinflussen Zellinteraktionen über diese Strukturen maßgeblich die Entwicklung einer korrekten, funktionellen Organarchitektur. Bei einer unkontrollierten Fehlleitung jedoch verursachen die pro-inflammatorischen Faktoren der TNF-Superfamilie körperschädigende Effekte, sich äußernd in Kachexie, Fiebersyndromen, SIRS oder Autoimmunerkrankungen (Hehlhans, 2005).

1.1.1 Die Signaltransduktion durch Lymphotoxin (LT)

Innerhalb der TNF-Superfamilie stehen Lymphotoxin($\alpha\beta$) und LIGHT – zusammen mit den zugehörigen spezifischen Rezeptoren – für ein wichtiges, Entzündungsreaktionen unterstützendes Ligand-Rezeptor-System. Charakteristisch dabei ist eine komplexe Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Interaktionspartnern in Form einer gemeinsamen Nutzung korrespondierender Strukturen (Wang, 2004; s. Abbildung 1).

Ligandkomplexe aus Lymphotoxin- α und Lymphotoxin- β (allgemein als LT $\alpha\beta$ bezeichnet) vermitteln Kommunikation zwischen Immunzellen und Stroma- bzw. Parenchymgewebe der Peripherie. Sie entstehen durch Aggregation von LT α - und LT β -Molekülen aus Natürlichen Killerzellen (NKs) oder Lymphozyten. Die Transmembrandomäne des LT β ermöglicht eine Verankerung an der Zell-

oberfläche. Vornehmlich handelt es sich bei diesen Komplexen um $LT\alpha_1\beta_2$, in geringerer Menge um $LT\alpha_2\beta_1$ Heterotrimere. Mangels membranärer Verankerungsstruktur wird $LT\alpha_3$ sezerniert und erreicht in löslicher Form seine Zielstrukturen: es interagiert mit TNFR-I und TNFR-II unter Entfaltung einer dem TNF vergleichbaren Wirkung. Zwar sind die Rezeptoren für $LT\alpha_2\beta_1$ die gleichen, eine spezifische biologische Funktion ist diesem Molekülkomplex bislang aber nicht zugeschrieben (Ware, 1995; Gruss, 1996; Browning 1997).

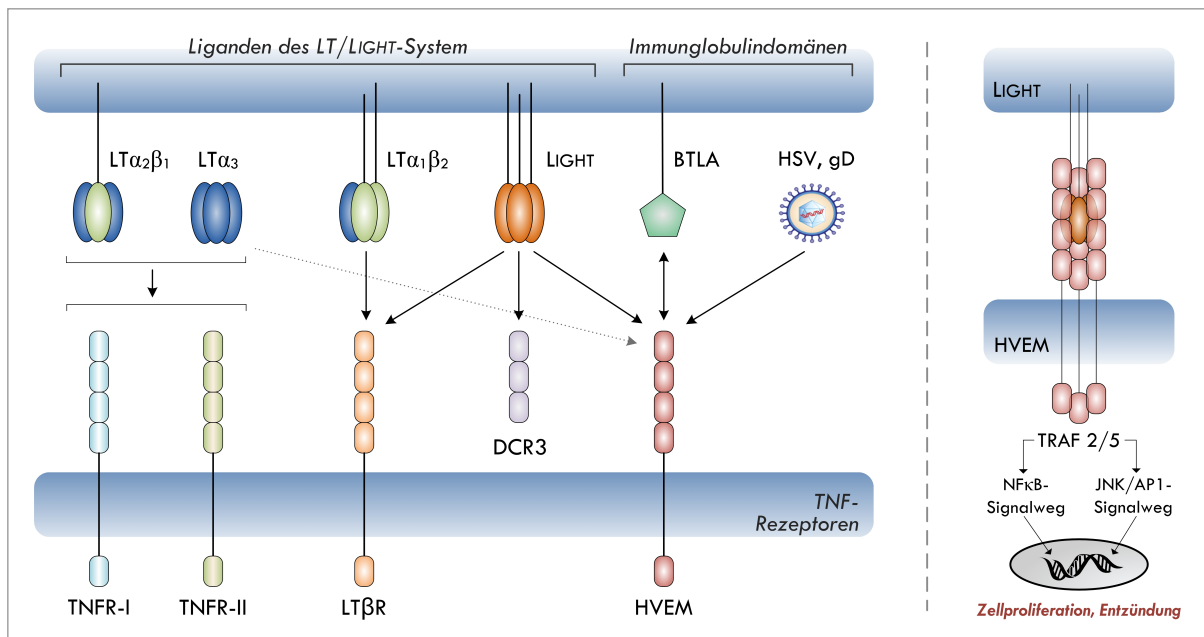


Abbildung 1. links: Die Ligand-Rezeptor-Interaktionen im Lymphotoxin/LIGHT-Signalnetzwerk. rechts: Für eine erfolgreiche Signalübermittlung ist eine Aggregation von drei oder mehr Rezeptoren auf der Zielzelle notwendig. Die intrazelluläre Signaltransduktion geschieht vornehmlich über den NFκB-Pathway.

$LT\alpha_1\beta_2$ bindet, wie auch der zweite wichtige Ligand dieses Signalsystems, LIGHT, den ubiquitär auf Epithelien, myeloischen Zellen und Fibroblasten – jedoch nicht auf lymphatischen Zellen – exprimierten Lymphotoxin-β-Rezeptor ($LT\beta R$). Dieser Art der unidirektionalen Signalübermittlung zwischen Immunzellen und peripheren Strukturen unterliegen unter anderem die Induktion chemotaktischer Mediatoren, die Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Koordination der Leukozytenmigration (Murphy, 1998; Wang, 2004a).

Große Bedeutung der Interaktion von $LT\alpha_1\beta_2$ mit dem $LT\beta R$ erweist sich hinsichtlich einer korrekten Ausprägung sekundär lymphatischer Organe bzw. des Erhalts derer funktionellen Architektur (Gommerman, 2003). Mäuse mit genetischer Defizienz gegenüber $LT\alpha$, $LT\beta$ oder $LT\beta R$ erleiden zahlreiche immunologische Entwicklungsstörungen – mit Blick auf die Genese sekundär lymphatischer Strukturen wohl am bemerkenswertesten ist das vollständige Fehlen von Lymphknoten oder

Peyer-Plaques (PP) (Fütterer, 1998; Tumanov, 2003). Beim adulten Tier hingegen resultiert eine Unterbrechung dieses Signalweges durch Blockade der Liganden mit gelöstem, chimärem LT β R/F $_C$ in einer Besserung von Entzündungszeichen und Verminderung von Autoimmunreaktionen, wie in Modellen der kollagen-induzierten Arthritis (Fava, 2003) oder der chronisch entzündlichen Darmerkrankung (Spahn, 2004) gezeigt wurde. Als Ursache für die Dämpfung der Immunreaktion werden in erster Linie Modifikationen der Mikroarchitektur in Milz und drainierenden Lymphknoten diskutiert; insbesondere die Aufhebung retikulärer Netzwerke aus follikulär-dendritischen Zellen (FDC) soll die Produktion von Autoantikörpern senken (Ware, 2005). Tabelle 1 gibt einen Überblick der mannigfaltigen Wirkungsbeziehungen der LT $\alpha\beta$ /LT β R-Signaltransduktion in entstehenden gegenüber reifen lymphatischen Geweben.

Wirkungen von LT $\alpha\beta$ und LT β R in der Genese lymphatischer Strukturen	Wirkungen von LT $\alpha\beta$ und LT β R im adulten Organismus
Formation peripherer Lymphknoten	Bildung von Keimzentren in Milz/Lymphknoten
Organisation der Milzarchitektur, Gliederung in B- und T-Zell Zonen	Aufrechterhaltung der Mikroarchitektur lymphatischer Organe (retikuläre Netzwerke)
Korrekte Ausprägung und Organisation mukosaler lymphatischer Strukturen (MALT, Peyer-Plaques)	Erhalt des lymphatischen Mukosasytems: Peyer-Plaques Zahl, M-Zell Gehalt, solitäre Lymphfollikel
Differenzierung von NK-Zellen aus dem Knochenmark	Bildung ektooper lymphatischer Strukturen an Orten chronischer Inflammation

Tabelle 1. Lenkung der Organisation lymphatischer Gewebe über LT $\alpha\beta$ /LT β R-Interaktion. Versuche mit gendefizienten Mäusen gegenüber Komponenten dieses Signalsystems bzw. gezielte Ausschaltung der Strukturen in adulten Tieren geben Aufschluss über LT-Wirkungen auf entstehendes bzw. reifes lymphatisches Gewebe (nach Gommerman, 2003).

1.1.2 LIGHT-Signalling – ein verzweigtes System mit breitem Wirkspektrum

Analysen der Primärsequenz von LIGHT – dem jüngsten Mitglied der TNFSF – ergaben große Ähnlichkeit zur Struktur von LT α und LT β (Mauri, 1998). Das Protein liegt im biologisch funktionellen Zustand typischerweise als membranständiger Homotrimer vor. Im Gewebe präsente Metalloproteinasen vermögen wohl eine Abtrennung der trimeren Komplexe von der Zelloberfläche, so dass Wirkungen dieses Liganden auch fern vom primären Entzündungsort denkbar werden (Granger, 2001). Seit der Entdeckung im Jahre 1998 gilt LIGHT, einschließlich seiner funktionellen Rezeptoren, besondere Aufmerksamkeit in der Zytokinforschung. Untersuchungen und Analysen der letzten Jahre eröffneten Einblicke in bisher unbekannte, entzündungsmodulierende Mechanismen des LT/LIGHT-Systems, deren Dysregulation eine Störung der T-Zell-Homöostase im Gewebe bedingt und damit autoimmunologische Krankheitsprozesse begünstigt (Wang, 2001).

Das Expressionsprofil von LIGHT verdeutlicht seine zentrale Rolle in T-Zell-vermittelten, adaptiven Immunreaktionen: es wird ausschließlich von Leukozyten, insbesondere von aktivierten T-Zellen, transient während des Abwehrgeschehens gebildet und membranständig exprimiert (Zhai, 1998). Durch Bindungsfähigkeit mit drei verschiedenen Rezeptormolekülen – LT β R, ‚Decoy Receptor 3‘ (DCR3) und ‚Herpesvirus Entry Mediator‘ (HVEM) – entfaltet das Zytokin ein vielschichtiges Wirkungsspektrum. Im Folgenden soll dieses näher beleuchtet werden.

Während LT $\alpha_1\beta_2$ durch Signalling über LT β R entscheidend zur korrekten Entwicklung der funktionellen Histologie lymphatischer Strukturen beiträgt, ergibt sich bei Interaktion des Rezeptors mit LIGHT ein in dieser Hinsicht nur marginaler Effekt. So bilden LIGHT-defiziente Mäuse physiologisch gestaltete, funktionsfähige Organstrukturen des Immunsystems aus. Weiterhin erwiesen Versuche mit LT $\beta^{-/-}$ Mäusen gegenüber LT $\beta^{-/-}$ LIGHT $^{-/-}$ Tieren eine mangelnde Kompensationsmöglichkeit einer Lymphotoxindefizienz durch LIGHT: in den Versuchsgruppen war das Ausmaß der Organfehlbildung vergleichbar, lediglich eine bessere Ausprägungshäufigkeit mesenterialer Lymphknoten wird bei LIGHT-kompetenten Tieren gefunden (Scheu, 2002).

Als wichtiges Molekül bei der negativen Selektion von T-Zellen im Thymus ist LIGHT eher im Reifungsprozess des adaptiven Immunsystems von Bedeutung. Die Apoptose von Thymozyten mit pathologisch hochaffinem T-Zell-Rezeptor stellt einen zentralen Mechanismus im Erwerb von Immuntoleranz gegen körpereigenes Gewebe dar. Wechselwirkung zwischen LIGHT auf unreifen, hochreaktiven Abwehrzellen und LT β R auf Zellen des Thymusparenchyms werden als fördernd für diesen Vorgang beschrieben (Wang, 2003).

Abgesehen von den Effekten in der Entstehung eines funktionstüchtigen Abwehrsystems vermittelt LIGHT über LT β R insbesondere direkte Einflüsse auf ein lokales Entzündungsgeschehen. Die Induktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen an Gefäßen der intestinalen Mukosa beispielsweise reguliert Migration bzw. Invasion von Leukozyten in die Darmwand. Im Mausmodell wird dadurch die Ausbildung eines inflammatorischen Milieus unterstützt (Wang, 2004a; Wang, 2004b). Auch die Expression zahlreicher Genprodukte, welche die Differenzierung von antigenpräsentierenden DCs, Makrophagen und Mastzellen im Gewebe koordinieren, unterliegt dieser Möglichkeit der Signalübertragung (Ware, 2008). Einleitung, Aufrechterhalt und Modulation von Entzündungsreaktionen werden damit möglich.

Zusätzlich schützen Zytokine der TNFSF – wie der Name impliziert – im Zusammenspiel mit speziellen, zur Apoptoseeinleitung befähigten TNFRs den Organismus vor der Ausbreitung entarteter Zellen. Bei Interaktion von LIGHT mit dem LT β R wurde eine solche Aktivität, die Induktion des programmierten Zelltods in maligne verändertem Gewebe, beschrieben (Rooney, 2000).

Da DCR3, der zweite LIGHT-bindende Rezeptor, ausschließlich in löslicher Form vorkommt, kann eine Signaltransduktion auf Zellen durch Interaktion mit LIGHT vernachlässigt werden (Yu, 1999). Als ‚Fangrezeptor‘ limitiert er die Bioverfügbarkeit von LIGHT und weiteren Apoptose-induzierenden Liganden der TNF-Familie. Er dient wohl als gewisser physiologischer Schutz gegen überschießende, systemische Zytokinwirkungen (Ware, 2005). Während DCR3 in geringen Mengen ubiquitär im Körper sezerniert wird, liefern quantitative mRNA-Analysen pulmonaler bzw. intestinaler Karzinome Hinweise auf eine Rezeptorüberexpression. Der tumorsuppressiven Eigenschaft von LIGHT und anderen TNF-Molekülen kann auf diese Weise entgegengewirkt werden, so dass eine Ausbreitung der maligne entarteten Zellen umso leichter möglich ist (Ashkenazi, 2002).

HVEM, der dritte LIGHT-bindende Rezeptor, zeigt ein breites Expressionsprofil: Zellen myeloischen wie lymphatischen Ursprungs exprimieren dieses Molekül auf ihren Zellmembranen. Darüber hinaus gelingt eine Detektion von HVEM auf mukosalen Epithelzellen im gesamten Organismus (Kwon, 1997; Harrop, 1998; Ware, 2008). Breit wie das Expressionsmuster präsentiert sich auch das Wirkspektrum dieses Mitglieds der TNFSF, variabel je nach Interaktion mit LIGHT, dem erst kürzlich charakterisiertem ‚B- and T-Lymphocyte Attenuator‘ (BTLA), $LT\alpha_3$ oder Glykoprotein D (gD) des Herpes simplex Virus (HSV) (s. Abbildung 1).

Insbesondere in T-Zell-vermittelten Immunantworten scheint der Signaltransduktion durch LIGHT/HVEM-Interaktion eine wichtige Rolle zuzukommen. LIGHT, das auf aktivierten T-Zellen und zum Teil auf antigenpräsentierenden DCs exprimiert wird, kann über HVEM bei der Aktivierung ruhender bzw. naiver T-Lymphozyten als kostimulatorischer Faktor agieren, ergänzend zu einer Wechselwirkung des T-Zellrezeptors mit MHC-II Molekülen. Zahlreiche weitere Zellen der erworbenen aber auch der angeborenen Immunabwehr, seien es B-Lymphozyten, NKs, Neutrophile oder Makrophagen, erhalten LIGHT-vermittelt wichtige, aktivitätssteigernde Signale über HVEM (Tamada, 2000a; Murphy, 2006). Des Weiteren ermöglicht die gleichzeitige Expression von LIGHT und HVEM auf T-Lymphozyten gezielte T-T-Zellinteraktionen. Antigenspezifische Abwehrzellen werden auf diese Weise zur Proliferation angeregt, sprich in ihrer klonalen Expansion gefördert. Folge ist die Ausbreitung bzw. Intensivierung T-Zell-vermittelter Immunantworten (Wang, 2001).

Neben den Effekten auf Aktivierung und Expansion induziert LIGHT in T-Lymphozyten zusätzlich die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und Interferon- γ (IFN- γ). Diese beiden Mediatoren sind charakteristisch für zytotoxisch modulierte Immunreaktionen und werden von einer speziell differenzierten, zytotoxisch medierenden T-Helferzellsubpopulation, den $CD4^+$ T_H1 -Zellen, sezerniert. Während $CD4^+$ T_H2 -Zellen eine humorale, antikörperbasierte Erregerabwehr begünstigen, geben T_H1 -Lymphozyten mit Hilfe ihrer Botenstoffe wichtige Stimuli bei der Aktivierung zytotoxischer $CD8$ -positiver T-Killerzellen (Tamada, 2000b). Gleichzeitig bewirkt IFN- γ eine

Steigerung der Makrophagenaktivität. Mehrere Untersuchungen – *in vitro* sowie im Tiermodell – bekräftigen den Zusammenhang zwischen LIGHT-Expression und der Einleitung einer T_H1-vermittelten Immunantwort (Scheu, 2002; Xu, 2007). Zugleich verdeutlichen Experimente mit LIGHT-defizienten Mäusen eine direkte Einflussnahmemöglichkeit des Zytokins auf die Funktion bzw. Proliferation von CD8⁺ T-Killerzellen – auch ohne Helferzellmitwirkung (Tamada, 2002).

Als Signalweg mit Koordinationseffekten bei T-Zell-basierten Entzündungsreaktionen im Organismus – und ganz besonders an der Mukosa – birgt die Wechselwirkung von LIGHT mit HVEM außerordentliches inflammatorisches Potential. Kostimulation, T-Zellexpansion, Zytokininduktion und die Polarisierung einer zytotoxischen Immunreaktion verstärken Entzündungsprozesse im Gewebe vor Ort, entfalten aber im Sinne einer Multiorganinflammation eventuell auch Effekte über mehrere Körperkompartimente hinweg (Hehlhans, 2005; Ware, 2005).

Angesichts der vielseitigen Auswirkungen auf den Immunstatus bedarf es einer strengen Kontrolle dieser proinflammatorischen Mechanismen. Entgleisungen, etwa in Form einer konstitutiven Überexpression von LIGHT, führen zu multiplen Organentzündungen mit chronifizierendem Verlauf – und letztlich zur Zerstörung körpereigenen Gewebes (Shaikh, 2001; Wang, 2001). Hinweise auf eine präzise Steuerung der LIGHT/HVEM-Interaktion ergeben sich in erster Linie aus Regulationseffekten, welche am Rezeptor direkt ansetzen. So resultiert eine T-Zellaktivierung in einer beträchtlichen Verminderung der Expressionsrate von HVEM: es scheint als kontrolliere das während der Immunreaktion induzierte LIGHT in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die Expression seines eigenen Rezeptors (Morel, 2000). Neben dem erweitert sich das Signalnetzwerk mit dem erst kürzlich entdeckten ‚B- and T-Lymphocyte Attenuator‘ (BTLA) um eine neuartige, inhibitorische Komponente. Als Immunglobulindomänen-tragendes Molekül auf Lymphozyten und DCs zählt BTLA nicht zur TNFSF. Insbesondere während des Aktivierungsprozesses von T-Zellen steigt dessen membranständige Expression an (Loyet, 2005; Otsuki, 2006). HVEM fungiert in der Wechselwirkung mit dieser neuen Struktur selbst als Ligand. BTLA dämpft nach Anbindung von HVEM adaptive Abwehrreaktionen, indem Lymphozyten in Proliferation und Zytokinproduktion gehemmt werden (Sedy, 2005). Folglich funktioniert HVEM ähnlich einer Weiche in der Immunantwort: je nach Interaktionspartner – LIGHT oder BTLA – wird ein pro- oder anti-inflammatorischer Weg eingeschlagen.

1.1.3 Ein komplexes Kommunikationsnetzwerk

Den Signalsystemen LIGHT/LT α β /LT β R und LIGHT/HVEM/BTLA unterliegt die Kontrolle zellulärer Prozesse, welche für die adaptive Immunantwort essentiell sind. Beide Systeme agieren verzahnt in Form eines komplexen Kommunikationsnetzwerkes und erfüllen gemeinsam Funktionen für eine

intakte, wirksame Pathogenabwehr. Einerseits wird die fehlerfreie Ausprägung, die Reifung bzw. der Erhalt der Organstrukturen des Immunsystems und seiner Effektoren koordiniert. Zum anderen werden Entzündungsverläufe bezüglich Einleitung, Intensivierung und Beendigung gelenkt, wobei die Regulation T-Zell-vermittelter, zytotoxischer Reaktionen im Mittelpunkt steht. Ziel dieser vernetzten Signalmechanismen ist die Sicherstellung einer effizienten Abwehr eingedrungener Krankheitserreger – vor allem an den mukosalen Grenzflächen des Körpers – bei Erhalt der immunologischen Balance im Gewebe. Entscheidend dafür ist ein Äquilibrium zwischen inflammatorischen und inhibitorischen Faktoren, mit anderen Worten die korrekte Koordination aller involvierter Ligand- und Rezeptorstrukturen während des Entzündungsgeschehens. Fehlregulationen innerhalb dieses TNF/TNFR-Systems führen zu unkontrollierter, chronifizierender Entzündung, Beeinträchtigung der T-Zell-homöostase mit Verlust der peripheren Toleranz und letztlich zu Gewebszerstörung und Organschädigung (Ware, 2005).

Verschiedene tierexperimentelle Modelle zu Autoimmunerkrankungen bestätigen einen Zusammenhang von inflammatorischen Symptomen und messbaren Entgleisungen dieser Mechanismen. Auch bei Untersuchungen an Patienten mit „immunologisch bedingten“ Darmerkrankungen können Parallelen zwischen der Krankheitsausprägung und einer Überexpression von LIGHT gezogen werden (Jungbeck, 2006). Der Einfluss der Signaltransduktion über LIGHT hinsichtlich der Ausbildung nicht-infektiöser, entzündlicher Darmerkrankungen (Wang, 2005) macht es besonders interessant, das umfassende Signalsystem anhand dieses klinisch relevanten Krankheitskomplexes näher zu untersuchen.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Eine vielfältige und dynamische Population von Mikroorganismen besiedelt den menschlichen Gastrointestinaltrakt. Die Anzahl Darmschleimhaut-assoziiierter Keime eines Erwachsenen wird gegenüber der Summe aller Körperzellen als mindestens eine Zehnerpotenz höher angegeben: insgesamt 10^{14} Bakterien an dieser inneren Grenzschicht des Organismus im Gegensatz zu den 10^{13} Zellen des Menschen. Dabei beherbergt der Dickdarm verglichen mit anderen Organen nicht nur den größten Anteil der Keime, sondern mit 400-500 unterschiedlichen Spezies zugleich den vielseitigsten (Moore, 1974; Savage, 1977). Das Zusammenspiel von mikrobieller Darmflora, Schleimhautepithel, mukosalem Immunsystem, aber auch von Mikrovaskularisation und enterischem Nervengeflecht ermöglicht die Ausprägung eines funktionierenden „intestinalen Ökosystems“. Je nach Wirkung der Bakterien auf ihren Wirt entstehen in diesem System symbiotische, kommensale oder pathogene Beziehungen (Hooper, 2002).

1.2.1 Das intestinale Immunsystem – ein Balanceakt

Eine Bekämpfung der immensen Keimbesiedlung des unteren Gastrointestinaltrakts wäre für den Körper unmöglich und brächte die abwehrbedingte Zerstörung des Darmes mit sich. Eine Immunreaktion gegen die vielen Mikroorganismen ist folglich weder vorteilhaft noch beabsichtigt. Vielmehr benötigt der Organismus eine intakte Bakterienflora zur Verbesserung der Verdauungsleistung, zur Aufschlüsselung bestimmter Nahrungsinhalte oder zur Vermeidung einer Ausbreitung pathogener Keime auf der Mukosa. Die Interaktion mit diesem immensen Pool bakterieller und nutritiver Antigene an der inneren Körpergrenzfläche ist durch eine definierte Hyporeaktivität des intestinalen Immunsystems gegenüber kommensalen bzw. symbiotischen Darmbewohnern gekennzeichnet. Man spricht von mikrobieller Toleranz. Enteroinvasive, pathogene Keime mit gewebsdestruktiver Expansion hingegen werden als gefährlich erkannt und durch Einleitung adäquater Abwehrreaktionen eliminiert. Die zur Differenzierung nützlicher versus schädlicher Mikroorganismen notwendige Reifung des humoralen bzw. zellulären Darmimmunsystems wird durch die sich bereits in den ersten Lebenswochen entwickelnde Flora aus *Lactobacilli* und *Bifidobacteria* gefördert. Dieser permanente, mikrobiell-epitheliale ‚Crosstalk‘ im Säuglingsalter führt zur Ausbildung einer balancierten Aktivität von T_H1 -, T_H2 - bzw. antiinflammatorisch regulierenden T_{Reg} -Zellen und beeinflusst so die Entstehung oraler Toleranz gegenüber apathogenen, luminalen Antigenen (Tlaskalova-Hogenova, 2004; Forchielli, 2005).

Im Aufbau der Darmwand nehmen immunkompetente Strukturen der Mukosa und Submukosa eine besonders wichtige Stellung ein. In ihrem Zusammenwirken prägen sie das größte lymphatische Organ des Menschen aus, das sog. ‚Gut associated lymphatic tissue‘ (GALT) (s. Abbildung 2). Histologisch kennzeichnend für dieses Gefüge sind einerseits spezielle Immunzellaggregationen: solitäre Lymphfollikel sind typisch für die *Lamina propria mucosae* (LP) im gesamten Darmverlauf, während sich Peyer-Plaques (PP) v.a. in der Wand des terminalen Ileums befinden. Andererseits patrouillieren zwischen diesen größeren „Wachposten“ unzählige, verstreut in Epithel und LP liegende Einzellymphozyten zusammen mit antigenpräsentierenden Zellen (APC). Ein enormes Lymphgefäßsystem, einschließlich Ausläufern in jede Darmzotte, vernetzt die Immunstrukturen an der luminalen Grenzfläche mit den übergeordneten, ebenfalls zum GALT zählenden Mesenteriallymphknoten (Pabst, 2006).

Die hochprismatischen Enterozyten mit ihren interzellulären ‚Tight-junctions‘ formieren eine schützende, undurchlässige Epithelbarriere. Ein Transport von Nahrungsmolekülen, Ionen oder auch bakteriellen Antigenen zwischen lumenalem und basalem Kompartiment ist kontrolliert durch die Zellen hinweg möglich. Enteroinvasive Pathogene vermögen mittels ihrer Virulenzfaktoren diese Schranke zu durchbrechen und sind so für die Entstehung infektiöser Gastroenteritiden verantwortlich. Darmepithelzellen sammeln kontinuierlich mikrobielle Produkte sowie Nahrungsantigene

auf, um sie an umliegende professionelle APCs – z.B. DCs, Makrophagen oder B-Lymphozyten – weiterzuleiten oder um sie selbst, nach entsprechenden Prozessierungsschritten, auf MHC-II Molekülen den T-Helferzellen der LP zu präsentieren. Angesichts mangelnder Expression kostimulatorischer Faktoren, die für eine effektive T-Zellaktivierung notwendig sind, fungieren Enterozyten in ihrer Fähigkeit der Antigenpräsentation auf MHC-II Molekülen keineswegs als professionelle APCs. Vielmehr bedingen sie T-Zellanergie und übernehmen damit eine Rolle in der Ausprägung oraler Toleranz (Mowat, 1997). Dendritische Zellen nehmen mit ihren verzweigten Zellausläufern zwischen den Enterozyten hindurch Kontakt mit dem Darmlumen auf, ohne die Integrität der Barriere zu stören. Sie absorbieren neben Antigenen auch ganze Bakterien, prozessieren sie und wirken als sehr effektive T-Zellaktivatoren bei der Auslösung einer Immunantwort (Rescigno, 2001).

Als zusätzlicher epithelialer Schutzmechanismus dient der Aufbau einer Mukusschicht durch Schleimabsonderung aus Becherzellen. Die konstitutive Sekretion von Immunglobulinen in den Mukus hilft, die Ausbreitung einer schädlichen Darmflora zu vermeiden. Per Transzytose erreichen die aus Plasmazellen abgegebenen Antikörper des Isotyps IgA das lumenale Kompartiment. Die Aktivierung und Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten erfolgt in erster Linie in den solitären Lymphfollikeln der LP und in den PPs. Peyer-Plaques stellen große, in follikuläre B-Zellregionen mit interfollikulären T-Zellzonen gegliederte Lymphozytenaggregationen des terminalen Ileums dar, die sich über die *Lamina muscularis mucosae* hinaus von der *Lamina propria mucosae* bis in die *Tela*

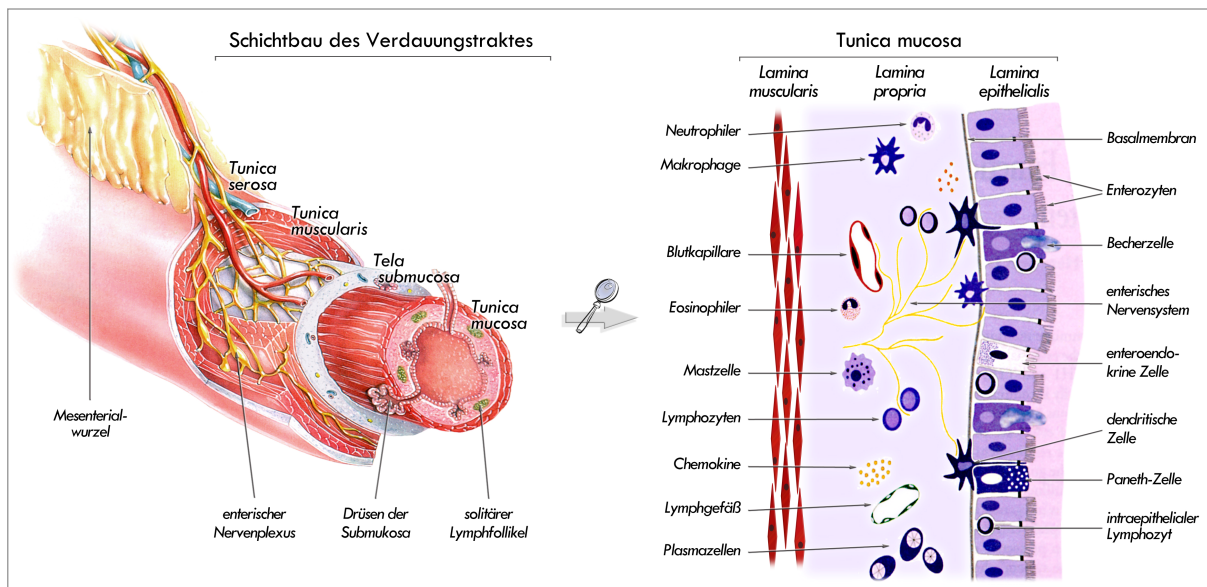


Abbildung 2. links: Typische histologische Schichtgliederung des Verdauungskanal. rechts: Feinbau der Darmschleimhaut. In der *Lamina propria mucosae* finden sich zahlreiche immunkompetente Zellen, die kleinsten Einheiten des ‚gut associated lymphatic tissue‘ (GALT).

submucosa erstrecken. Auf die Durchschleusung von Proben der aktuellen Keimbeseidlung spezialisierte M-Zellen liegen im Schleimhautepithel über den PPs vor und sorgen für eine permanente Antigenstimulation (Heel, 1997).

Es präsentiert sich ein mächtiges Abwehrsystem, hier an der mit 400 m² größten Austauschfläche des Körpers mit seiner Umwelt, dem Lebensraum von Billiarden von Keimen. Ein adäquates Arrangement des GALT mit diesem besonderen Milieu findet der Organismus physiologischerweise in einer Balance zwischen Pathogenabwehr und bakterieller Toleranz. Es ist vorstellbar, dass Störungen dieses Systems auftreten können – mit der Folge immunologischer Überreaktionen.

1.2.2 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) resultieren aus einer unangemessenen und andauernden Aktivität des intestinalen Immunsystems gegen gewöhnliche, apathogene Komponenten der Darmflora. Sie sind erst seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt. Seither konnte eine steigende Inzidenz beobachtet werden, die sich nun auf hohem Niveau stabilisiert und zu einer Prävalenz von ca. 250-500 pro 100.000 Einwohner in allen Teilen Deutschlands geführt hat. Derzeit sind etwa 300.000 Bundesbürger von CED betroffen. In den nächsten Jahrzehnten wird eine Lebenszeitprävalenz in Westeuropa von etwa 0,5% erwartet. Der Altersgipfel der Krankheitsmanifestation liegt im 2.-3. Lebensjahrzehnt. Aufgrund des chronischen, rezidivierenden Charakters und des Krankheitsbeginns im jungen Lebensalter findet sich eine erhebliche Beeinträchtigung von Lebensqualität und sozioökonomischer Leistungsfähigkeit der Erkrankten (Schreiber, 2007).

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die beiden wichtigsten Subtypen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Daneben gibt es seltene Erkrankungsformen wie kollagene oder lymphozytäre Colitis. Das klinische Bild ist durch akute und chronische, meist in Schüben verlaufende, destruierende Entzündungen der intestinalen Schleimhaut oder tieferer Darmwandschichten gekennzeichnet. Trotz Therapie erleiden CED-Patienten im statistischen Durchschnitt alle 8-12 Monate einen akuten entzündlichen Schub. Die auf den Dickdarm beschränkte intestinale Entzündung ist typisch für die Colitis ulcerosa. Klinisch führen die Entzündungsreaktionen bei Colitis ulcerosa häufig zum Auftreten von blutiger Diarrhö. Seltener kommt es zu Komplikationen wie Darmperforation oder toxisches Megakolon. Schwere Formen der Pancolitis können im Langzeitverlauf Dysplasien und Dickdarmkarzinomen hervorrufen. Der Morbus Crohn kann sich im Gegensatz zur Colitis ulcerosa im gesamten Verdauungstrakt, von der Mundhöhle über den Dünndarm bis zum Rektum manifestieren. Die Erkrankung ist durch segmentale, diskontinuierliche Entzündungen gekennzeichnet, die am häufigsten im terminalen Ileum (bis zu 60% der Fälle, im Colon bei bis zu 30% der Patienten) auftreten. Komplikationen können Darmstenosen, intraabdominelle Abszesse,

Konglomerattumoren oder Fisteln sein. In der histologischen Begutachtung charakterisieren den Morbus Crohn aphtoide Läsionen, epitheloidzellige Granulome sowie tiefe Darmwandinfiltrationen durch Entzündungszellen – v.a. durch Makrophagen und CD4⁺ T-Lymphozyten. Es dominiert eine transmurale Entzündung. Bei der Colitis ulcerosa hingegen sind die Infiltrationen als granulozytäre Kryptenabszesse typischerweise auf Mukosa und Submukosa beschränkt. Die klinischen und histopathologischen Unterschiede zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa weisen die beiden Erkrankungen somit als unterschiedliche medizinische Entitäten aus.

Krankheitsmanifestationen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind aber keineswegs auf den Verdauungstrakt begrenzt. Bei ca. 60% der Patienten treten z.T. gefährliche, extraintestinale Organbeteiligungen auf, was auf eine systemische immunologische Dysregulation hinweist (Nikolaus, 2007).

1.2.3 Pathophysiologisches Wissen um CED

Seit der erstmaligen Beschreibung der Colitis ulcerosa (CU) durch SAMUEL WILKS im Jahre 1875 und der Darstellung der Krankheitsentität Enterocolitis regionalis (Morbus Crohn, MC) durch BURRILL CROHN 1932, wurde ein großer Fortschritt im Verständnis chronisch entzündlicher Darmerkrankungen erzielt. Heutiges Wissen deutet auf ein pathophysiologisch komplexes Erkrankungsbild mit mehreren Einfluss nehmenden Faktoren hin. CED resultieren aus dem Zusammenspiel von Suszeptibilitätsgenen, Umwelteinflüssen, körperspezifischer Darmflora, und dem Immunsystem. Die exakten ätiologischen Umstände bleiben aber weiterhin Teil intensiver Forschungsarbeit (Ahmad, 2004).

Nach gegenwärtigem, medizinischem Kenntnisstand bildet eine genetische Suszeptibilität des Individuums eine Grundlage für die Entstehung von CED. Diese Ätiologiekomponente ist speziell für MC durch molekularbiologisch gestützte Stammbaumanalysen sowie Zwillingsuntersuchungen gut dokumentiert. So finden sich bei der Erkrankung Konkordanzraten von über 50% bei monozygoten gegenüber weniger als 10% bei dizygoten Zwillingen. Mittels Kopplungsanalysen gelang die Identifikation spezieller Regionen im menschlichen Genom, in denen mit größter Wahrscheinlichkeit Krankheitsgene lokalisiert sind. Beschrieben ist eine erhöhte Empfänglichkeit für CED bei Normabweichungen der DNA-Sequenz in acht spezifischen Chromosomenabschnitten, bezeichnet als IBD-1 bis IBD-8 (Bonen, 2003). Interessanterweise fällt auch der Genlocus für LIGHT, dem Zytokin aus der TNFSF, mitten in eine solche Kopplungsregion. Mit *CARD15* in IBD-1 gelang im Jahre 2001 erstmals die Identifikation einer MC-assoziierten Erbanlage. Eine Insertionsmutation in *CARD15*, dem für das Protein NOD-2 codierenden Gen, führt zu einer Verschiebung des Leserahmens in der Proteinbiosynthese und zur veränderten Aktivität dieses von professionellen APCs exprimierten, intrazellulären Moleküls. Fehlgeformtes NOD-2 ist Auslöser einer exzessiven Aktivierung des pro-

inflammatorisch regulierenden Transkriptionsfaktors NF κ B in APCs mit nachfolgender konstitutiver Sekretion von IL-12 – einem bedeutsamen Mediator bezüglich des T_H1-polarisierten Entzündungsgeschehens. Neben MC gelten auch für CU genetische Determinanten als sehr wahrscheinlich. Die Untersuchungen hierzu stehen jedoch noch am Anfang (Schreiber, 2007; Strober, 2007).

Die offensichtliche Koinzidenz der steigenden Auftretenshäufigkeit von CED – zunächst in westlichen Industrienationen, jetzt auch in Entwicklungsländern – mit den Hygieneverbesserungen seit Beginn des 20. Jahrhunderts hebt den Einfluss umweltbedingter Faktoren bei der Krankheitsentstehung hervor. Gerade der Zusammenhang mit dem sozioökonomischen Status bzw. der Lebensweise sprechen für die sog. „Hygiene-Hypothese“ als Erklärungsversuch einer steigenden Prävalenz. Demnach sei eine ausgeprägte Keimexposition des Darmes wichtig bezüglich einer korrekten Programmierung des intestinalen Immunsystems. Limitierter Kontakt mit Bakterien bei hoher Sauberkeit hingegen verhindere Darminfektionen in der Kindheit und damit die Entwicklung einer immunologischen Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Komponenten der adaptiven Immunantwort (Koloski, 2008). Soziale bzw. geographische Herkunft, medikamentöse Versorgung, v.a. mit Antibiotika, Flaschenahrung im Säuglingsalter und fehlende bakterielle oder parasitäre Infektionen wurden in Untersuchungen als CED-assoziierte Begleitumstände charakterisiert. Diese Erkenntnisse stützen zwar die „Hygiene-Hypothese“, dennoch sind größere, prospektive Studien nötig, um die Wirkungen von Umwelteinflüssen auf Morbus Crohn und Colitis ulcerosa genauer zu verstehen (Danese, 2006; Weinstock, 2009).

Neben extrinsischen Faktoren stellen fehlerhafte Veränderungen am mukosalen Gesamtgefüge einen anderen, bedeutsamen Aspekt in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen dar. Als Komponenten der Schleimhautgrenzfläche weisen luminale Mikroflora, epitheliale Barriere und angeborenes Immunsystem charakteristischerweise Störungen auf. So kommt es bei CED zu einer Reduktion der mikrobiellen Vielfalt mit Verlust kommensaler Bakterienarten und Ausbreitung darmfremder Pathogene. In diesem von Dysbiose geprägtem Milieu verändern sich Redoxpotential, pH-Wert sowie die Bioverfügbarkeit von Substraten. Fäulnis- bzw. Gärprodukte fallen vermehrt an. Eine abweichende Keimbesiedlung allein wird nicht als kausal für CED erachtet, vielmehr reflektiert sie die veränderten ökologischen Bedingungen des entzündeten Darms. Die Exposition mit einem gestörten, luminalen Antigenpool an bereits geschädigter Mukosa kann eine verstärkte und protrahierte Abwehrreaktion einleiten, die in einem *circulus vitiosus* weitere Gewebsdestruktion begünstigt. In der Tat wird in Verbindung mit MC von einer mangelhaften, epithelialen Barrierefunktion mit erhöhter Schleimhautpermeabilität für Mikroorganismen berichtet, und bei CU-Patienten ist die schützende Mukusschicht überm Epithel beträchtlich dünner ausgebildet. Ein inadäquat intensiver Kontakt der in der LP gelegenen GALT-Strukturen mit Antigenen wird möglich. Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen oder DCs erkennen mit ihren „pattern recognition

receptors' (PRR) verschiedene bakterielle Makromoleküle. Zu den PRRs zählen beispielsweise die Familie der membrangebundenen 'toll-like receptors' (TLR) oder zytoplasmatische Interaktionsstrukturen wie NOD-2. Bei Bindung eines Fremddantigens induzieren sie die angeborene Immunantwort über eine Signalkaskade, an deren Ende die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF κ B steht. NF κ B wiederum koordiniert die Expression zahlreicher Genprodukte mit großer Relevanz in der Pathogenese von CED, wie TNF, Interleukine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Zusammen mit der vermehrten Ausprägung kostimulatorischer Moleküle bewirken diese Mediatoren die Einleitung einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion. Analysen von Darmgewebeproben aus CED-Patienten ergaben Hinweise für eine Dysregulation dieser angeborenen Abwehrmechanismen: einer kontinuierlichen Stimulation des GALT steht ein Mangel an antiinflammatorischen bzw. inhibitorisch wirkenden Faktoren gegenüber, was eine Chronifizierung des Entzündungsgeschehens begünstigt. Darmflora, Epithelbarriere und angeborenes Immunsystem sind im mukosalen Gesamtgefüge funktionell verflochten. Fehlregulationen einer dieser Komponenten wirken sich daher unweigerlich auf die anderen aus (Xavier, 2007; Shih, 2008).

Verantwortlich für die Krankheitssymptome – für chronische Darmentzündung, Gewebedestruktion aber auch extraintestinale Manifestationen – ist eine anhaltende, übermäßige Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Genetische Suszeptibilität, extrinsische Einflüsse und Störungen am intestinalen Schleimhautsystem stellen ätiologische Kofaktoren dar – als gemeinsame Endstrecke in der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa steht aber die T-Zell-vermittelte Immunantwort.

Hinsichtlich MC wird von einer Hyperreaktivität auf exogene Antigene oder kommensale Darmflora ausgegangen, die die Induktion eines T_H1-polarisierten Immungeschehens bedingt. Eine Dominanz der mit einer T_H1-Antwort assoziierten Zytokine TNF, IFN- γ und v.a. IL-12 in Darmbiopsaten aus MC-Patienten geben dazu Anhalt (Pezzutto, 2007). Eine vermehrte Expression erfährt auch LIGHT als Vermittler von T-T-Zellinteraktionen und Induktor einer IFN- γ -Produktion (Cohavy, 2004; Jungbeck, 2006). Bedeutungsvoll ist die Entdeckung eines weiteren, inflammatorisch agierenden Systems neben dem bekannten IL-12/T_H1-Weg: die IL-23/T_H17-Achse. Durch Sezernierung von IL-23 bewirken aktive APCs die Differenzierung einer besonderen Helferzellsubpopulation, den T_H17-Zellen. Diese stimulieren mit ihren Botenstoffen die Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren und Enzyme aus Fibroblasten, Makrophagen sowie Epithelzellen (Shih, 2008).

Da sich in Darmgewebeproben aus CU-Patienten ein Überwiegen der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 während des Entzündungsschubs abzeichnet, wird für die Inflammation bei CU eine T_H2-polarisierte adaptive Immunreaktion angenommen. Die Assoziation mit Autoimmunkrankheiten sowie das Auftreten autoreaktiver Granulozyten-Zytoplasma-Antikörper (ANCA) lassen vermuten, dass CU als Autoimmunerkrankung einzustufen ist (Pezzutto, 2007). So genannte NK T-Zellen, ein spezieller

Typus von Abwehrzellen mit Charakteristika von NKs und T-Lymphozyten, fungieren hier als wichtige Mediatoren in der Entzündungsgenese. Wie *in vitro* Analysen zeigen, entwickeln diese Zellen in einem atypischen T_H2-vermittelten Immungeschehen zytotoxisches Potential gegen Darmepithelien (Fuss, 2004; Monteleone, 2006).

Eine Fehlregulation des intestinalen Immunsystems als pathophysiologische Ursache von CED ist unbestritten. Die exakten molekularen Mechanismen der Immunopathogenese von MC und CU sind jedoch noch nicht hinreichend aufgeklärt. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die entzündungsbedingte Gewebedestruktion als unspezifische Folge einer übermäßigen, adaptiven Immunreaktion gegen vermeintliche Pathogene auftritt, oder ob diese Erkrankungen als autoreaktive Vorgänge mit dem Verlust der Toleranz gegen körpereigenes Gewebe zu verstehen sind (Wang, 2004a).

1.3 Therapeutische Optionen bei CED

Die Geschichte der medikamentösen Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist geprägt von Errungenschaften wie der Einführung synthetischer Kortikosteroide in den 1950ern, der Entdeckung der Immunmodulatoren um 1970 und der Entwicklung spezifischer biologischer Wirkstoffe in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts (Bamias, 2007). Nahezu alle etablierten Behandlungskonzepte fußen auf Immunsuppression, d.h. auf einer Inhibition der letztlich für die Zerstörung des Darmgewebes verantwortlichen Instanz, der Immunabwehr. Bei der Therapie von Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa ist zwischen einem intensiven entzündungshemmenden/immunsuppressiven Vorgehen in der Exazerbationsphase und einer Prophylaxe erneuter Krankheitsschübe im beschwerdefreien Intervall zu differenzieren.

Die Remissionsinduktion im Erkrankungsschub geschieht angepasst an die Intensität der Symptome, indem die zur Verfügung stehenden Medikamente gestuft entsprechend ihrer immunsuppressiven Potenz eingesetzt werden. 5-Aminosalicylsäure-Derivate wirken relativ unspezifisch hemmend auf Entzündungen und finden bei milden bis mäßig aktiven Verläufen der CU Verwendung. Bei ausgeprägtem Befallsmuster ist diese Therapie oft erfolglos. Mittelschwere bis akute Schübe von MC und CU werden vornehmlich mit Glukokortikoiden behandelt. Diese inhibieren zelluläre Strukturen der adaptiven sowie angeborenen Immunantwort, supprimieren die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und vermindern die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen. MC-Patienten gelangen auf diese Weise aber in nur ca. 30% der Fälle in eine stabile Remission. Ein Drittel der Betroffenen wird steroidabhängig, d.h. der Erhalt der beschwerdefreien Phase erfordert eine nebenwirkungsreiche Kortisonlangzeittherapie; ein weiteres Drittel zeigt kein ausreichendes Ansprechen auf Kortisonpräparate. Solche steroidrefraktäre Verläufe treten – wenn auch mit geringerer

Häufigkeit – ebenfalls bei CU auf. Mit Cyclosporin-A und Azathioprin seien zwei wichtige Vertreter der Substanzgruppe der Immunsuppressiva genannt, die die nächste Stufe in den Therapieschemata zu CED bilden. Schweres Entzündungsgeschehen, Steroidabhängigkeit oder Steroidrefraktivität stellen Anwendungsindikationen dar. Azathioprin entfaltet seine hemmende Wirkung auf das Immunsystem durch Apoptoseinduktion an T- und B-Zellen, während im Falle des Cyclosporin-A eine gezielte IL-2-Blockade mit resultierendem T-Zell-Aktivitätsverlust im Vordergrund steht. Wirkstoffe aus der Kategorie der Immunsuppressiva sind insbesondere in Form von Langzeitbehandlungen zur Prophylaxe erneuter Exazerbationen, sprich zum Remissionserhalt, geeignet – vorbehaltlich des Nebenwirkungspotentials auf andere Organsysteme (Kruis, 2007).

Seit 1999 steht ein potentes Medikament aus einer noch jungen pharmazeutischen Kategorie für die Anwendung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zur Verfügung: Infliximab, ein chimärer, monoklonaler Antikörper gegen TNF. Therapierefraktäre Situationen, fulminante Krankheitsentwicklung mit schwerer Entzündungsreaktion sowie chronisch aktive Verläufe stellen bei MC Indikationen für eine Infliximabtherapie dar. Seit kurzem ist das teure Medikament auch zur Behandlung der komplizierten CU und zum Remissionserhalt bei MC mit hoher Rezidivfrequenz zugelassen. Der Remissionserfolg unter TNF-Blockade wird mit ca. 70% bezüglich MC bzw. rund 80% hinsichtlich CU angegeben, wobei durch Kombination mit Immunsuppressiva der therapeutische Effekt evt. noch verbessert werden kann. Im Vergleich zu anderen Arzneimitteln ist die Applikation von Infliximab bei CED relativ gut verträglich und insbesondere mit Blick auf die Organsysteme nebenwirkungsärmer. In 5% der Fälle treten allergieähnliche Infusionsreaktionen mit Kopfschmerz, Hautrötung oder Übelkeit auf, die in der Regel durch eine Verringerung der Infusionsgeschwindigkeit oder die Gabe von Antihistaminika bzw. Analgetika beherrschbar sind. Systemische Überempfindlichkeitsreaktionen sind selten. Fatale, z.T. opportunistische Infektionen kommen in Verbindung mit dieser gezielten und wirkungsvollen Art der Immunsuppression nur in Einzelfällen vor – ein gesteigertes Infektionsrisiko, speziell gegen Mykobakterien, bleibt jedoch zu bedenken. Erhöhte Mortalitätsraten im Patientenkollektiv mit Infliximabtherapie sind gegenüber anderweitig behandelten CED-Patienten nicht nachweisbar (Rutgeerts, 2004).

Eine vollkommene Heilung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gestaltet sich angesichts der komplexen, nicht genau geklärten Ätiologie mit den heute verfügbaren medizinischen Mitteln unerreichbar. Ziel einer medikamentösen Therapie ist vielmehr eine rasche und vollständige Remissionsinduktion mit stabilem und langfristigem Remissionserhalt. Dauerhafte Schädigungen des Darmes durch chronische Entzündungsprozesse gilt es vehement zu verhindern, um die Lebensqualität der Patienten zu erhalten und die Notwendigkeit chirurgischer Interventionen zu vermeiden. Vor diesem Hintergrund herrscht aktuell in Klinikerkreisen die Diskussion, inwiefern ein medikamentöses ‚top-down‘-Konzept in der Behandlung von MC bzw. CU – d.h. der frühe Einsatz

einer immunsuppressiven Therapie mit biologischen Substanzen – dem ‚step-up‘-Vorgehen vorzuziehen sei (Nikolaus, 2008).

Die Zunahme des Wissens um die Mechanismen chronischer Inflammation und der bei CED an der Darmmukosa ablaufenden immunologischen Prozesse führte zur Entwicklung einer Vielzahl neuer „biologischer“ Pharmazeutika, die derzeit im Rahmen präklinischer und klinischer Studien auf ihre Eignung für die Behandlung von Patienten überprüft werden. Im Jahre 2005 belief sich die Anzahl dieser Biologika auf über 30 Substanzen mit mehr als zehn verschiedenen Angriffspunkten am intestinalen Immungefüge. Biologische Therapien zielen auf spezifische Prozesse in der Pathophysiologie einer Erkrankung. Man erhofft sich durch sie effektivere und nebenwirkungsärmere Behandlungsmöglichkeiten verglichen mit den konventionellen Therapieoptionen.

Mögliche neue therapeutische Angriffspunkte umfassen unter anderem die Veränderung von Faktoren innerhalb des Darmlumens, die Verstärkung der Barrierefunktion des angeborenen Immunsystems, die Steigerung der epithelialen Wundheilung, die Hemmung von Zelladhäsion bzw. Leukozytenrekrutierung oder die Blockade von Zytokinen. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenschau einer Auswahl an Biologika und deren Wirkmechanismen bei CED (Düker, 2007).

Infliximab und Adalimumab sind derzeit die einzigen für die Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zugelassenen Substanzen aus der Gruppe der Biologika. Viele andere

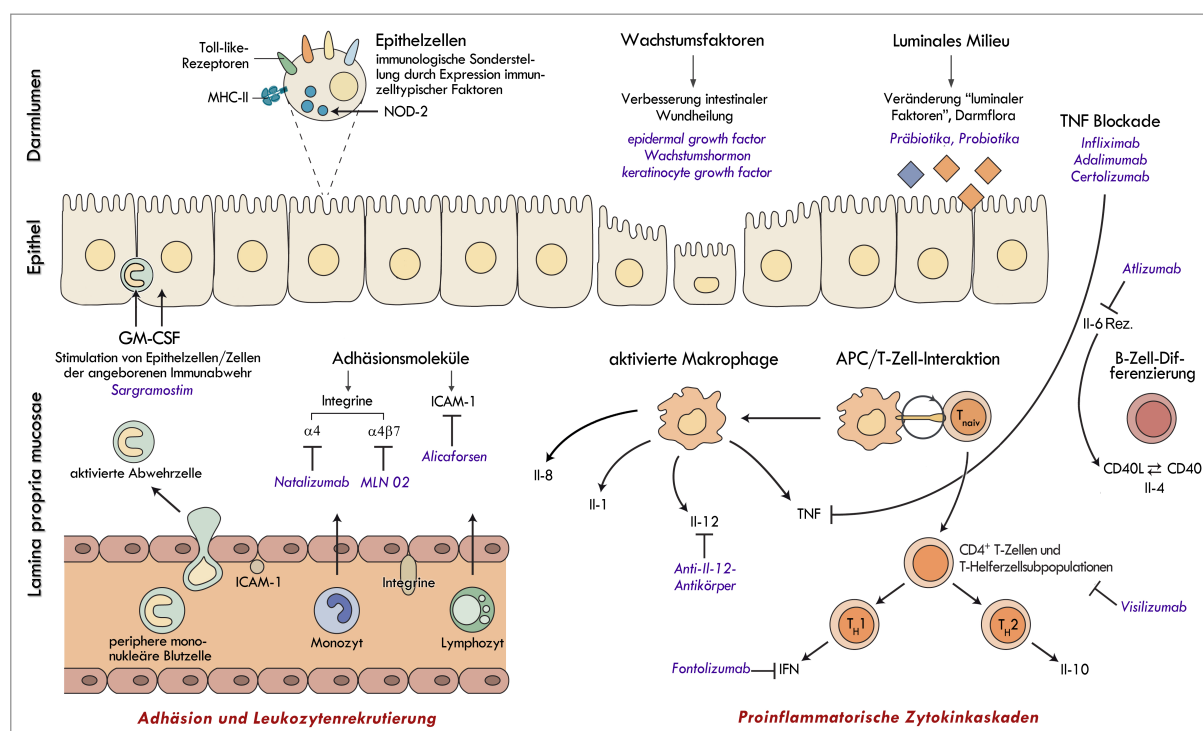


Abbildung 3. Zukünftig denkbare „biologische Therapieoptionen“ bei CED. Darstellung einer Auswahl von Biologika in präklinischer oder klinischer Erprobung (blau) und deren Angriffspunkte im intestinalen Immungefüge. Aktuell sind die Anti-TNF-Antikörper Infliximab und Adalimumab die einzigen leitlinienkonformen Biologika für den Einsatz bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

dieser modernen Medikamente haben die in sie gesetzten hohen Erwartungen in klinischen Erprobungen nicht erfüllt. Die Auswahl geeigneter Patientenkollektive lässt ebenso noch Fragen offen wie Aspekte der Anwendungssicherheit und mögliche Langzeitnebenwirkungen. Trotzdem wird diese Art der gezielten Einflussnahme auf pathologische Prozesse im Entzündungsgeschehen zukünftig neue Therapieoptionen bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit immunologisch bedingter, hyperinflammatorischer Dysregulation bieten können.

1.4 Ziele der Arbeit

Entzündungsreaktionen und Gewebszerstörung prägen das Erscheinungsbild chronisch entzündlicher Systemerkrankungen. Zytokine sind integraler Bestandteil der physiologischen Abwehr infektiöser Pathogene, der Tumormunität und der Zellzyklusregulation. Andererseits sind sie an zentralen pathophysiologischen Vorgängen in Krankheiten mit autoimmuner Komponente beteiligt, durch Vermittlung von Inflammation und Angiogenese. LIGHT, das jüngste Mitglied der TNF-Superfamilie, wurde als wichtiger proinflammatorischer Faktor mit Bedeutung in vielen dieser Systemerkrankungen identifiziert.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Zytokin LIGHT. Mit verschiedenen proteinchemischen bzw. durchflusszytometrischen Techniken erfolgte zunächst die Analyse von Bindungsfähigkeit und Spezifität der aufgereinigten Hybridomzellüberstände. In anschließenden *in vitro* Experimenten auf Zellkulturbasis lag Augenmerk auf der Untersuchung einer effektiven, neutralisierenden Bindung der Antikörper an LIGHT. Weiteres Versuchsziel war die funktionelle Antikörpertestung im Tiermodell der DSS-induzierten Colitis der Maus, d.h. die Evaluation ihrer Fähigkeit LIGHT *in vivo* zu neutralisieren. Aufgrund immunologischer Parallelen im Entzündungsprozess der Colitis im DSS-Modell verglichen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen liegt das Augenmerk hierbei auf evt. zukünftigen Therapieoptionen bei dieser Form der intestinalen Inflammation. Die Untersuchung der monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper hinsichtlich einer Kreuzreaktivität gegenüber ihrem humanen Ortholog bildete einen weiteren Kernpunkt der Versuche.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Mäuse mit Gendefizienz gegenüber LIGHT nur milde Darmentzündungen unter DSS-Gabe ausprägen (Jungbeck, 2006). Inwiefern dieser antiinflammatorische Effekt auch in Folge gezielter Antagonisierung des entzündungsfördernden Faktors LIGHT mit biologisch wirksamen, monoklonalen Antikörpern erreicht werden kann, ist die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

2. Materialien und Reagenzien

Folgende tabellarische Listung gibt einen Überblick der in den Versuchen verwendeten chemischen Stoffe, Materialien und Geräte. Nicht einzeln aufgeführte chemische Feststoffe wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim) bezogen. Als Grundmedium für Puffer bzw. Lösungen gilt demineralisiertes Reinstwasser (Millipore®-Aufbereitungsanlage), soweit nicht anders angegeben.

2.1 Chemische Substanzen

Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roche, Mannheim
APS, Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
BSA, Bovines Serumalbumin	Boehringer, Ingelheim a. Rhein
Chelating Sepharose	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Coomassie Brilliant Blau	Fluka, Buchs, Schweiz
o-Dianisidin, o-Dianisidindihydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
DMSO, Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Steinheim
DSS, Dextransulfat-Natrium	ICN Biochemicals, Ohio, USA
EDTA, Titriplex	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS, Fetales Kälberserum	PAN Biotech, Aidenbach
FITC, Fluoresceinisothiocyanat	Sigma Aldrich, Steinheim
Formaldehyd Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	PAN Biotech, Aidenbach
HTAB, Hexadecyltrimethylammoniumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Imidazol	Sigma Aldrich, Steinheim
Iono, Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg

Methanol	Merck, Darmstadt
PFA, Para-Formaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
PMA, Phorbol-Myristat-Acetat	Sigma Aldrich, Steinheim
Protein-G Sepharose	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
SDS, Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich, Steinheim
TEMED, Tetramethylethyldiamin	Sigma Aldrich, Steinheim
Tergitol NP-40	Biomol, Hamburg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim

2.2 Puffer und Lösungen

Block-Puffer nach Western Blot	5% Magermilchpulver in TBST
Coomassie Entfärbelösung	40% Ethanol 10% Essigsäure
Coomassie Färbelösung	0,25% Coomassie Brilliant Blau 40% Methanol 10% Essigsäure
EDTA-Säulenregenerationslösung	200 mM EDTA 500 mM NaCl
Einfriermedium (2-fach)	20% DMSO + 80% FCS
ELISA - Reagent Diluent	1% BSA in PBS
ELISA - Stopplösung	1 M Schwefelsäure
ELISA - Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
Elutionslösung, Antikörperaufreinigung (pH 2,7)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1% SDS 1% Triton-X

Elutionslösungen, LIGHT-Aufreinigung (pH 8,0)	300 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 5 mM 100 mM 250 mM Imidazol
Erythrozyten-Lysepuffer (ACK-Puffer)	150 mM NH ₄ Cl 1 M HEPES
FACS-Fixierungslösung	2% PFA in FACS-Puffer
FACS-Puffer	10% FCS in PBS
Immunpräzipitation - Probenwaschpuffer (pH 7,6)	50 mM Tris-HCl 500 mM NaCl 1% BSA 1% Tergitol NP-40
Immunpräzipitation - RIPA-Vorreinigungspuffer (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1% SDS 1% Triton-X
Laemmli Elektrodenpuffer	24 mM Tris Base 190 mM Glycin 0,1% SDS
MPO-Phosphatgrundpuffer (pH 6,0)	6,6 mM K ₂ HPO ₄ 43,3 mM KH ₂ PO ₄
MPO-Puffer A	13,7 mM HTAB in MPO-Phosphatgrundpuffer
MPO-Puffer B	0,53 mM o-Dianisidin 0,0005% Wasserstoffperoxid in MPO-Phosphatgrundpuffer
PBS, Phosphate Buffered Saline (pH 7,3)	137 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
pH-Justierungspuffer nach Antikörperelution (pH 9,0)	1 M Tris-HCl
SDS-Probenpuffer (2-fach)	125 mM Tris (pH 6,8) 20% Glycerin 2% SDS 0,02% Bromphenolblau 2% β-Mercaptoethanol
Stripping-Puffer nach Immundetektion	2% SDS 100 mM β-Mercaptoethanol in TBST
TBS, Tris Buffered Saline	137 mM NaCl 24,8 mM Tris Base 2,7 mM KCl

TBST		0,05% Tween 20 in TBS
Transferpuffer für Western Blot (pH 9,4)		25 mM Tris Base 10% Methanol
Tris-Puffer für SDS-PAGE Gele	<i>Sammelgel:</i> <i>Trenngel:</i>	500 mM Tris-HCl (pH 6,8) 1500 mM Tris-HCl (pH 8,8)
Trypan-Blau		150 mM NaCl 0,15% Trypanblau

2.3 Zellkulturbedarf und Zelllinien

Nährmedien zur Zellkultivation:

Insect-Express® (BioWhittaker/Lonza, Wakersville)	+ 0,1% Kanamycin
Primärzellmedium	RPMI-1640 Medium + 50 µM β-Mercaptoethanol
RPMI-1640 (PAN Biotech, Aidenbach)	+ 10% FCS + 0,1% Gentamycin

Antibiotika zur Selektion und Verhinderung bakterieller Expansion:

Geneticin, G418	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Hygromycin B	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim

Zelllinien:

<i>Kurzname</i>	<i>Art des Wachstums</i>	<i>Zelllinie</i>
A-375	adhärent	Human-Melanomzelllinie
BFS-1	adhärent	Maus-Fibrosarkomzelllinie
CHO	adhärent	Hamster-Ovarialzelllinie
S-2	in Suspension	Drosophila-Schneider-Zellen

2.4 Detektionsantikörper

Anti-B220-Antikörper/PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-CD3-Antikörper/PE (Phycoerythrin)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-CD4-Antikörper/PacBlue (Pacific Blue)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-CD8-Antikörper/APC (Allophycocyanin)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-Human-IgG-Antikörper/PE	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-His-Tag-Antikörper	Qiagen, Hilden
Anti-Maus-IgG-Antikörper/POX	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-myc-Tag-Antikörper	Klon 9E10 (Hehlgans, 2001)
Anti-Maus-LT β R-Antikörper	Klon 5G11b (Hehlgans, 2003)
LT β R/F _C	Fusionsprotein (Hehlgans, 2002a)

2.5 Versuchs-Kits

BCA Proteinbestimmungskit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
DOTAP Liposomal Transfection Kit	Roche, Mannheim
DuoSet [®] Il-8 Il-6 TNF IFN- γ MIP-2 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
FITC-Conjugation Kit	Sigma Aldrich, Steinheim
Nowa [®] Chemoluminescent Western	MoBiTec, Göttingen

2.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Amersham Hyperfilm TM Chemolumineszenzfilm	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Cell-Strainer	BD-Falcon, Heidelberg
Chromatographiesäulen für Proteinaufreinigung	Bio-Rad, München
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde
Dialyseschläuche (12-16 kD)	Biomol, Hamburg
Einbettungskassetten für histologische Fixierung	KABE Labortechnik, Nürmbrecht
ELISA-Mikrotiterplatten (96-well)	BD-Falcon, Heidelberg
ELISA-Reader	MWG Biotech, Ebersberg

FACScan FlowCytometer	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
Filmentwicklungsmaschine X-OMAT 2000	Kodak, Stuttgart
Gelelektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
HiTrap [®] Protein-G Sepharose Aufreinigungssäulen	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HPLC-Anlage EconoSystem	Bio-Rad, München
Inkubatoren für Zellkultur	Heraeus, Hanau
Kanülen (0,7 mm x 30 mm)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	BD-Falcon, Heidelberg
Lackmuspapier	Merck, Darmstadt
Laminarflow Sterilbank	Heraeus, Hanau
Microm HM 400, Schlittenmikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskope (Zellkultur, Histologie)	Zeiss, Jena
Molekulargewicht-Standard für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Multiwell Zellkulturplatten	BD-Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
Objektträger (geschnitten, Mattrand)	Engelbrecht, Edermünde
pH-Meter	InoLab WTW, Weilheim
PVDF-Blotmembran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße, Cups (1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (1 ml, 5 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter Steritop (0,22 µm)	Millipore, Schwalbach
Thermoblock	Hartenstein, Würzburg
Ultra-Turrax Stab	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Western Blot Apparatur	Biometra, Göttingen
Whatman-Papier	Laborcenter, Nürnberg
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	BD-Falcon, Heidelberg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD-Falcon, Heidelberg

3. Experimentelle Methoden, Versuchstechniken

3.1 Proteinchemische Verfahren

3.1.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen bzw. Proteingemischen erfolgte elektrophoretisch im Polyacrylamidgel. Denaturierend wirkendes SDS in der Gelzubereitung und eingebrachte Proteinproben verbinden sich zu negativ geladenen Komplexen mit konstantem Verhältnis von Ladung zu Molekülmasse. Da vorbestehende Eigenladungen maskiert werden, kommt es im elektrischen Feld zur Auftrennung der linearisierten Proteine ausschließlich in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes. Im Verfahren der diskontinuierlichen SDS-PAGE mit Kombination von Trenngel und vorgeschaltetem Sammelgel (Laemmli, 1970) gelingt – aufgrund der Fokussierung der Laufbanden vor Eintritt ins Trenngel – eine besonders hohe Schärfe der Proteinbanden.

Zwischen zwei Glasplatten (Abstand 1,5 mm) wurde zunächst das Trenngel gegossen (s. Tabelle 2) und temporär mit Butanol überschichtet. Nach Polymerisation folgte in einem zweiten Schritt das Anlegen des Sammelgels (s. Tabelle 2), in welches je nach Probenanzahl bzw. -volumen ein Kamm eingebracht wurde. Das fertige Gel wurde – an Anode und Kathode in Laemmli-Elektrodenpuffer eintauchend – in die Elektrophoresekammer eingesetzt, dann der Kamm vorsichtig entfernt. Erhitzung des Molekulargewichtsstandards sowie der Proben in SDS-Probenpuffer (95°C, 5 min) vor der Beschickung der einzelnen Probentaschen diente der Auflösung der Tertiärstruktur der Proteine.

Dem elektrophoretischen Trennverfahren (20 mA, 200 V) folgte die direkte Färbung des Gels mit Coomassie Lösung oder die Übertragung der Proteine auf PVDF-Membran im Western Blot.

	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid-Stammlösung	9,4 ml	1,3 ml
SDS-Lösung	225 µl	90 µl
aqua demineralisata	7,5 ml	5,6 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,6 ml	---
0,5 M Tris (pH 6,8)	---	2,3 ml
APS-Lösung	150 µl	75 µl
TEMED	15 µl	7,5 µl

Tabelle 2. Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele.

3.1.2 Western Blot und Immundetektion

Zur immunchemischen Untersuchung nach SDS-PAGE ist es notwendig, die aufgetrennten Proteine aus der denaturierenden Umgebung des Gels zu lösen und auf einer Membran zu fixieren. Diesen Transfer bewirkt bei der Western Blot Analyse ein Spannungsgradient zwischen Polyacrylamidgel und PVDF-Membran. Ziel der Methode ist der Nachweis spezifischer Proteine durch nachfolgende Immundetektion mithilfe indirekter Markierungstechnik (Towbin, 1989).

In den Versuchen kam ausschließlich ein Semi-Dry-Blot Verfahren zur Anwendung. Dazu wurden zwei Whatmanpapierstücke in Gelgröße mit Transferpuffer getränkt und gegenüberliegend auf Anoden- und Kathodenplatte der Blotapparatur platziert. Es erfolgte die Positionierung der mit Methanol und Transferpuffer benetzten PVDF-Membran unter dem befeuchteten SDS-Gel am Whatmanpapier der Anodenseite. Akribisch wurde auf Luftblasenfreiheit zwischen den einzelnen Schichten geachtet. Das Aufbringen der Kathodenplatte vervollständigte die Anordnung. Mit dem Anlegen der elektrischen Spannung (1 mA/cm^2 , 1 h) startete der Proteintransfer.

Vor einer Immundetektion müssen die unspezifischen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran durch inerte Polypeptide abgebunden werden (Hauri, 1986). Hierzu wurde die Membran nach dem Blot mit Block-Puffer versetzt (Raumtemperatur, 3 h). Im ersten Schritt der Immundetektion lagerten sich zugegebene, antigenspezifische Antikörper – verdünnt in TBST mit 1% Magermilchpulver – in zweistündiger Inkubationszeit den entsprechenden transferierten Proteinen an. Speziesspezifische, Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (1:4000 in TBST mit 1% Magermilchpulver) detektierten daraufhin entsprechende Primärantikörper (Raumtemperatur, 1 h). Um überschüssige, ungebundene Immunglobuline wieder zu entfernen, wurde die Membran nach jedem der beiden Inkubationsschritte dreimal für 10 min in TBST gewaschen.

Der Nachweis des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem Nowa[®] Chemoluminescent Kit. Dabei kommt es zur POX-katalysierten Oxidation des Substrates Luminol unter Lichtemission. Diese Chemolumineszenzreaktion wurde auf lichtempfindlichen Filmen registriert und sichtbar gemacht. Die Dauer der Filmexposition variierte zwischen 30 s und 120 s.

Inkubation einer Membran nach Immundetektion in denaturierendem Stripping-Puffer (20 min, Raumtemperatur) und anschließendes Waschen in TBST (10 min) führt zur Ablösung der gebundenen Nachweisantikörper, während die fixierten Proteine zurück bleiben. Auf diese Weise konnten an einer Membran auch verschiedene Immundetektionen nacheinander vollzogen werden.

3.1.3 Dot Blot

Im Gegensatz zum Western Blot werden Proteine beim Dot Blot direkt auf ein Membranstück aufgetragen und stehen damit in nativer, nicht denaturierter Form einer Immundetektion zur Verfügung (Herbrink, 1982).

Zunächst wurden Nitrocellulosestreifen an den Auftragungspunkten mit einem spitzen Bleistift leicht eingeritzt um ein flächiges Auseinanderdiffundieren der Proben zu vermeiden. Mit einer feinen Pipette wurden je drei unterschiedliche Mengen (0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg) des Testproteins (in PBS) aufgetüpfelt. Die Membranstücke inkubierten über Nacht (4°C) in Block-Puffer.

Anschließende Immundetektion erfolgte nach gleicher Verfahrenstechnik als beim Western Blot (Punkt 3.1.2) aufgezeigt.

3.1.4 Coomassie-Färbung

Durch Coomassie Färbelösung werden Proteine in Gelen nach SDS-PAGE bzw. auf Membranen nach Western Blot sichtbar gemacht. Coomassie Brilliant Blue® lagert sich reversibel an aromatische wie basische Aminosäureseitenketten an und bewirkt so eine unspezifische Anfärbung (Dell'Angelica, 2001).

Membranen wurden zur nachträglichen Kontrolle des Bloterfolges bzw. zum Abgleich mit dem Signal in der Immundetektion für 10-20 min mit Coomassie Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärber gewaschen bis die Proteinbanden deutlich erkennbar hervortraten. Bei SDS-Gelen waren Färbedauern bis 2 Stunden nötig; die Entfärbung erfolgte über Nacht.

3.1.5 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation lässt sich die Bindungsfähigkeit zwischen gelöstem Antigen und monoklonalem Antikörper unter nativen Bedingungen evaluieren. Die Methode beruht auf der spezifischen Anlagerung von IgG-Molekülen, gerichtet über ihren F_C-Teil, an Protein-G-Sepharose. Präformierte, gelöste Antigen-Antikörper-Komplexe lassen sich auf diese Weise per Zentrifugation präzipitieren (Bonifacino, 2001).

Das verwendete Verfahren gliederte sich in drei Stufen (s. Abbildung 4). Ein Vorinkubationsschritt (Preclearing) sollte unspezifisch an Protein-G-Sepharose bindende Moleküle in der Proteinprobe verhindern. Dazu wurde das Protein mit Sepharose in 1 ml RIPA-Puffer gegeben (4°C, 1 h, Schüttler), daraufhin die Lösung pelletiert (4°C, 5 min, 20.000 rcf). Zur Präzipitation wurde der nun gewonnene Überstand mit dem zu evaluierenden Antikörper im Überschuss versetzt (4°C, 1 h). Es folgte die Beimischung der Präzipitationsmatrix (4°C, 1 h, Schüttler). Im anschließenden Zentrifugationsschritt (4°C, 5 min, 20.000 rcf) sammelten sich Immunkomplexe bzw. Matrix am

Boden des Reaktionscups. Das Pellet wurde sechs Mal in kaltem Waschpuffer (4°C) gespült, um eventuelle, unspezifische Restproteine zu beseitigen.

Nach Denaturierung in 20 µl SDS-Probenpuffer (95°C, 5 min) erfolgte die Analyse des Präzipitats durch Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE. Bei der späteren Immundetektion im Western Blot kamen Anti-myc-Tag-Antikörper (4 µg/ml in TBST + 1% Magermilchpulver) zum Einsatz.

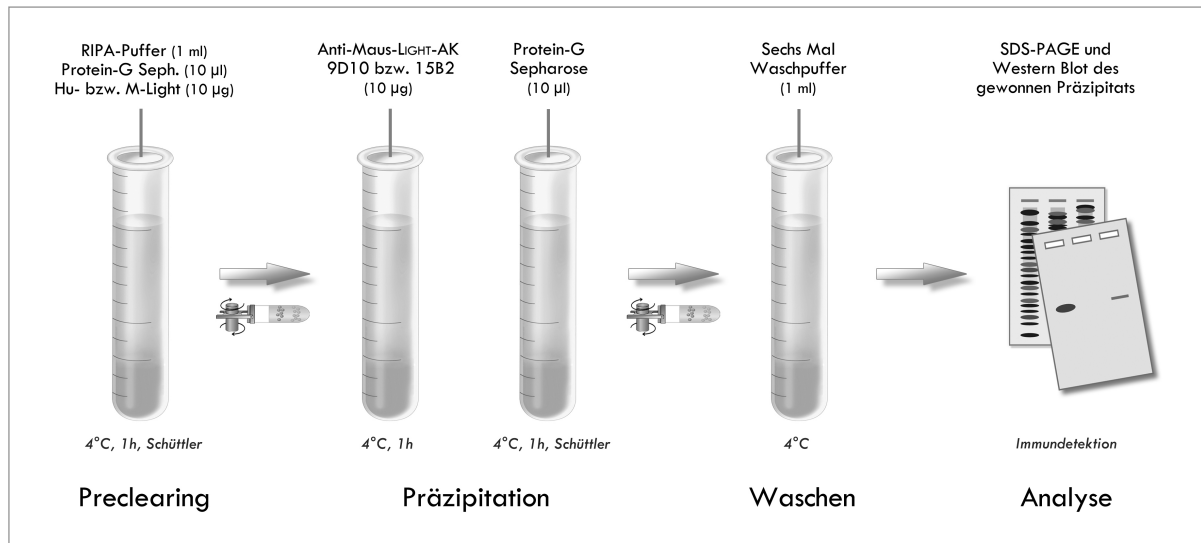


Abbildung 4. Übersicht zum Verfahren der Immunpräzipitation. Aus den drei Versuchsschritten gewonnenes Präzipitat steht nach Denaturierung für die Analyse in SDS-PAGE und Western Blot zur Verfügung. LIGHT-Proteine werden durch Anti-myc-Tag-Antikörper in der Immundetektion nachweisbar.

3.1.6 Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA

ELISAs zählen zu den quantitativen, immunologisch gestützten Methoden der Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen. Bei der so genannten „Sandwich-Technik“ werden die zu analysierenden Moleküle durch spezifische, an die Mikrotiterplatte gekoppelte Erstantikörper erkannt und „gefasst“. In einem zweiten Schritt binden biotinylierte oder direkt enzymkonjugierte Detektionsantikörper ein weiteres Epitop der Prüfsubstanz. Dabei ist die Menge an gebundenem enzymmarkiertem Zweitantikörper proportional der Menge an vorhandenem Antigen.

Biotinylierte Sekundärantikörper werden durch Anlagerung von Streptavidin-Enzymkomplexen für die Nachweisreaktion vorbereitet. In diesen Versuchen handelt es sich um Peroxidase-katalysierte Umsetzungen, in denen ein geeignetes chromogenes Substrat zum fotometrisch messbaren Farbstoff reagiert. Durch Korrelation der gemessenen Probenextinktionswerte mit einer gleichzeitig erfassten Standardkurve werden einzelne Konzentrationen berechenbar.

Die Quantifizierung von Il-6, Il-8, IFN- γ , MIP-2 und TNF aus Zellkulturüberständen geschah mit Hilfe entsprechender Bestimmungskits (DuoSet[®] ELISA System), gemäß den Angaben des Herstellers. Diesen ELISA-Systemen liegt oben beschriebenes Sandwich-Prinzip zugrunde. Zur Versuchsvorbereitung wurde abgenommener Zellkulturüberstand zentrifugiert (3 min, 20.000 rcf), um verbliebene Zellen zu separieren. Der zellfreie Überstand wurde unverdünnt zur Messung eingesetzt. Die Auslesung der Proben triplicate erfolgte bei 450 nm Lichtwellenlänge am ELISA-Reader.

3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes Maus-LIGHT

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Maus-LIGHT konnte auf bereits fusionierte, in flüssigem Stickstoff lagernde Hybridomzellen zurückgegriffen werden (Jungbeck, 2006).

Die vorausgegangene Fusion war nach Standard-Hybridomtechnik erfolgt (s. Abbildung 5). Dazu waren Milzzellen einer weiblichen, LIGHT-defizienten Maus nach erfolgreicher Immunisierung mit rekombinantem Maus-LIGHT (Extrazellulärdomäne des Proteins) isoliert worden. Die Milzzellen des immunisierten Tieres waren mit der Maus-Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 durch Inkubation in Polyethylenglykol vereinigt worden. Anschließend Kultivierung auf HAT-Nährmedium diente der Selektion erfolgreich fusionierter Zellen. Nach Subklonierung der Hybridome zur Sicherung des monoklonalen Ursprungs der Antikörper in den Kulturüberständen hatten sich Klon 9D10 und 15B2 positiv gegenüber dem Maus-LIGHT-Protein im direkten ELISA erwiesen.

Die funktionelle Charakterisierung dieser Antikörper ist Gegenstand der durchgeführten Versuche.

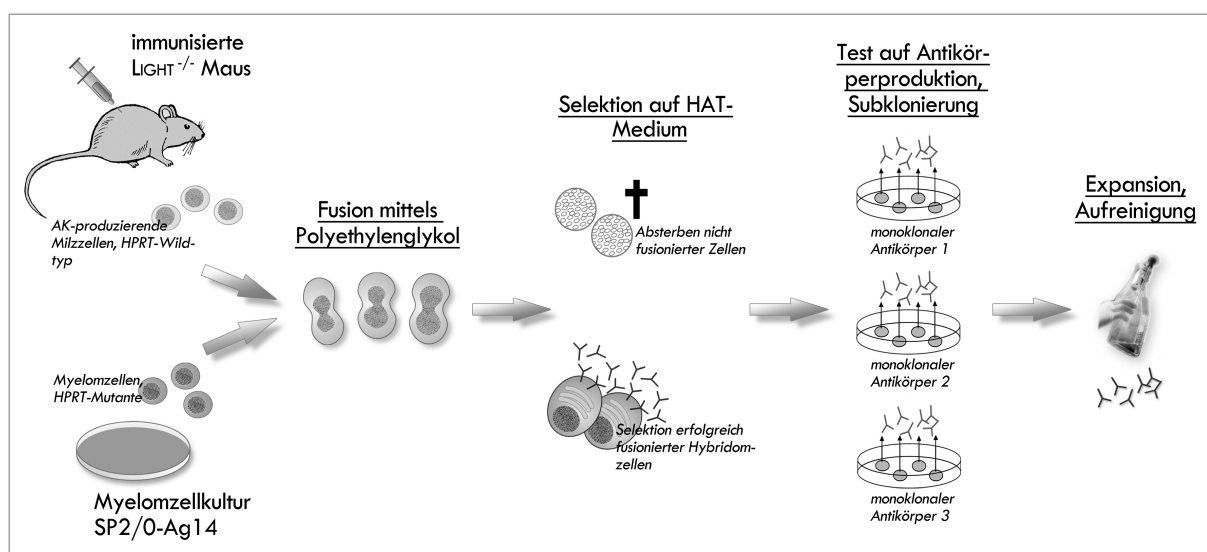


Abbildung 5. Standard-Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein. Antikörper-produzierende Plasmazellen aus der Milz eines erfolgreich immunisierten Tieres werden durch Fusion mit Myelomzellen immortalisiert. Selektions- und Subklonierungsschritte ermöglichen die Anzucht monoklonaler Hybridomkulturen.

3.2.1 Kultivieren der Hybridomzellen

Zur Vermeidung zytotoxischer Effekte von DMSO im Einfriermedium, wurden aufgetaute Hybridomzellen unverzüglich in RPMI-Medium gewaschen. Der Zusatz von „Feeder-Zellen“ unterstützte das Anwachsen der Antikörper-produzierenden Zellen. Es handelt sich dabei um murine, peritoneale Exsudatzellen (PECs), insbesondere Makrophagen, die abgestorbene Zellen aus der Kultur entsorgen und durch Freisetzung diverser Faktoren optimale Wachstumsbedingungen schaffen. Um Exsudatzellen zu erhalten wurde zwei C57BL/6 Mäusen (pro Hybridomansatz eine Maus) steriles PBS intraperitoneal appliziert (1 ml). Tags darauf erfolgte – nach Tötung der Tiere – eine Spülung der Peritonealhöhle mit kaltem PBS + 5% FCS (10 ml). Aspirierte PECs wurden in RPMI-Medium gewaschen, mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt und den Kulturansätzen beigefügt (jeweils 2×10^6 PECs).

Aufgrund des effizienten Wachstums konnten die Klone 9D10 und 15B2 rasch in großen Zellkulturflaschen expandiert werden. Eine Prüfung der Produktion anti-Maus-LIGHT-spezifischer Antikörper geschah per Dot Blot mit Inkubationsmedium. Bei Gelbverfärbung des Kulturüberstandes wurde die Suspension abzentrifugiert (5 min, 300 rcf), das Zellpellet in frischem Medium weiterkultiviert und antikörperhaltiger Überstand asserviert (Lagerung bei 4°C).

3.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Vor der Aufreinigung der antikörperhaltigen Hybridomüberstände (je 2,5 l) wurden diese durch Sterilfiltration (0,22 µm Porengröße) von eventuellen Zellresten befreit.

Die Arbeitsschritte erfolgten an der HPLC-Anlage EconoSystem[®] bei 4°C. Als Chromatographiematrix diente eine HiTrap[®] Protein-G-Sepharose Säule, die in die Pumpzirkulation eingebracht wurde. Es wurde beachtet, dass alle Komponenten im Kreislauf frei von Luftblasen waren. Vor der Beladung mit Immunglobulinlösungen wurde die Säule mit PBS äquilibriert (0,8 ml/min, 20 min).

Durch einen Spülschritt mit PBS (0,8 ml/min, 20 min) im Anschluss an den Antikörperbindungsvorgang an die Säulenmatrix (0,8 ml/min, 50 h) wurde restliches Zellkulturmedium aus der Zirkulation entfernt – die kontinuierlich am UV-Durchfluss-Fotometer gemessene Absorption erreichte wieder den Nullwert. Die Elution startete mit dem Einbringen von Glycinpuffer ins System (0,4 ml/min). Der Verlauf der von der Säule eluierten Proteinmenge wurde im Durchfluss-Fotometer detektiert und mittels Schreiber dokumentiert. Um das saure Milieu des Glycinpuffers auszugleichen, folgte eine Titration der erhaltenen Eluatfraktionen zum Neutralpunkt durch Zugabe von pH-Justierungspuffer. Die Antikörperfraktionen waren nun bereit zur Dialyse gegen PBS (5 l, 4°C, über Nacht).

Zur Bestätigung des Aufreinigungserfolges wurden Proben der einzelnen Fraktionen mit SDS-Probenpuffer denaturiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte die Färbung der Gele mit

Coomassie-Lösung. Die abschließende quantitative Ermittlung der Proteinkonzentrationen der dialysierten Einzelfractionen erfolgte unter Verwendung des BCA-Proteinbestimmungskits gemäß den Vorgaben des Herstellers.

3.3 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT

Für die Analyse der hergestellten monoklonalen Antikörper wurde lösliches, rekombinantes Human- bzw. Maus-LIGHT verwendet. Auf stabil mit entsprechenden Expressionsvektoren transfizierte Drosophila-Schneider-Zellen konnte zur Herstellung der Proteine zurückgegriffen werden (Hehlhans, 2001). S-2-Zellen, die rekombinantes, lösliches Maus-LIGHT ins Nährmedium absondern, wurden in Kultur genommen. Human-LIGHT stand in aufgereinigter Form und ausreichender Menge zur Durchführung der Versuche bereit.

3.3.1 Eigenschaften des Expressionsvektors

Das Wissen um den Expressionsvektor ist maßgeblich, um die transfizierten Zellen korrekt zu kultivieren, eine effiziente Proteinexpression zu erreichen und nachfolgende Aufreinigung erfolgreich durchzuführen. Weiters gibt er Auskunft über den Aufbau der generierten, rekombinanten Proteine, die er codiert. Die verwendeten Drosophila-Schneider-Zellen waren mit dem Vektor $P_{MT}/BiP/V5-His$ transfiziert (s. Abbildung 6).

Dessen Metallothionein Promotor (P_{MT}) gestattet eine Metallionen-induzierbare Transkription der nachstehenden DNA-Sequenz bei Zugabe von Kupfer(II)sulfat zum Nährmedium. Vor dem transkriptionsterminierenden Stopcodon findet sich eine für die Histidinmarkierung des Proteins codierende Basenabfolge (6xHis); dieser His-Tag ermöglicht eine spätere Aufreinigung per Metallionenaffinitätschromatographie. Die Sequenzen für rekombinantes Human- bzw. Maus-LIGHT plus myc-Tag waren mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen an vorhandenen Klonierungsstellen in den Vektor eingebracht (Hehlhans, 2001).

Im Gegensatz zum endogenen Protein handelt es sich bei rekombinanten, löslichen LIGHT-Molekülen um Extrazellulärdomänen mit „Peptidanhängseln“. Intrazellulär- und Transmembrananteil sind deletiert und zur besseren Proteinsekretion in den Überstand durch einen ‚BIP-2-Leader‘ ersetzt. Angefügter V5- bzw. myc-Tag gestatten eine spätere biochemische Detektion der Proteine.

Zur stabilen Transfektion der S2-Zellen war der klonierte $P_{MT}/BiP/V5-His$ Vektor zusätzlich mit einem Gen für Resistenz gegen Hygromycin B kotransfiziert worden. Somit war selektives Wachstum ausschließlich expressionsvektortragender Zellen im hygromycinhaltigen Nährmedium gewährleistet.

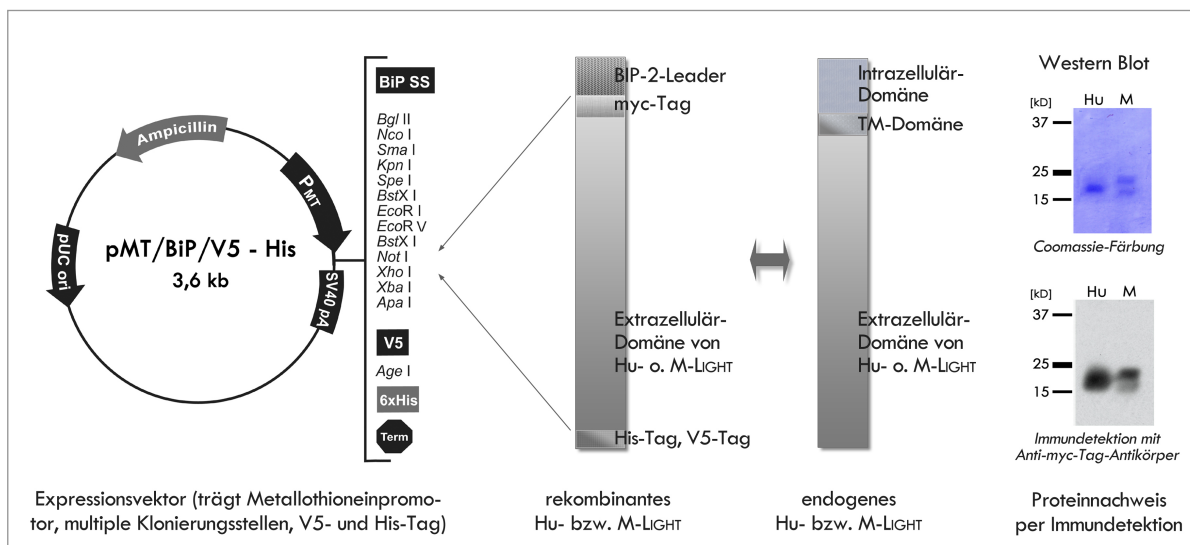


Abbildung 6. Vergleich der Struktur von endogenem, membranständigem Human- bzw. Maus-LIGHT mit den rekombinanten, löslichen Proteinvarianten. BIP-2-Leader und myc-Tag bei rekombinantem LIGHT ersetzen die ursprüngliche Transmembran- und Intrazellulärdomäne. BIP-2 fördert eine effiziente Proteinsekretion aus transfizierten Zellen. Die Peptid-Tags (myc, His, V5) ermöglichen einen spezifischen Nachweis im Western Blot.

3.3.2 Aufreinigungsprotokoll für rekombinantes Maus-LIGHT

Transfizierte Drosophila-Schneider-Zellen wurden auf Insect-Express[®] Nährmedium mit Hygromycin B Zusatz (400 µg/ml) in Zellkultur genommen. Zur Induktion der Expression von Maus-LIGHT wurden Zellsuspensionen dicht bewachsener Kulturflaschen in Zentrifugenröhrchen überführt, vorsichtig pelletiert (5 min, 250 rcf) und in frischem, hygromycinfreiem Medium resuspendiert (40 ml). Die Stimulation erfolgte durch Zugabe steriler Kupfer(II)sulfatlösung (1 mM Endkonzentration). Nach Inkubation der Ansätze unter Rotation (72 h, Raumtemperatur) wurde der Zellanteil durch Zentrifugation (7 min, 3.000 rcf) vom LIGHT-haltigen Kulturüberstand separiert. Insgesamt konnten derart 3,5 l Überstand gesammelt werden.

Aufgereinigt wurde mittels Metallionenaffinitätschromatographie an einer Chelating Sepharose Säule. Kupferionen, die sich ab der Expressionsstimulation in der Lösung befinden, fungieren hierbei als Zentralatome und vermitteln durch Ausprägung koordinativer Bindungen mit Poly-Histidinresten der Proteine einerseits, mit Ligandstrukturen der Matrix andererseits, stabile Chelatkomplexe. An die stationäre Phase gebundenes Maus-LIGHT wurde sodann in Konkurrenz zu Imidazol eluiert.

Vor der technischen Aufreinigung an der HPLC-Anlage EconoSystem[®] war es wichtig die korrekte Imidazolkonzentration für die Elution zu finden. Dazu wurden in einer manuellen Testaufreinigung Puffer aufsteigender Imidazolkonzentration (je 1 ml, von 10 mM bis 250 mM) auf LIGHT-beladene Chelating-Sepharose (100 µl) gegeben. Asservierte Eluatfraktionen wurden mit Anti-myc-Tag-Antikörpern per Western Blot Technik analysiert (1:1000 in TBST mit 1% Magermilchpulver).

Die Arbeitsschritte am HPLC-System ähneln denen bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper (Punkt 3.2.2). Zwischen der Beladung der Chelating Sepharose Säule mit Protein (0,8 ml/min, 72 h) und der Elution (100 mM Imidazol) stand hier ein Spülschritt mit niedrigkonzentriertem Imidazolpuffer (5 mM) bis vom UV-Durchflussdetektor Nullwert ausgegeben wurde. Auf diese Weise konnten histidinhaltige Peptide aus dem Zellkulturüberstand, die unspezifisch an die Matrix banden, eliminiert werden. Abschließend wurde die Säule zur Wiederverwendung mit EDTA-Puffer und Ethanol (20%) regeneriert (1 ml/min, je 20 min). Nach Dialyse gegen PBS (4°C, über Nacht) und Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Test erfolgte die Aliquotierung des aufgereinigten, rekombinanten Maus-LIGHT.

3.4 Austestung der monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper im zell-biologischen Neutralisationsassay

Es ist bekannt, dass A-375 Zellen nach Stimulation mit Human-LIGHT, vermittelt über den Human-LT β -Rezeptor, IL-8 ins Nährmedium sezernieren (Hehlhans, 2001). BFS-1 Zellen hingegen, die den Maus-LT β -Rezeptor exprimieren (Hehlhans, 2003), produzieren bei Anwesenheit von Maus-LIGHT die Zytokine MIP-2 und IL-6. Diese Eigenschaften waren Grundlage folgenden Versuches, zur Prüfung einer funktionellen Antagonisierung von löslichem Human- oder Maus-LIGHT durch die Antikörperklone 9D10 bzw. 15B2.

Adhärenz wachsende A-375 bzw. BFS-1 Zellen lösten sich durch Zugabe von Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche und wurden in frisches RPMI-Medium aufgenommen. Nach Mischung einer kleinen Probe der erhaltenen Zellsuspension mit Trypan-Blau Lösung erfolgte die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Neubauer Zählkammer. Pro Vertiefung einer 24-Well Platte wurden 10^5 Zellen ausgesät und mit RPMI-Medium (1 ml) für 24 h inkubiert, so dass sie am Plattengrund readhärierten.

Im Austausch gegen das Kulturmedium wurden dann vorinkubierte Lösungen (2 h, 37°C) von Human- bzw. Maus-LIGHT in frischem RPMI-Medium (ad 1 ml pro Well) auf die Zellen gegeben. Vorbereitende Testungen zeigten eine optimale Stimulierbarkeit der A-375 Zellen bei Zusatz von 10 μ g/ml Human-LIGHT, während BFS-1 Zellen durch 15 μ g/ml Maus-LIGHT zu einer maximalen Zytokinproduktion angeregt werden konnten. Zur Prüfung auf ihre funktionelle Neutralisationswirkung erfolgte die Zugabe von Antikörper 9D10 oder 15B2 zu diesen Stimulationsansätzen, wobei jeder Klon gegen beide speziesspezifischen Proteine zur Austestung kam. Weiters sollte durch Variation des Antikörpergehalts in den einzelnen Ansätzen die Konzentrationsabhängigkeit eines Neutralisationseffekts untersucht werden. 24 Stunden später wurden die Überstände aus den

Probeneintiefungen der Platte abpipettiert, zum Beseitigen von Zellresten zentrifugiert (5 min, 20.000 rcf) und per ELISA auf den Gehalt von Il-8 bzw. MIP-2 analysiert.

3.5 Durchflusszytometrische Untersuchung der Antikörperbindungsfähigkeit

Ziel dieses Versuches (s. Abbildung 7) war die Analyse der Bindungsfähigkeit der Antikörper 9D10 und 15B2 gegenüber membranständigem Maus-LIGHT auf Splenozyten einer Wildtyp-Maus (C57BL/6) bzw. auf entsprechend transfizierten CHO-Zellen. Als Negativkontrolle dienten Milzzellen eines LIGHT-defizienten Tieres (Scheu, 2002). Zur Detektierbarkeit der Antikörper in der Durchflusszytometrie erfolgte eine Markierung mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat, unter Verwendung des Fluoro-FITC-ConjugationTM Kit nach Vorgaben des Herstellers.

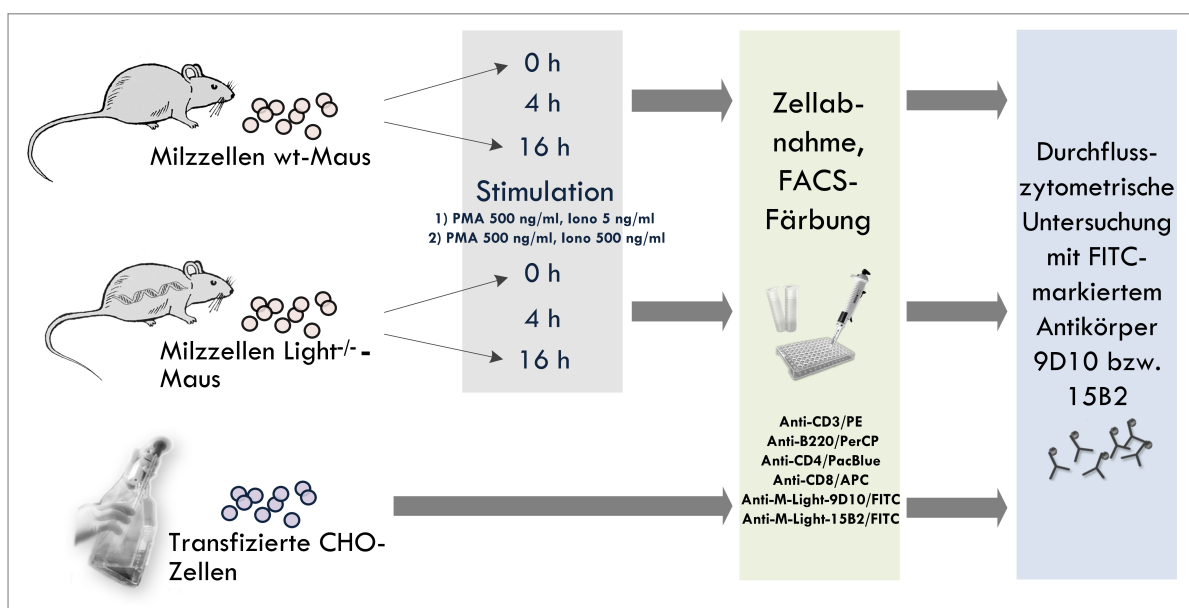


Abbildung 7. Verfahren der durchflusszytometrischen Untersuchung der monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper. FITC-markierter Antikörper 9D10 bzw. 15B2 werden zum Einen auf stimulierten Milzzellen aus Wildtyp- und LIGHT-knockout-Maus getestet, zum Anderen auf transfizierten CHO-Zellen, die Maus-LIGHT auf der Zellmembran exprimieren.

3.5.1 Transfektion von CHO-Zellen mit Maus-LIGHT

Für die durchflusszytometrische Prüfung der Antikörper wurden Wildtyp-CHO-Zellen stabil mit einem Vektor zur Expression von endogenem Maus-LIGHT transfiziert. Der entsprechend klonierte pcDNA-3.1 Vektor codierte gleichzeitig für eine Resistenz gegenüber Geneticin (G418), so dass eine selektive Zellexpansion im antibiotikumhaltigen Nährmedium (800 µg/ml G418) möglich war.

Die Transfektion der CHO-Zellen mit dem LIGHT-Expressionsvektor erfolgte unter Verwendung eines DOTAP Reagenzsystems. Dazu wurden 10^5 Zellen in 5 ml RPMI-Medium in der 6-Well-Platte ausgesät und vorsichtig mit einem – gemäß Protokoll des Herstellers vorbereiteten – DNA/DOTAP-Gemisch versetzt. Nach fünfstündiger Inkubation (37°C) wurde zur Selektion frisches Medium mit Geneticinzusatz (200 µg/ml) aufgetragen. Sobald eine stabile Population herangewachsen war, konnten die transfizierten Zellen in Kultur genommen werden.

3.5.2 Stimulation von Primärzellen und Vorbereiten der FACS-Proben

Das Verfahren der Isolierung murine Splenozyten ist in Punkt 3.6.2 dargestellt. Zur Stimulation wurden pro Vertiefung einer 96-Well-Platte 10^6 Milzzellen gegeben und mit Primärzellmedium (ad 200 µl/Well) versorgt. Die FITC-gekoppelten Antikörper 9D10 und 15B2 sollten auf Zellen des Wildtyp-Tieres et vice versa der LIGHT-knockout Maus zur Austestung kommen. Dazu erfolgten jeweils Stimulationen mit zwei Lösungen unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisses von PMA und Ionomycin für 0 h (de facto unstimuliert), 4 h und 16 h (s. Abbildung 7).

Nach den entsprechenden Inkubationszeiten geerntete Zellen wurden zur Vorbereitung für die FACS-Analysen pelletiert (5 min, 300 rcf), in FACS-Puffer (300 µl) wieder aufgenommen und mit den Detektionsantikörpern versetzt. Neben den vorbereiteten Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern/FITC kamen zur Differenzierung von B-Lymphozyten und verschiedenen T-Lymphozytenpopulationen Anti-B220/PerCP, Anti-CD3/PE, Anti-CD4/PacBlue und Anti-CD8/APC als Färbungen zum Einsatz. Zur Entfernung ungebundener Detektionsantikörper aus der Suspension schloss sich dem „Färbeschritt“ (4°C, 20 min, Dunkelheit) das Waschen mit FACS-Puffer (3 ml) an. Nach Zentrifugation (5 min, 300 rcf) wurden die Proben in FACS-Puffer (400 µl) resuspendiert und standen für die durchflusszytometrischen Untersuchungen bereit.

Die Verarbeitung der mit Maus-LIGHT-Expressionsplasmid transfizierten CHO-Zellen gleicht dem oben beschriebenen Muster, jedoch bedurfte es dort keiner Stimulation sowie keiner Färbung mit Lymphozytenmarkern.

3.5.3 Das Verfahren der Durchflusszytometrie

Das Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers beruht auf der Streuung eines Lichtstrahls beim Auftreffen auf ein Objekt. Die zu analysierenden Zellen einer Suspension werden innerhalb eines Probenführungssystems vereinzelt und an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, wird er je nach deren Beschaffenheit abgelenkt. Gemessen wird das so entstehende Streulicht an zwei Stellen: als Vorwärtstreulicht (Forward Scatter, FSC) gibt es Auskunft über die Größe, und als Seitwärtstreulicht (Side Scatter, SSC) über die Granularität der Zellen. Außerdem

werden Lichtemissionen in verschiedenen Wellenlängenbereichen registriert, die von angeregten Fluoreszenzfarbstoffen, mit denen die Proben markiert sind, ausgehen. Jedes Messereignis (Event) kann somit durch verschiedene Parameter charakterisiert werden.

Für die FACS-Analysen stand ein FACScan FlowCytometer® zur Verfügung. Die Daten wurden im Listmode-Format erfasst und mit Hilfe der Software BD FACSDiva 5.0 ausgewertet. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden neben FITC (an Anti-Maus-LIGHT-Antikörper konjugiert), PE, PerCP, PacBlue und APC verwendet.

3.6 Anti-Maus-LIGHT-Antikörper im Tiermodell der akuten DSS-Colitis

Im Mittelpunkt dieser Untersuchung standen die Effekte einer Behandlung mit Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis der Maus. Die hierzu verwendeten Tiere waren entsprechend den Haltungsvorschriften in IVC-Käfigen untergebracht, hatten einen 12 Stunden hell-dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät sowie Trinkwasser *ad libitum*. Für das Experiment wurden weibliche, bei Versuchsbeginn 17 Wochen alte C57BL/6-Mäuse von der Firma Charles River, Sulzfeld bezogen.

3.6.1 Versuchsplanung

Die Tiere wurden in zwei Versuchsgruppen (n = 5) aufgeteilt. Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse mit einem Körpergewicht von über 21,0 g zum Experiment zugelassen. Zur Induktion einer Darmentzündung erhielten alle Tiere über sieben Tage 1,1% Dextransulfat-Natrium (DSS, Molekulargewicht 36.000-50.000 g/mol), gelöst im Trinkwasser (Okayasu, 1990).

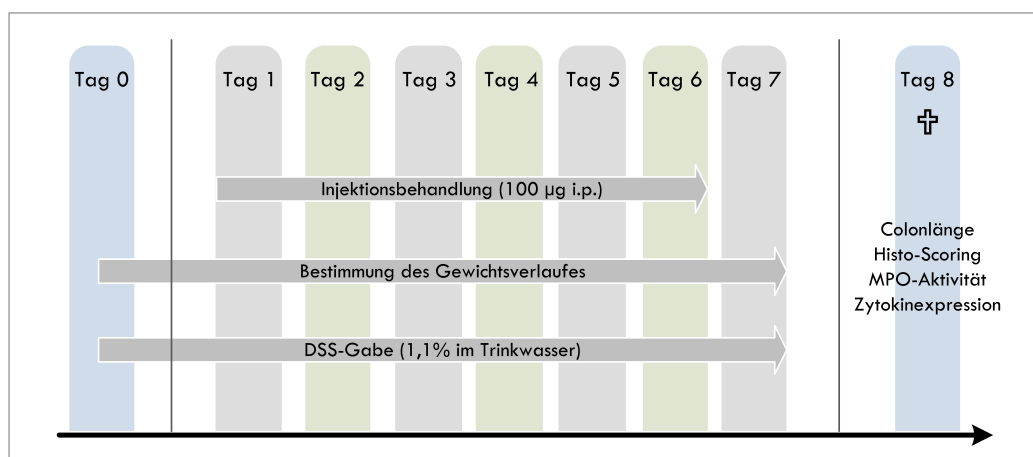


Abbildung 8. Austestung von Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern *in vivo*. Übersicht zum Ablauf des Tierexperimentes. Von Tag 1 bis Tag 6 erhalten Mäuse der Kontrollgruppe Injektionen von 100 µg unspezifischem Maus-IgG, die der Experimentalgruppe 100 µg monoklonalen Antikörper 15B2 (jeweils gelöst in 500 µl sterilem PBS).

Das Detergens stört die intestinale Schrankenfunktion. Dieser Integritätsverlust der mukosalen Epithelzellbarriere mit unkontrollierter Antigenstimulation des GALT bedingt im akuten Stadium des DSS-Colitis-Modells eine charakteristische, T-Zell-vermittelte, granulozytäre Darmentzündung (Kitajima, 1999; Strober, 2002).

Von Tag 1 bis Tag 6 wurde Mäusen der Experimentalgruppe monoklonaler Antikörper 15B2 intraperitoneal injiziert (100 µg pro Tag), während Tiere der Kontrollgruppe unspezifisches Maus-IgG aus Serum (Sigma Aldrich, Steinheim) erhielten (100 µg pro Tag). Am Tag 8 wurden die Mäuse durch zervikale Distraction getötet und das Ausmaß der intestinalen Entzündung bestimmt (s. Abbildung 8).

3.6.2 Präparationstechnik, Isolierung von Primärzellen

Nach Desinfektion der Präparationsstelle mit Ethanol (70%) wurde das Fell von ventral durch einen medianen Schnitt mit der Schere eröffnet, nach kopf- bzw. schwanzwärts abgezogen und die Strukturen der Peritonealhöhle freigelegt. Es folgte die Splenektomie durch Absetzen des Milzhilus sowie die Präparation mesenterialer Lymphknoten, die als gelbliche, rund abgegrenzte Körperchen mit Bezug zu den Mesenterialgefäßen imponierten. Die Milzen lagerten – bis zur weiteren Aufarbeitung unter der Sterilbank – in Primärzellmedium, auf Eis. Schließlich wurde das Colon von Rektum und Dünndarm abgesetzt, durch vorsichtiges Ausstreichen und Spülen (kaltes PBS) von Faeces gereinigt und für weitere Untersuchungen entnommen.

Zur Isolierung von Milzzellen wurden die Präparate mittels Kunststoffstempel zerdrückt. Eine homogene Suspension entstand, indem der erhaltene Gewebestreifen kräftig in kaltem Primärzellmedium resuspendiert und durch einen Cell-Strainer geseiht wurde. Weil Erythrozyten bzw. Hämoglobin ELISA- und FACS-Messungen stören können, wurden die gewonnenen Zellen pelletiert (4°C, 5 min, 300 rcf) und mit Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert (Raumtemperatur, 10 min). Nach zwei Waschschritten in kaltem RPMI-Medium (30 ml, zwischendurch Zentrifugation bei 4°C, 5 min) standen die Zellen für die Versuche zur Verfügung.

3.6.3 Parameter zur Quantifizierung des Schweregrades der Colitis

3.6.3.1 Gewichtsbestimmung während der Versuchsdauer

Die Tiere wurden täglich gewogen. Jede Maus erhielt eine Farbmarkierung, die es ermöglichte die individuelle Gewichtsentwicklung während der sieben Versuchstage zu verfolgen. Die Auswertung des Gewichtsverlaufes erfolgte als prozentuale Differenz gegenüber dem Ausgangsgewicht.

3.6.3.2 Dickdarmlängenbestimmung

Nach Colektomie wurde der gereinigte Dickdarm auf einem Filterpapier so ausgelegt, dass das terminale Dünndarmstück rechtwinklig zum weiteren Colonverlauf stand. Gemessen wurde vom ileozökalen Übergang bis zur Absetzungsstelle am Rektum.

3.6.3.3 Bestimmung des histologischen Scores

Für die histologische Auswertung wurde pro Tier eine Gewebeprobe (ca. 1,5 cm lang) vom distalen Colon in einer Einbettungskassette gesichert und über Nacht in PBS + 5% Formaldehyd fixiert. Es folgte die Entwässerung des Präparates in einer aufsteigenden Ethanolkonzentrationsreihe sowie die Einbettung mit Paraffin. Am Mikrotom wurden von jedem der paraffinierten Darmstücke je drei Längsschnitte angefertigt (3 µm dick, Abstand 100 µm) und zur anschließenden Färbung (Hämatoxylin-Eosin) auf Objektträger gebracht.

Die histologische Befundung geschah verblindet durch Frau PD Dr. Frauke Bataille (Institut für Pathologie, Universität Regensburg) nach einem Scoring-System, welches die Ergebnisse als Punktwerte auf einer festen Skala klassifiziert. Der Score errechnet sich additiv aus den Punktwerten der beiden ordinalskalierten Beurteilungsparameter „Epithelschaden“ und „Infiltrat“ (s. Tabelle 3). Es ergibt sich eine Variationsbreite der Scorewerte von 0 bis 8. Da pro Maus drei Gewebeschnitte ausgewertet wurden, berechnet sich der tatsächliche Endwert als arithmetisches Mittel der drei Einzelbestimmungen.

Epithelschaden	Infiltrat	Punktwert
Normale Morphologie	Kein Infiltrat	0
Verlust einzelner Becherzellen	wenig Infiltrat, nur an Kryptenbasis	1
Flächenhafter Verlust von Becherzellen	Infiltrat zwischen Krypten und Lamina muscularis mucosae	2
Kryptenverlust	größere Infiltrate, Ödem	3
Flächenhafter Kryptenverlust	Infiltrate bis tief in die Submukosa	4

Tabelle 3. Scoring-System zur histologischen Klassifikation des Schweregrades der Colitis. Die Punktwerte der Beurteilungsparameter „Epithelschaden“ und „Infiltrat“ addieren sich zum Gesamt-Score.

3.6.3.4 Messung der Myeloperoxidaseaktivität

Die Myeloperoxidaseaktivität (MPO-Aktivität) in der Darmwand gibt Aussage über das Ausmaß der Neutrophileninfiltration nach Colitis. Zur Bestimmung wurde eine stuhlfreie Gewebeprobe (genau 1 cm Länge) aus dem mittleren Colonverlauf entnommen, in MPO-Puffer A (1 ml) gegeben und

mittels eines Ultra-Turrax® Stabes in der Pufferlösung homogenisiert (höchste Stufe, 90 s). Es folgten drei schnelle Einfrier- und Auftauzyklen (40°C Wasserbad, flüssiger Stickstoff), um die Zellintegrität vollends aufzuheben und das Enzym in Lösung zu bringen. Nach Separation der Zellreste durch Zentrifugation (5 min, 20.000 rcf) konnte die Aktivität von Myeloperoxidase im Überstand gemäß der Methode nach Bradley (Bradley, 1982) fotometrisch ausgemessen werden.

3.6.4 Erstellung von Zytokinexpressionsprofilen nach akuter DSS-induzierter Colitis

Welche Zytokine in welchem Ausmaß die Milzzellen der Tiere aus den beiden Versuchsgruppen nach akuter DSS-induzierter Colitis freisetzen, sollte im Expressionsprofil entsprechender Primärzellen analysiert werden. Das Interesse lag hierbei auf der Untersuchung des Effekts einer Anti-Maus-LIGHT-Antikörper Behandlung bezüglich des Entzündungsstatus in darmfernem Gewebe bzw. im gesamten Organismus.

Das Verfahren zur Isolierung der nötigen Primärzellen ist in Punkt 3.6.2 dargestellt. Pro Versuchsgruppe wurden die Splenozyten der einzelnen Mäuse gepoolt. Nachdem die Zellkonzentrationen der erhaltenen zwei Suspensionen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt waren, erfolgte die Aussaat, jeweils im Quadruplikat, auf der 12-Well-Platte ($5 \cdot 10^6$ pro Well, ad 5 ml RPMI-Medium). Die Zellen inkubierten für 24 Stunden ohne Stimulation. Eventuelle Zellpartikel wurden nach Abnahme der zytokinhaltigen Überstände durch Zentrifugation (5 min, 20.000 rcf) abgetrennt. Der Gehalt der proinflammatorischen Zytokine TNF, IFN- γ , Il-6, und MIP-2 in den gewonnenen Kulturüberständen wurde schließlich per ELISA quantifiziert.

3.7 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte computergestützt mittels der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago) und Excel 2007 (Microsoft, Redmond). Daten sind immer als Mittelwerte plus/minus Standardabweichung ($MW \pm SD$) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede in untersuchten Parameter wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Proteinchemische Charakterisierung der Antikörperbindung

4.1.1 Detektion von rekombinantem Human- bzw. Maus-LIGHT im Dot Blot

Im Dot Blot wird die Bindefähigkeit von Antikörpern gegenüber nativem Protein getestet. Manuelles Auftragen der Proben auf Membranstücke ersetzt dabei ein elektrisches Blotverfahren.

Bei diesem Versuch interessierte zum Einen die Bindefähigkeit der durch die Hybridomlinien produzierten, gereinigten Antikörper mit rekombinantem, nativem Maus-LIGHT; zum Anderen sollte eine mögliche Kreuzreaktivität gegenüber rekombinantem, nativem Human-LIGHT eruiert werden. Drei unterschiedliche Probenkonzentrationen der beiden speziesspezifischen Proteine wurden zusammen mit BSA (1 µg) als Negativkontrolle auf Nitrozellulosemembran getüpfelt.

Abbildung 9 zeigt, dass mit Klon 9D10 wie auch mit Klon 15B2 der Nachweis von Maus-LIGHT im Dot Blot gelingt. Gleichzeitig ergibt sich eine Kreuzreaktivität von 15B2 gegen Human-LIGHT, dessen Aminosäuresequenz zu 77% mit dem murinen Ortholog übereinstimmt (Tamada, 2000b). Das

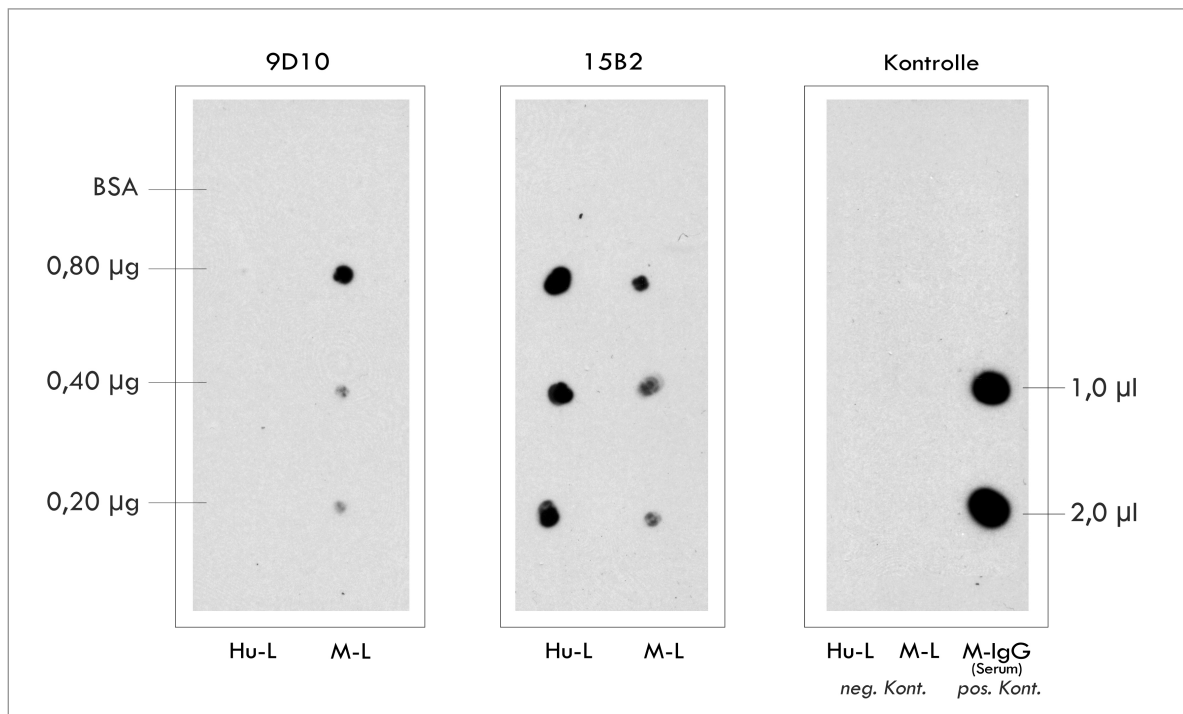


Abbildung 9. Dot Blot von Human- und Maus-LIGHT. In der Immundetektion bindet 9D10 als Primärantikörper ausschließlich Maus-LIGHT, während 15B2 gleichzeitig mit dem humanen Ortholog kreuzreagiert. Das Ausbleiben eines Signals an den Auftragestellen für BSA spricht für Spezifität der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper. Der Kontrollstreifen beweist, dass keine unspezifische Anlagerung des Sekundärantikörpers (Streifen ausschließlich mit Anti-Maus-IgG/POX inkubiert) an LIGHT auftritt.

Ausbleiben eines Signals in der BSA-Kontrolle unterstreicht die Spezifität der Antikörper. Am Kontrollstreifen ist zu erkennen, dass der verwendete Sekundärantikörper nicht eigenständig an die rekombinant hergestellten LIGHT-Proteine bindet (Negativkontrolle), sehr wohl aber an IgG aus Mausserum (Positivkontrolle), welches aus dem mit rekombinantem Maus-LIGHT immunisierten, LIGHT-defizienten Tier gewonnen wurde.

4.1.2 Western-Blot Analysen mit rekombinantem Human- und Maus-LIGHT

Ähnlich dem Dot Blot werden auch beim Western Blot Proteine zur Detektion mit Antikörpern auf Membranen fixiert. Durch Vorbehandlung mit reduzierendem Probenpuffer und Auftrennung im SDS-haltigen Polyacrylamidgel liegen die eingesetzten Proben hier in denaturierter, linearisierter Form vor – ursprüngliche Sekundär- und Tertiärstruktur des Peptids sind aufgehoben.

In diesem Versuch geschah eine Austestung der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper gegen derart strukturveränderte LIGHT-Proteine. Nach Elektrophorese im SDS-Gel und Membrantransfer des rekombinanten Human- und Maus-LIGHT per Kapillarblot, wurden die Blotstreifen zur Immundetektion mit Antikörper 9D10 oder 15B2 inkubiert. Der Filmexposition in diesem ersten Nachweis-schritt folgte eine Behandlung der Membranen mit Stripping-Puffer, um durch eine spätere zweite Immundetektion mit Anti-myc-Tag-Antikörpern eine erfolgreiche Proteinübertragung zu prüfen.

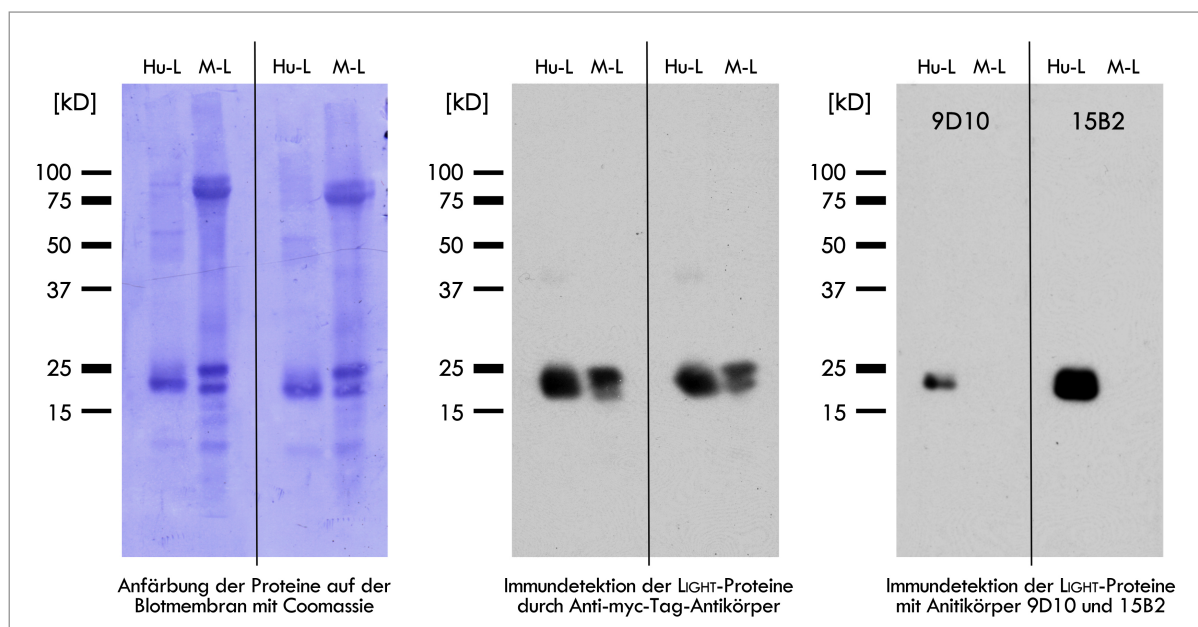


Abbildung 10. Untersuchung der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper gegen Human- und Maus-LIGHT im Western Blot. Coomassiegefärbte Blotstreifen und Immundetektion mit Anti-myc-Tag-Antikörpern nach Membranstripping beweisen einen erfolgreichen Proteintransfer. Beim Einsatz von Antikörper 9D10 (10 µg/ml) bzw. 15B2 (1 µg/ml) zur Immundetektion ergibt sich beide Male ein Signal für Human-LIGHT – denaturiertes Maus-LIGHT wird hingegen nicht erkannt. Als Sekundärantikörper fungierte in beiden Fällen Anti-Maus-IgG/POX.

Die mit Coomassie gefärbten PVDF-Streifen sowie die Immundetektion mit Anti-myc-Tag-Antikörpern zeigen die Anwesenheit der Proteine in den einzelnen Laufbahnen und sprechen für einen erfolgreichen Blot (s. Abbildung 10). Ein Nachweis des denaturierten, rekombinanten Maus-LIGHT gelingt mit keinem der beiden monoklonalen Antikörper. Die im Dot Blot beobachtete Kreuzreaktivität von 15B2 gegenüber rekombinantem Human-LIGHT präsentiert sich gleichermaßen im Western Blot. Interessanterweise erkennt auch Klon 9D10 linearisiertes, strukturverändertes Human-LIGHT.

4.1.3 Nachweis einer Immunkomplexbildung mittels Immunpräzipitation

Nach der Bestimmung der Affinität gegenüber immobilisierten Proteinen auf Membranen, sollte nun durch Immunpräzipitation untersucht werden, inwiefern die beiden monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper natives, rekombinantes Human- bzw. Maus-LIGHT in gelöster Form zu binden vermögen. Zur Immunpräzipitation (s. Abbildung 4) wurden Klon 9D10 bzw. 15B2 zu Lösungen jedes der beiden speziesspezifischen Proteine beigegeben und entstehende Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Protein-G Sepharose als Bindematrix präzipitiert. Negativkontrollen ohne Antikörperzusatz dienten der Prüfung einer unspezifischen Bindung der rekombinanten LIGHT-Proteine an Protein-G Sepharose. Die Analyse der Präzipitationsprodukte erfolgte per SDS-PAGE mit anschließender Immundetektion durch Anti-myc-Tag-Antikörper. Ausschließlich bei Ansätzen mit erfolgreich verlaufener Immunkomplexbildung sollte sich ein positives Signal am Film abzeichnen.

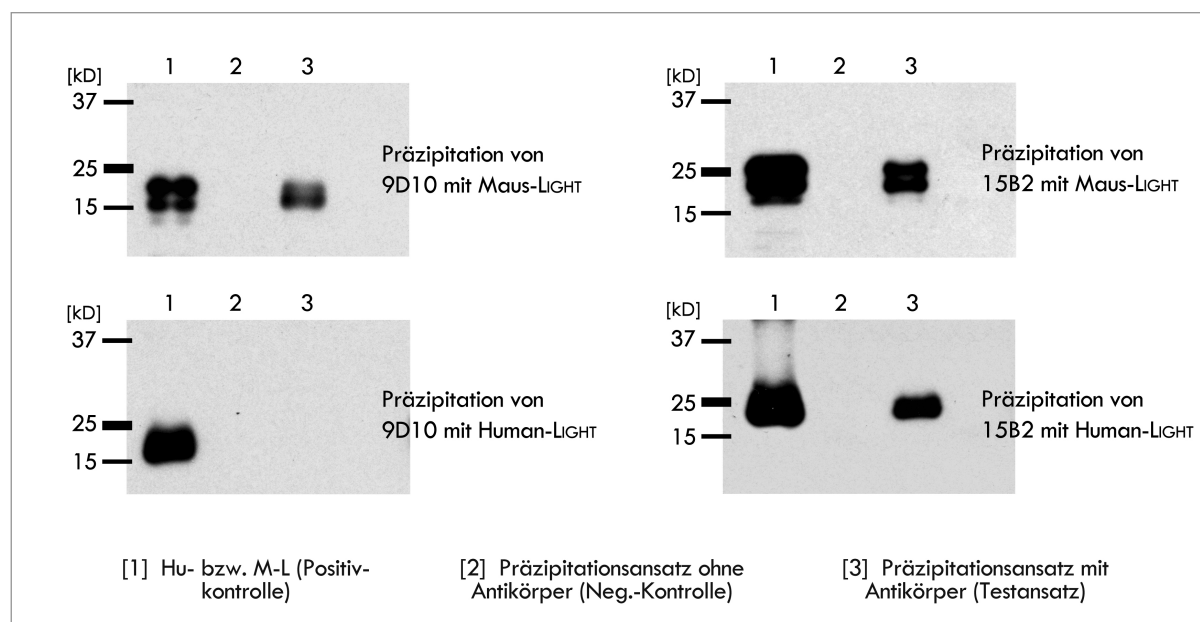


Abbildung 11. Immunpräzipitationen der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper mit Human- bzw. Maus-LIGHT.

links: 9D10 bildet mit Maus-LIGHT Komplexe – das Protein ist im Präzipitat nachweisbar; die Analyse des Ansatzes mit Human-LIGHT liefert kein Signal. *rechts:* 15B2 komplexiert beide LIGHT-Proteine – in den Präzipitaten gelingt der Nachweis von Maus- bzw. Human-LIGHT. Das Ausbleiben der Filmschwärzung in den Negativkontrollen spricht gegen unspezifische Anlagerung von LIGHT an die Präzipitationsmatrix.

Abbildung 11 zeigt linkerhand die Ergebnisse der Immunpräzipitation für Antikörper 9D10, auf der rechten Seite für 15B2. Bei allen vier Präzipitationsversuchen bleibt ein Signal in der Negativkontrolle aus, so dass eine unspezifische Bindung von rekombinantem Maus- bzw. Human-LIGHT an Protein-G Sepharose ausgeschlossen werden kann. Klon 9D10 erkennt natives, rekombinantes Maus-LIGHT, bindet jedoch kein humanes Protein – eine Signalbande fehlt. Antikörper 15B2 hingegen ist zur Bildung von Immunkomplexen mit Human- wie Maus-LIGHT fähig: die Immundetektion weist das entsprechende Protein im Präzipitat des jeweiligen Probeansatzes nach. Damit bestätigen sich die Ergebnisse aus dem Dot Blot.

4.2 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern und rekombinantem LIGHT

Verschiedene Schritte im Aufreinigungsprozess von monoklonalen Antikörpern bzw. von Maus-LIGHT wurden mit proteinchemischen Methoden auf ihren Erfolg hin geprüft und dokumentiert.

4.2.1 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper

Dot Blot Analysen mit Überständen aus den entsprechenden Hybridomzellkulturen wiesen eine effiziente Antikörperproduktion nach. So zeigten sich bei Immundetektionen von rekombinanten LIGHT-Proteinen – aufgetragen auf Nitrozellulosemembran – mit Hybridomüberständen der Klone 9D10 und 15B2 positive Signale auf dem Chemolumineszenzfilm (s. Abbildung 12).

Bei anschließender affinitätschromatographischer Aufreinigung bestätigte die Untersuchung der vier asservierten Eluatfraktionen im Polyacrylamidgel eine erfolgreiche Elution der an die Säulenmatrix gebundenen Antikörper. Nach elektrophoretischer Auftrennung der mit denaturierendem SDS-Puffer versetzten Proben erfolgte die Färbung des Gels in Coomassie-Lösung. Aus Abbildung 13 geht

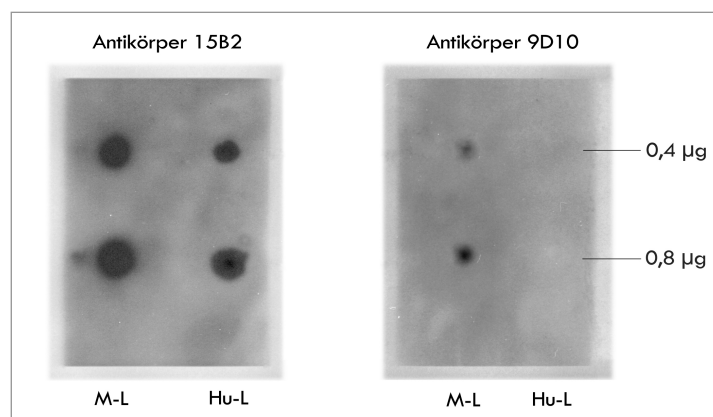


Abbildung 12. Dot Blot Untersuchungen mit Hybridomüberständen der Kulturen von 9D10 und 15B2. Die positiven Signale in der Immundetektion von LIGHT-Proteinen belegen eine effektive Antikörperproduktion der Zellen.

hervor, dass der Nachweis von schweren und leichten Antikörperkettens (Proteinbanden bei 50 kD und 25 kD) gleichermaßen für die Aufreinigung von 9D10 wie 15B2 gelingt. Farbeintensität und Größe der Gelbanden lassen zugleich eine semiquantitative Aussage bezüglich des Proteingehaltes der einzelnen Proben zu.

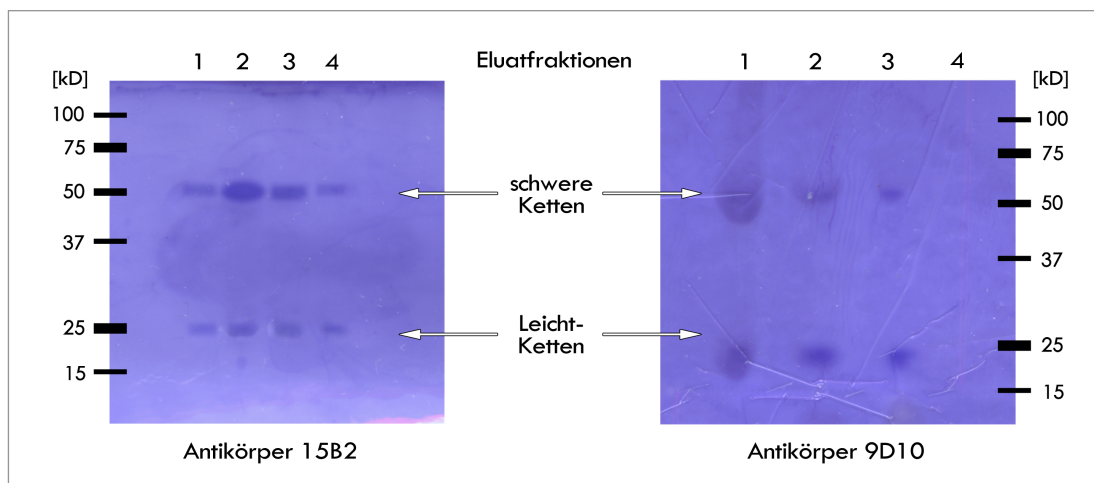


Abbildung 13. Analyse der Eluatfraktionen (1-4) aus den Antikörperaufreinigungen von 15B2 bzw. 9D10 durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Gele. Der Nachweis von schweren und leichten Ketten in den einzelnen Proben bestätigt eine erfolgreiche Elution. Eine semiquantitative Aussage über den jeweiligen Proteingehalt wird möglich.

4.2.2 Ergebnisse der Aufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT

Für die kompetitive, austauschchromatographische Aufreinigungstechnik von rekombinantem Maus-LIGHT ist die Evaluierung eines adäquaten Elutionsprotokolls entscheidend. Zwischen niedrig konzentriertem Imidazolpuffer zur Reinigung der Säule von unspezifisch angebundenen Peptiden und höher konzentrierten Imidazolösungen zur Ausspülung größerer Proteinaggregate vor der Säulenregeneration, gilt es den idealen Imidazolgehalt des Elutionspuffers zu finden, bei dem sich das Protein effektiv von der Matrix ablöst, um möglichst reine Fraktionen zu gewinnen.

In einer manuellen Aufreinigung wurden Puffer einer aufsteigenden Imidazolreihe (10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM und 250 mM Imidazol) auf Maus-LIGHT-beladene Chelating Sepharose gegeben. Die Ermittlung des jeweiligen Elutionsergebnisses geschah durch Prüfung der einzelnen Fraktionen auf Anwesenheit des rekombinanten Maus-LIGHT in Western Blot und Immundetektion mit Anti-myc-Tag-Antikörper.

Als optimal für die Aufreinigung erweist sich Elutionspuffer mit 100 mM Imidazol: am Chemo-lumineszenzfilm zeigt sich in der Laufzeile dieser Probe ein intensives Signal (vgl. Abbildung 14, Zeile 5). Die Filmschwärzung in Zeile 2 deutet auf eine relativ hohe Elutionsrate des Maus-LIGHT bei

einer Imidazolkonzentration von bereits 10 mmol/l im Puffer. Um Proteinverluste zu vermeiden, wurde daher für den Vorspülschritt bei der Aufreinigung an der HPLC-Anlage diese Konzentration auf die Hälfte reduziert. Zur abschließenden Reinigung und Regeneration erfolgte eine Spülung der Säule mit 250 mM Imidazollösung.

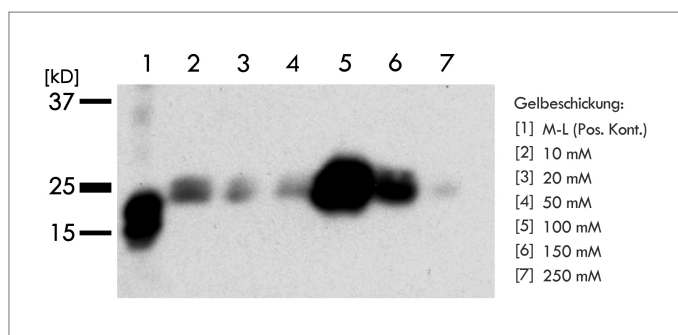


Abbildung 14. Austestung verschiedener Imidazolkonzentrationen für die Elution von Maus-LIGHT (Laufzeile 2 - 7). Die optimale Konzentration von Imidazol im Elutionspuffer liegt bei 100 mmol/l, wie das intensive Signal in der Immundetektion (Anti-myc-Tag-Antikörper) zeigt. In Laufzeile 1 ist Maus-LIGHT als Positivkontrolle aufgetragen.

Zum Nachweis der erfolgreichen Großaufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT an der EconoPump® Chromatographieranlage wurden Proben aus den gewonnenen sechs Eluatfraktionen per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit anschließender Immundetektion (Anti-His-Tag-Antikörper) untersucht (s. Abbildung 15). Die Elution des Proteins gelingt mit 100 mM Imidazolpuffer, wie die kräftigen Signale aus den Fraktionen 4 und 5 bestätigen. Aus den Vorspülschritten mit niedrigkonzentrierter Imidazollösung (5 mM) – Fraktionen 1 bis 3 – ist kein His-Tag-tragendes Protein nachweisbar. Zusammen mit dem geringen Signal der Probe aus der abschließenden Säulenreinigung (250 mM Imidazol, Fraktion 6) zeigt sich eine Anreicherung des gereinigten Maus-LIGHT in zwei Eluatfraktionen.

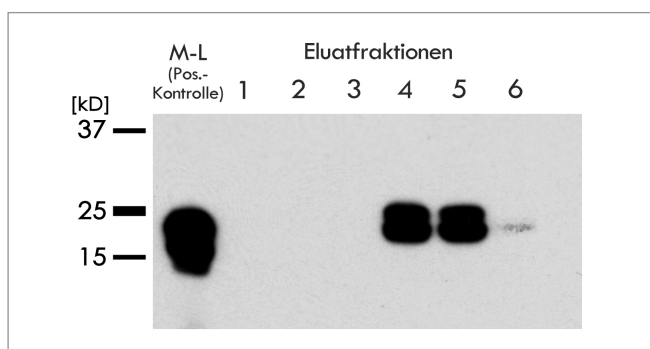


Abbildung 15. Ergebnis der Aufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT; Analyse des Eluats durch Immundetektion mit Anti-His-Tag-Antikörpern. Fast das gesamte Protein konzentriert sich in Fraktion 4 und 5. In Proben aus der Vorspülung der Säulenmatrix mit 5 mM Imidazol (Fraktionen 1 bis 3) ist kein LIGHT nachweisbar. Proteinverluste im abschließenden Regenerationsschritt sind gering (Fraktion 6).

4.3 Anti-Maus-LIGHT-Antikörper in Neutralisationsassays

Die bisherigen Versuche zielten allein auf die Evaluierung einer Bindungsfähigkeit von monoklonalem Antikörper 9D10 bzw. 15B2 mit Human- oder Maus-LIGHT. In nun folgenden zellbiologischen Stimulationsexperimenten sollte die Funktionalität dieser Antikörper, sprich ihr neutralisierendes Potential gegenüber LIGHT, *in vitro* geprüft werden.

Beide Klone wurden in entsprechenden Neutralisationsassays gegen Maus-LIGHT und das humane Ortholog untersucht. A-375 Zellen (menschliche Melanomzelllinie) erwiesen sich als geeignet für Assays mit Human-LIGHT: Stimulation über den auf ihrer Oberfläche exprimierten Human-LT β R resultiert in einer Sekretion von IL-8 in den Kulturüberstand (Hehlhans, 2001). Fibrosarkomzellen murinen Ursprungs hingegen (BFS-1), welche den Maus-LT β R exprimieren, produzieren bei Stimulation mit Maus-LIGHT MIP-2 und IL-6, hervorgerufen durch eine intrazelluläre Aktivierung des NF κ B-Signalwegs (Hehlhans, 2003).

Nachstehende Untersuchungen wurden für Klon 9D10 und 15B2 separat vollzogen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei voneinander unabhängige Durchführungen des Einzelexperiments.

4.3.1 Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit rekombinantem Maus-LIGHT

BFS-1 Zellen wurden auf Zellkulturplatten für 24 h inkubiert, wobei zum RPMI-Medium jedes Probeansatzes neben Maus-LIGHT unterschiedliche Mengen an Antikörper 9D10 oder 15B2 beigemischt waren. Anschließende Bestimmung der Konzentration von MIP-2 im abgenommenen Kulturüberstand erfolgte per ELISA im Triplikat.

Um die konstitutive Zytokinexpression im unstimulierten Zustand zu ermitteln, wurde Medium alleine auf die Zellen gegeben (Negativkontrolle). Die Stimulation der BFS-1 Zellen mit 15 μ g/ml rekombinantem Maus-LIGHT bzw. 5 μ g/ml agonistischem Anti-Maus-LT β R-Antikörper 5G11b diente als Positivkontrolle. Neben Maus-LIGHT (15 μ g/ml) enthielten die einzelnen Neutralisationsansätze unterschiedliche Konzentrationen an Antikörper 9D10 oder 15B2, gelöst in Nährmedium. Bei erfolgreicher funktioneller Inaktivierung von Maus-LIGHT, sollte die Erhöhung der MIP-2-Werte im Überstand am Ende umso geringer ausfallen.

Aus Diagramm 1 und Diagramm 2 geht hervor, dass im Assay mit 9D10 – gleichermaßen wie mit 15B2 – die Antikörperzugabe eine Verringerung der Zytokinexpression gegenüber den Kontrollstimulationen ohne Anti-Maus-LIGHT-Antikörper bewirkt. Gleichzeitig zeigt sich das Ausmaß des Rückgangs der MIP-2-Produktion abhängig von der Konzentration des zugesetzten Antikörpers.

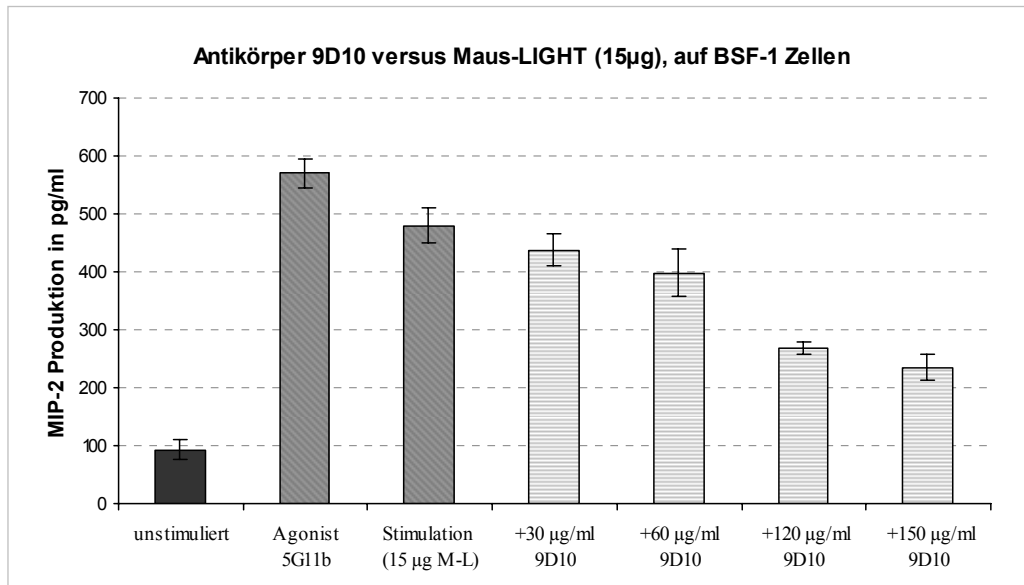


Diagramm 1. Stimulation von BFS-1 Zellen mit rekombinantem Maus-LIGHT (15 µg/ml) bzw. agonistisch am Maus-LTβR wirkendem Antikörper 5G11b (5 µg/ml) resultiert in einer starken Sekretion von MIP-2 in den Kulturüberstand. Der Stimulationserfolg fällt für rekombinantes Maus-LIGHT, welches mit unterschiedlichen Konzentrationen von Antikörper 9D10 vorinkubiert wurde (in RPMI-Medium, 2 h, 37°C) umso geringer aus. Darstellung von MW ± SD eines Neutralisationsexperimentes, repräsentativ für drei voneinander unabhängige Durchführungen.

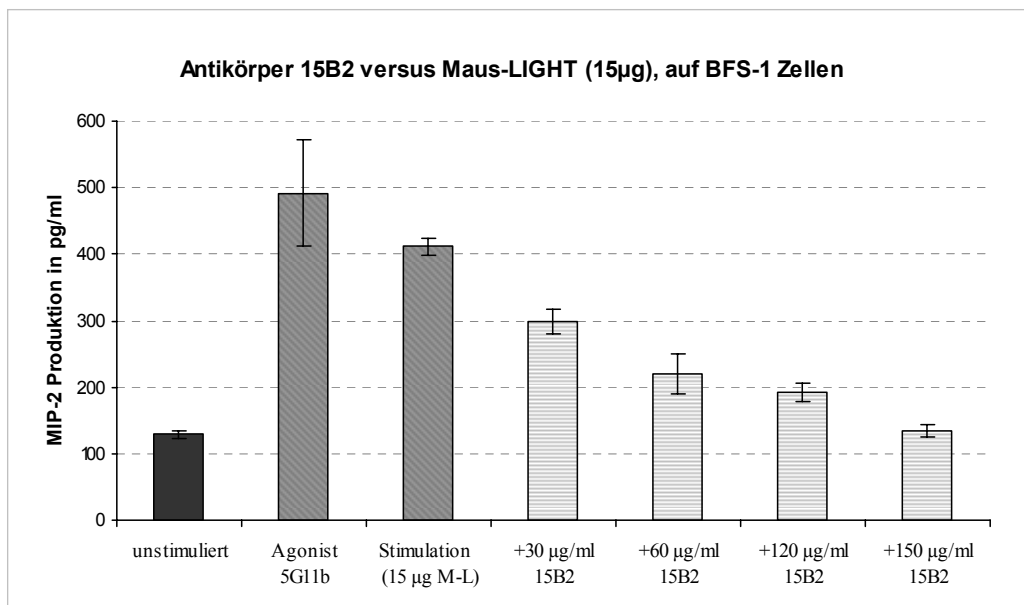


Diagramm 2. Neutralisationsassay für Antikörper 15B2 gegen rekombinantes, lösliches Maus-LIGHT auf BFS-1-Zellen. Antikörperzugabe bewirkt eine funktionelle Neutralisierung von Maus-LIGHT: die Sekretion von MIP-2 aus den Zellen sinkt mit steigender Antikörperkonzentration. Darstellung von MW ± SD eines Neutralisationsexperimentes, repräsentativ für drei voneinander unabhängige Durchführungen.

4.3.2 Ergebnisse der Neutralisationsversuche mit rekombinantem Human-LIGHT

Die Stimulationsexperimente mit Human-LIGHT erfolgten auf ausgesäten A-375 Zellen. Als Ausleseparameter galt hierbei die IL-8-Sekretion in den Kulturüberstand nach 24-stündiger Inkubation der verschiedenen Probeansätze. Ähnlich den Neutralisationsassays mit Maus-LIGHT wurden Zellen zur Ausmessung der basalen Zytokinsekretion unstimuliert belassen und mit frischem Medium allein versorgt. Neutralisations- und Stimulationsansätze enthielten je 10 µg/ml rekombinantes, lösliches Human-LIGHT (in RPMI-Medium), wobei Ersteren zusätzlich Antikörper 9D10 oder 15B2 in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben wurde.

Verglichen mit den stimulansfreien Kontrollansätzen liegt die IL-8-Expression der Zellen bei Zugabe von rekombinantem, löslichem Human-LIGHT um mehr als das Dreifache höher. Eine Verringerung der Zytokinsekretion nach Antikörperzusatz gelingt ausschließlich mit Klon 15B2 (s. Diagramm 4). Antikörper 9D10 hingegen vermag es nicht, rekombinantes lösliches Human-LIGHT zu neutralisieren – auch bei hohen 9D10-Konzentrationen bleibt die Stimulation der Zellen bestehen, ein Rückgang der IL-8-Produktion bleibt aus (s. Diagramm 3). Die zuvor mit proteinchemischen Methoden gezeigte Kreuzreaktivität des Anti-Maus-LIGHT-Antikörpers 15B2 gegen das humane Ortholog wird mit diesem Versuch in ihrer biologischen Funktionalität bestätigt.

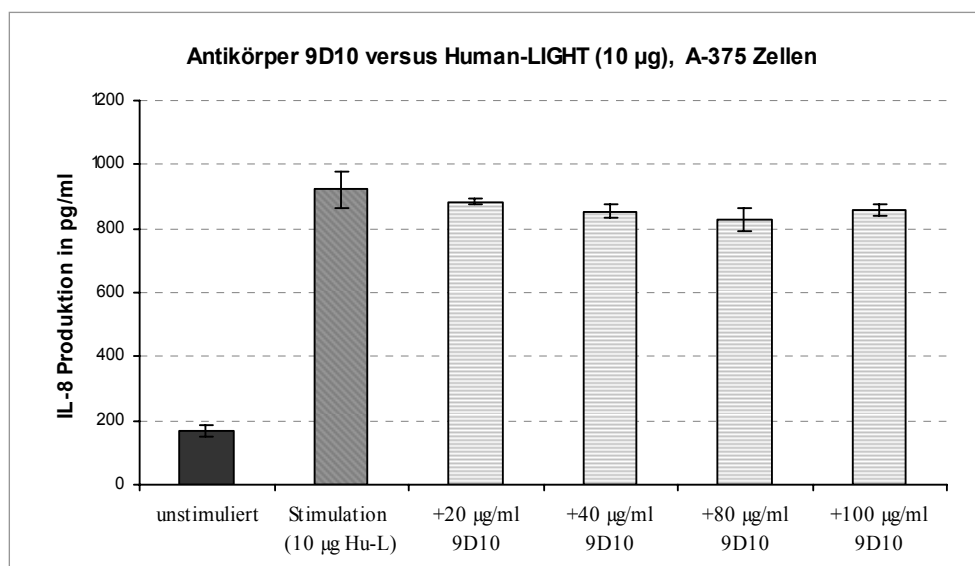


Diagramm 3. Neutralisationsassay für Klon 9D10 gegen rekombinantes, lösliches Human-LIGHT auf A-375-Zellen. Die Antikörperzugabe in den Neutralisationsansätzen führt auch in hohen Konzentrationen zu keiner Hemmung der IL-8-Produktion. Eine funktionelle Neutralisation von Human-LIGHT mit 9D10 gelingt nicht. Darstellung von MW \pm SD eines Neutralisationsexperimentes, repräsentativ für drei voneinander unabhängige Durchführungen.

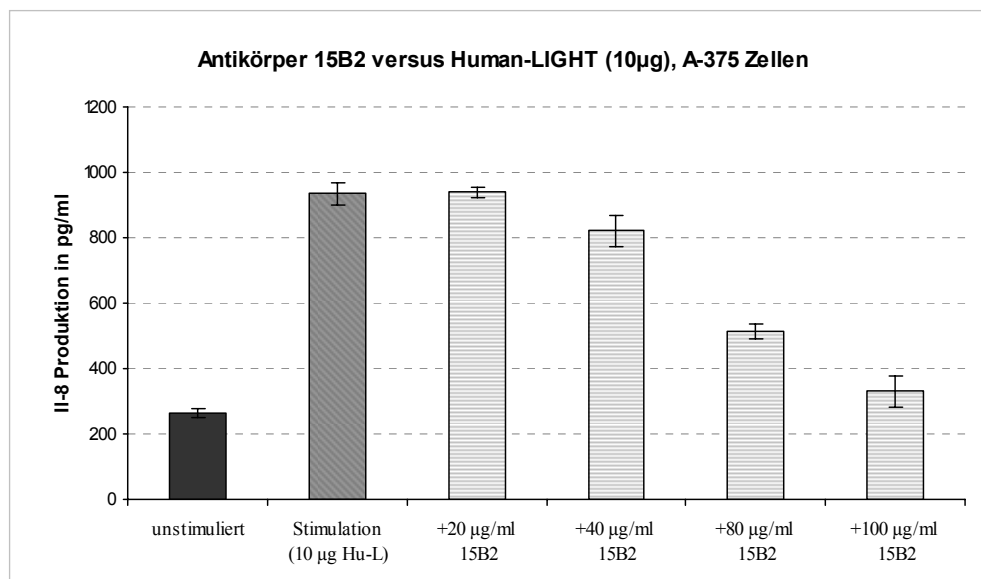


Diagramm 4. Neutralisationsassay für Klon 15B2 gegen rekombinantes, lösliches Human-LIGHT auf A-375-Zellen. Die verminderte Zellstimulation in Neutralisationsansätzen (Balken 4-6) ist mit der Aufhebung der LIGHT-Wirkung durch Antikörperbindung erklärbar. Die in vorausstehenden Versuchen gefundene Kreuzreaktivität von Klon 15B2 erweist sich als biologisch funktionell. Darstellung von MW \pm SD eines Neutralisationsexperimentes, repräsentativ für drei voneinander unabhängige Durchführungen.

4.4 Durchflusszytometrische Antikörpercharakterisierung

Im Mittelpunkt der durchflusszytometrischen Untersuchungen stand die Evaluation der Bindungsfähigkeit der hergestellten, monoklonalen Antikörper 9D10 und 15B2 gegen membrangebundenes, auf der Oberfläche von Zellen exprimiertes Maus-LIGHT.

4.4.1 FACS-Analysen der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper auf stimulierten Milzzellen

Aktivierte T-Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen können während einer Immunreaktion oder nach Stimulation *in vitro* Maus-LIGHT auf ihrer Zellmembran exprimieren (Kim, 2005; Mauri, 1998). Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper gegen das endogene Protein wurden Primärzellen – isoliert aus Milzen einer Wildtyp- bzw. LIGHT-knockout-Maus – mit variablen Konzentrationen von PMA und Ionomycin für 0 h, 6 h sowie 16 h stimuliert. Beide Substanzen bewirken eine Aktivierung von Immunzellen *in vitro* und induzieren eine LIGHT-Expression auf der Membranoberfläche. Bei humanen CD8-positiven T-Lymphozyten konnte nach Exposition gegenüber PMA und Ionomycin die Anwesenheit von Human-LIGHT auf den Zellen, wenn auch in geringen Mengen, nachgewiesen werden (Cohavy, 2005). Wegen ihres Unvermögens der Produktion von

LIGHT, dienen Zellen des LIGHT-defizienten Tieres als Negativkontrolle: damit könnte ein Nachweis der Spezifität der Antikörper erfolgen, sofern ausschließlich eine Bindung an T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen, nicht aber an solche aus LIGHT^{-/-}-Mäusen auftritt. Um Detektierbarkeit in den FACS-Analysen zu gewährleisten, wurden die monoklonalen Antikörper mit dem Farbstoff FITC konjugiert und zusammen mit weiteren T- und B-Zell-spezifischen Antikörpern (gegen CD3, CD4, CD8, B220) zur Differenzierung verschiedener Lymphozytenpopulationen auf die Zellen gegeben.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Versuchsergebnisse für FITC-gekoppelten Antikörper 9D10 und 15B2 auf Splenozyten der Wildtyp-Maus ohne Stimulation und nach vierstündiger Inkubation mit PMA plus Ionomycin (500 ng/ml und 5 ng/ml) im Vergleich. Die in den Dot-Plot Diagrammen dargestellte Zellpopulation kennzeichnet auf CD4 oder CD8 positiv gefärbte Zellen.

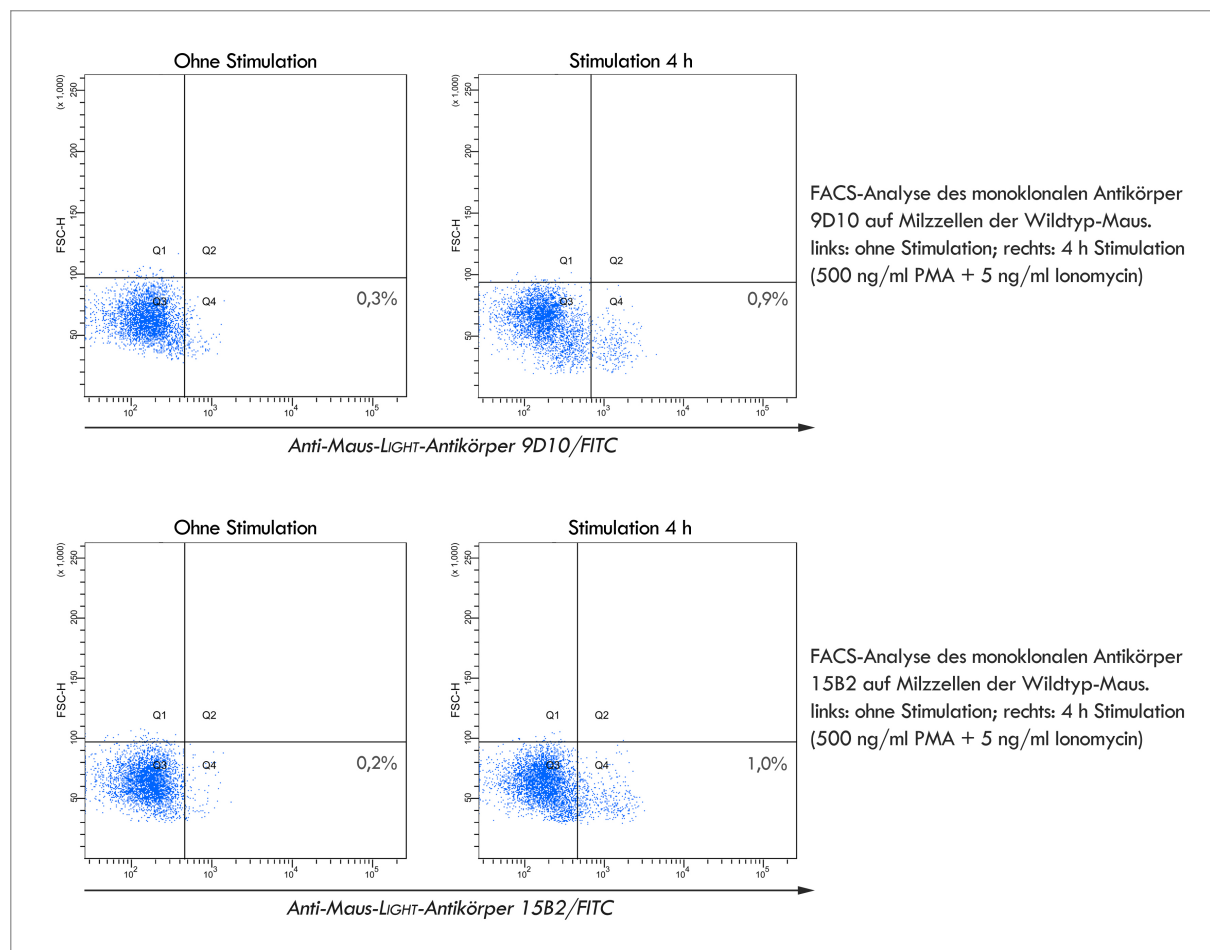


Abbildung 16. Dot-Plot Auftragungen der FACS-Analysen monoklonaler Anti-Maus-LIGHT-Antikörper auf Milzzellen einer Wildtyp-Maus. Weder für Antikörper 9D10 (oben) noch für 15B2 (unten) ergeben sich nach Zellstimulation merkliche Signalverschiebungen, die eine spezifische Antikörperbindung an die Zelloberfläche anzeigen würden. Die Zellpopulationen setzen sich aus Zellen mit positiver Färbung gegen CD4 oder CD8 zusammen.

Eine Signalveränderung im FITC-Messkanal (Rechtsverschiebung) bleibt in der Durchflusszytometrie stimulierter Zellen gegenüber den unstimulierten aus. Es lässt sich für keinen der beiden monoklonalen Antikörper eine spezifische Bindung an Wildtyp-Milzzellen bestätigen. Experimente mit veränderten Stimulationszeiten oder PMA/Ionomycin-Konzentrationen, gleichermaßen wie die Versuche mit Zellen des LIGHT-knockout-Tieres, führen zu Ergebnissen, kongruent denen in Abbildung 16 präsentierten. Sie werden daher nicht separat gezeigt.

Eine exakte Aussage über die Bindungsfähigkeit von 9D10 bzw. 15B2 gegen endogenes Maus-LIGHT ist mit dieser Analyse nur bedingt möglich, da unbekannt bleibt, in welchem Maße das Protein tatsächlich auf der Zelloberfläche präsent war. Weitere Austestung der Antikörper auf stabil mit rekombinantem Maus-LIGHT transfizierten CHO-Zellen sollte Klärung bringen.

4.4.2 FACS-Analysen der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper auf transfizierten CHO-Zellen

Eine Schwierigkeit der durchflusszytometrischen Detektionsversuche von Maus-LIGHT auf stimulierten Primärzellen mit 9D10/FITC oder 15B2/FITC stellt die Ungewissheit dar, welche Menge an Protein sich de facto auf der Zellmembran befindet. Es ist bekannt, dass stimulierte CD8-positive T-Lymphozyten LIGHT exprimieren, aber nur in geringen Maßen (Cohavy, 2005). Um dieses Problem zu umgehen, wurden CHO-Zellen stabil mit einem Vektor zur membranständigen Expression von Maus-LIGHT transfiziert und durch Inkubation mit antibiotikumhaltigem Nährmedium selektiert.

Vor der Austestung der monoklonalen Antikörper auf diesen Zellen sollte mit Hilfe eines LT β R/F_C-Fusionsproteins (Hehlgans, 2002a) die Anwesenheit des Mediators an der Oberfläche nachgewiesen werden. Liganden des LT β R sind zum Einen LIGHT, zum Anderen LT $\alpha_1\beta_2$, welches ausschließlich von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, exprimiert wird (Ware, 1992). Eine mögliche Bindung des LT β R/F_C an transfizierte CHO-Zellen kann daher allein durch rekombinant exprimiertes, membranständiges Maus-LIGHT vermittelt sein.

Abbildung 17 zeigt die FACS-Analyse mit Maus-LT β R/F_C und Anti-Human-IgG/PE als Detektionsantikörper. Gegenüber der Negativkontrolle ohne Fusionsproteinzugabe zeichnet sich eine merkliche Signalverschiebung im Ansatz mit Maus-LT β R/F_C ab. Maus-LIGHT ist demnach auf der Oberfläche der Zellen präsent.

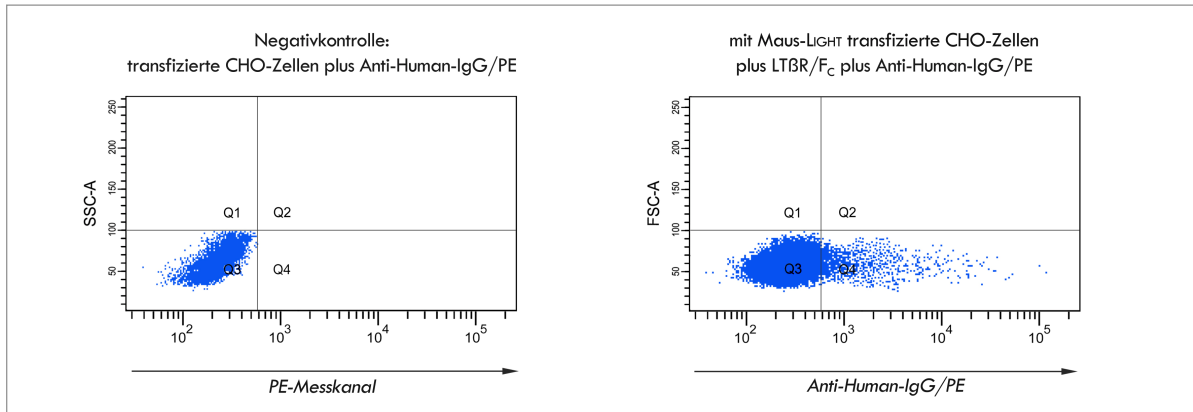


Abbildung 17. Dot-Plots zur FACS-Analyse der mit Maus-LIGHT-transfizierten CHO-Zellen. Die Detektion von LIGHT auf der Zellmembran erfolgte durch LTβR/F_c und Anti-Human-IgG/PE. Erhöhte Signalintensität im PE-Messkanal bei der Probe (rechts) gegenüber der Negativkontrolle ohne Fusionsprotein (links) bekräftigt die Expression von Maus-LIGHT auf der Zellmembran.

Im nächsten Schritt folgte die durchflusszytometrische Untersuchung der erfolgreich mit Maus-LIGHT transfizierten CHO-Zellen mit den FITC-konjugierten Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern (Dot-Plots s. Abbildung 18). Die ausbleibende Veränderung der Signalintensität im FITC-Detektionskanal beim Vergleich der Messergebnisse aus Negativkontrolle ohne Antikörperzusatz und den beiden Probeansätzen spricht gegen die Fähigkeit von Klon 9D10 und 15B2 membranständiges Maus-LIGHT zu binden.

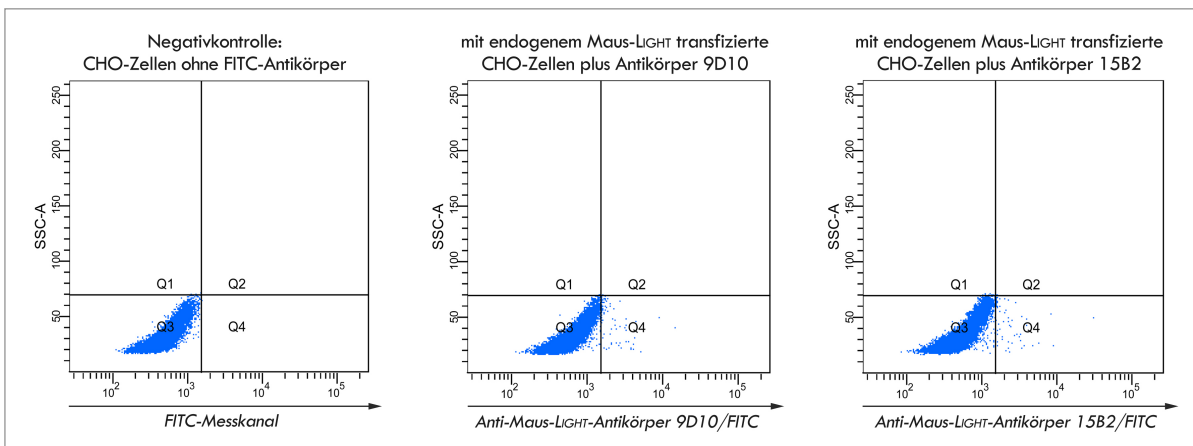


Abbildung 18. Ergebnisse der FACS-Analysen von FITC-markiertem Antikörper 9D10 bzw. 15B2 gegenüber LIGHT-exprimierenden CHO-Zellen im Dot-Plot-Diagramm. Verglichen mit der Negativkontrolle ergibt sich für keinen der Antikörperklone eine relevante Veränderung der Signalintensität im FITC-Messkanal. Eine Bindungsfähigkeit an membranständiges Maus-LIGHT ist nicht nachweisbar.

4.5 Effekte einer Behandlung mit Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis

Nachfolgende Experimente zielen auf die Untersuchung einer neutralisierenden Wirkung des mit Human-LIGHT kreuzreagierenden Anti-Maus-LIGHT-Antikörpers 15B2 *in vivo*. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass LIGHT-defiziente Mäuse nach Induktion einer akuten Colitis mit Dextran-sulfat-Natrium so gut wie keine Zeichen einer intestinalen Entzündung entwickeln (Jungbeck, 2006). Versuchstiere mit 15B2-Behandlung könnten daher im Falle erfolgreicher Hemmung der LIGHT-Aktivität eine verminderte intestinale Entzündungsreaktion im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis ausprägen.

Um dies zu überprüfen, wurde C57BL/6-Mäusen an den Tagen 1 bis 6 während Colitisinduktion (mit 1,1% DSS im Trinkwasser) 100 µg Antikörper 15B2 intraperitoneal injiziert. Tiere der Kontrollgruppe erhielten 100 µg IgG aus Mausserum. Die Beurteilung des Ausmaßes der intestinalen bzw. systemischen Entzündungsreaktion erfolgte durch Bestimmung des Gewichtsverlaufes über die sieben Versuchstage, durch Untersuchung der am Versuchsende gewonnenen Dickdarmpräparate (Längenmessung, Aktivitätsbestimmung von MPO und histologische Befundung) sowie durch Erstellung eines Zytokinexpressionsprofils aus isolierten Milzzellen.

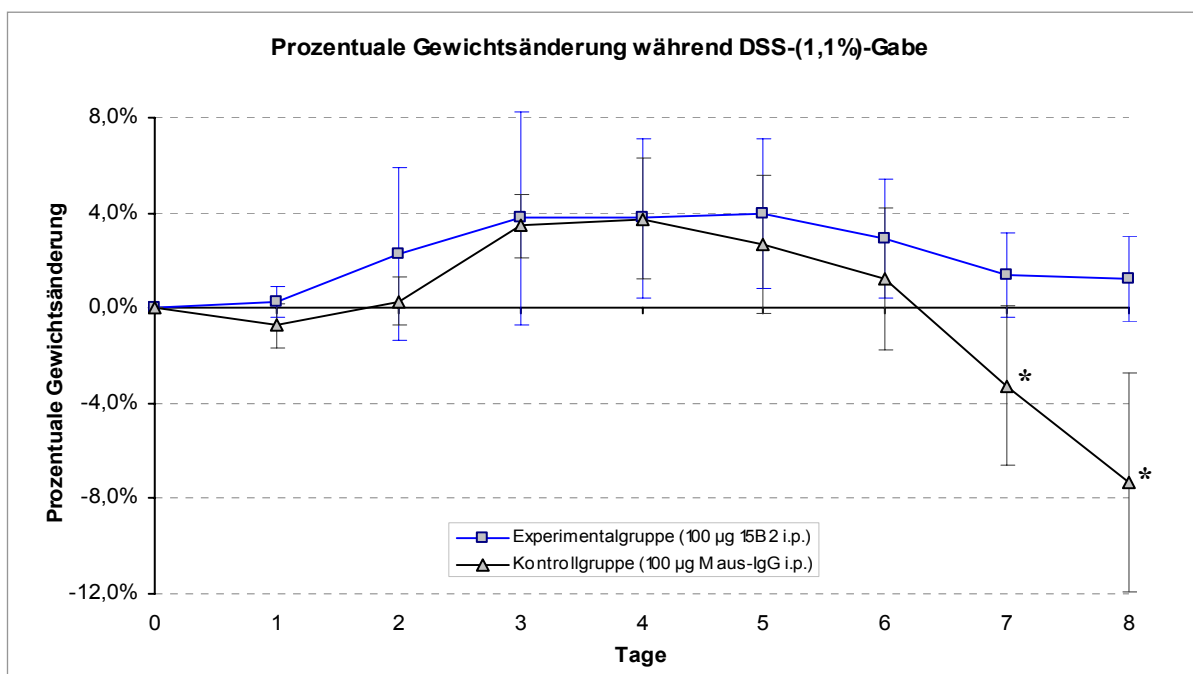


Diagramm 5. Gewichtsverlauf während akuter DSS-induzierter Colitis im Vergleich zwischen Experimentalgruppe mit Antikörperbehandlung (100 µg 15B2 i.p., n=5) und Kontrollgruppe (100 µg Maus-IgG i.p., n=5). Die Gewichtsänderung ist prozentual gegenüber den Ausgangswerten angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Punkte repräsentieren MW \pm SD. * $p < 0,05$

4.5.1 Gewichtsverlauf während der Versuchsdauer

Diarrhö und damit einhergehende Dehydratation führen zu Gewichtsverlust während akuter Colitis. Die Auswertung des Gewichtsverlaufes durch tägliches Wiegen der Versuchstiere ergibt daher einen indirekten Parameter der Entzündungsintensität. Verminderte Agilität, struppiges Fell und blutig tingierter Stuhl machten nach fünf Versuchstagen einen schlechteren Allgemeinzustand der Mäuse aus der Kontrollgruppe gegenüber den mit Antikörper 15B2 behandelten bereits ersichtlich.

Diagramm 5 zeigt die prozentuale Entwicklung des Körpergewichtes in den beiden Versuchsgruppen. Innerhalb von sieben Tagen verliert die Kontrollgruppe etwa 8% ihres Ausgangsgewichtes, während sich bei der Experimentalgruppe nach Antikörpergabe das durchschnittliche Körpergewicht ca. 1% über dem Anfangswert errechnet. Am Tag 7 sowie bei Versuchsende (Tag 8) zeichnen sich die Gewichtsunterschiede zwischen beiden Gruppen als signifikant ab.

4.5.2 Dickdarmlängenbestimmung

Einen einfach ermittelbaren Entzündungsparameter nach DSS-induzierter Colitis stellt die Länge des Dickdarms dar. Ödematöse Verquellung des kranken Colons führt zu einer messbaren Reduktion der Längenausdehnung am Resektat. Verglichen mit den Mäusen der 15B2-Behandlungsgruppe, zeigte sich bei den Tieren der Kontrollgruppe nach sieben Tagen DSS-Gabe ein signifikant verkürzter Dickdarm (s. Diagramm 6).

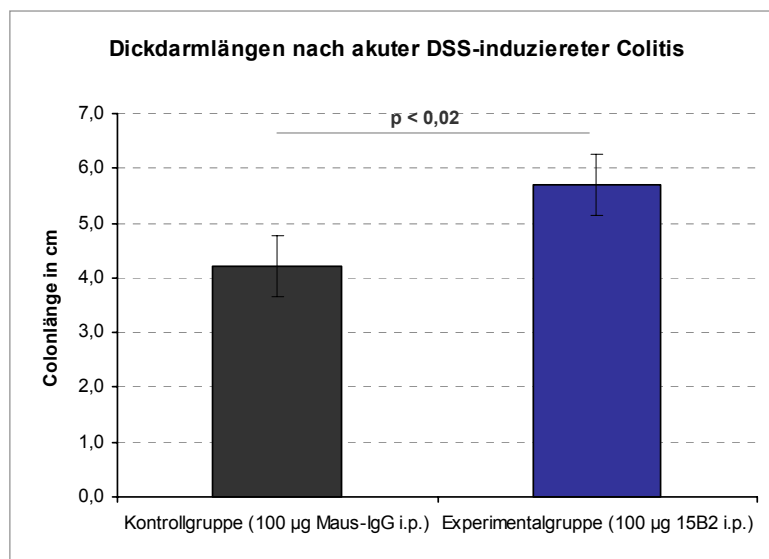


Diagramm 6. Bestimmung der Colonlänge nach DSS-induzierter Colitis. Ödeme und Schwellung führen in der Kontrollgruppe ohne Antikörperbehandlung zu einer signifikanten Darmverkürzung. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren MW \pm SD.

4.5.3 Histologischer Score

Die histologische Befundung von Darmpräparaten gestattet die genauesten Aussagen über den Schweregrad einer Colitis. Charakteristische Zeichen der Wandveränderung bei intestinaler Entzündung wie Kryptenverlust, Becherzelledepletion oder entzündliches Zellinfiltrat können im Gewebezusammenhang beurteilt werden.

Abbildung 19 zeigt repräsentative Gewebeschnitte aus dem distalen Colonabschnitt einer während DSS-Gabe mit 15B2 behandelten Maus im Vergleich zu einem Tier der Kontrollgruppe. Leukozytäre Invasion in *Lamina epithelialis* und *Lamina propria mucosae* bei voll erhaltener Schleimhautarchitektur spricht für eine leichtgradige Darmentzündung in der Experimentalgruppe. Bei unbehandelten Mäusen (s. Abbildung 19-B) hingegen präsentiert sich ein imposantes Bild einer schweren Colitis. Der typische Mukosabau aus hochprismatischem Enterozytenepithel mit Becherzellen in Kryptenformation und darunterliegender zarter *Lamina propria* weicht einem ungeformten, zellreichen, verbackenen Entzündungsinfiltrat aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten. Begutachtung der submukosalen Strukturen offenbart ein komplementäres Bild: allein in der Kontrollgruppe kommt es zu tiefen Infiltraten durch Immunzellen.

Der Histologische Score erfasst diese mikroskopisch beobachteten Gewebepathologien in statistisch verwertbarer Form. Der durchschnittliche Score-Wert von Tieren ohne Antikörperbehandlung differiert nach sieben Tagen DSS-Gabe um mehr als das Doppelte gegenüber der Experimentalgruppe (s. Diagramm 7). Applikation von 15B2 bewirkt eine histologisch nachweisbare Entzündungsänderung im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis.

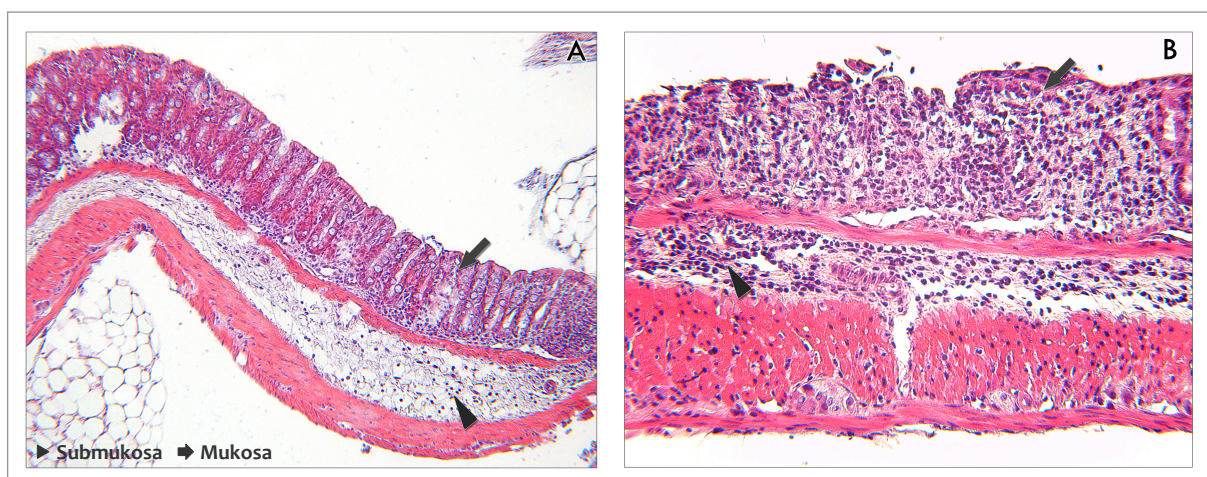


Abbildung 19. Repräsentative Darmgewebeschnitte nach akuter DSS-induzierter Colitis (Hämatoxylin-Eosin Färbung). **A)** Bei antikörperbehandelten Tieren bleibt die Epithelkonfiguration und Kryptenformation der Mukosa erhalten. Die Submukosa präsentiert sich ohne stärkeres Zellinfiltrat. (160x) **B)** Tiere der Kontrollgruppe zeigen Zeichen einer schweren Colitis: Intensive Durchsetzung der Mukosa mit entzündlichem Infiltrat verdrängt die Kryptenform von Epithel und Lamina propria. Auch die Submukosa ist stark entzündlich verändert. (200x)

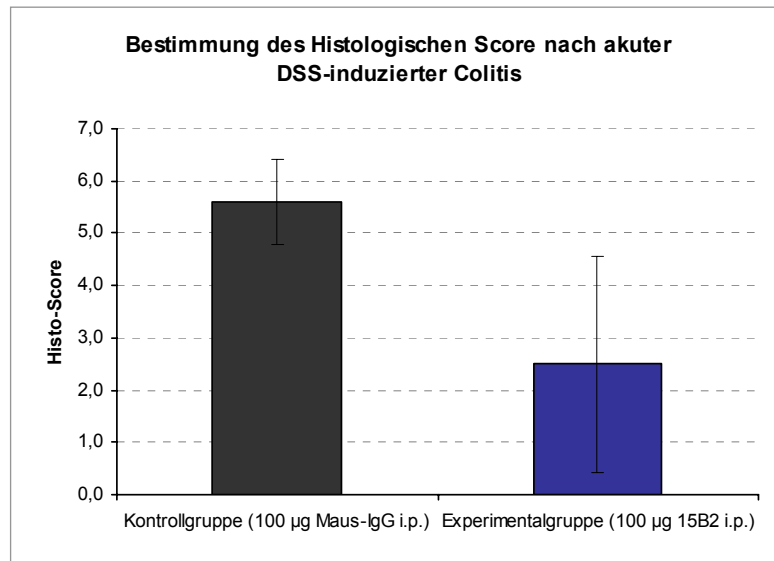


Diagramm 7. Vergleich des histologischen Scores beider Mausgruppen nach DSS-induzierter Colitis. Bestimmung aus Präparaten des distalen Colonabschnitts. Aufgrund eines statistischen Ausreißerwertes in der Experimentalgruppe verläuft die Signifikanztestung negativ. Die Balken repräsentieren MW ± SD.

4.5.4 Messung der Myeloperoxidaseaktivität

Im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten findet sich das Enzym Myeloperoxidase (MPO). Die Bestimmung der Aktivität von MPO aus Darmresektaten lässt eine Aussage über das Ausmaß entzündlicher Zellinfiltrate am kranken Colon zu.

Die Angabe der Messergebnisse erfolgt bei diesem Experiment in Form von Relativwerten mit der Einheit $[OD_{MPO}/g_{\text{Gesamtprotein}}]$ (kurz $[g^{-1}]$). Als Rechenvorschrift gilt die Korrelation der fotometrisch gemessenen Intensität einer MPO-vermittelten Farbreaktion (Bradley, 1982) aus einer Einzelgewebeprobe mit dem Gesamtproteingehalt des jeweiligen Gewebestückes.

Nach der Versuchswoche erwiesen sich signifikante Unterschiede des MPO-Gehaltes in Darmproben von Tieren der Kontroll- bzw. Experimentalgruppe (s. Diagramm 8). Behandlung mit Antikörper 15B2 während DSS-Verabreichung vermag demzufolge eine Granulozyteninvasion in die Darmwand zu minimieren.

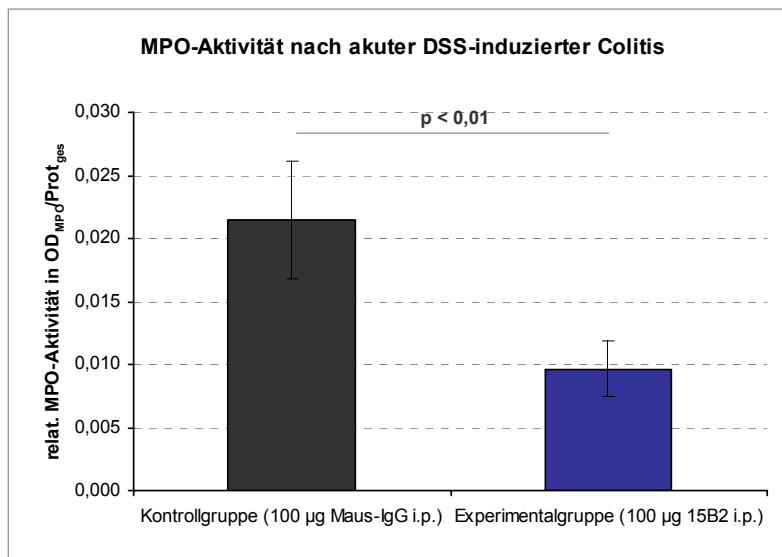


Diagramm 8. Vergleich der Myeloperoxidaseaktivität in Darmgewebeproben der Tiere beider Versuchsgruppen. Applikation von Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 15B2 führt zu einer signifikanten Reduktion der MPO-Aktivität in der Darmwand. Die Bestimmung der MPO-Farbreaktion und der Proteingesamtkonzentration für die Berechnung der relativen Enzymaktivität erfolgte jeweils im Triplikat. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren MW \pm SD.

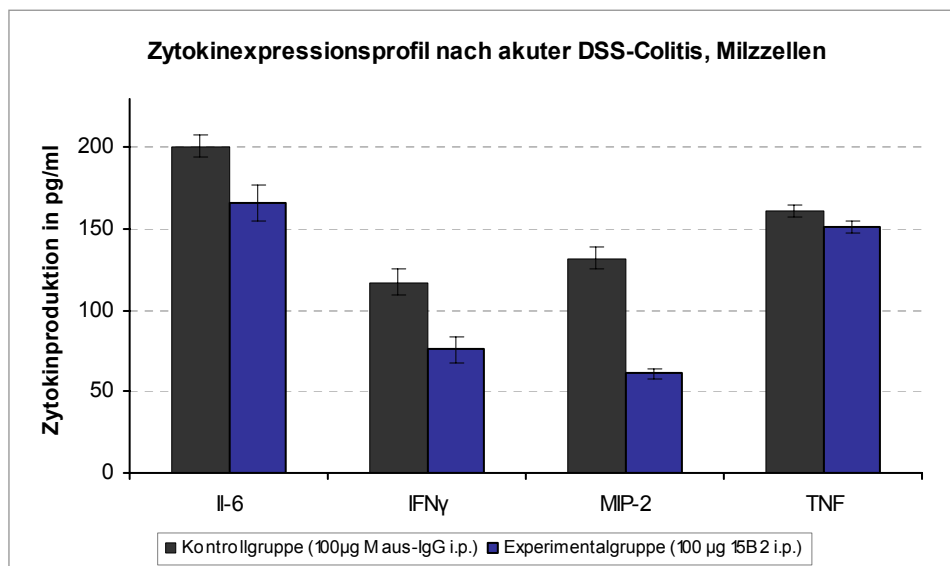


Diagramm 9. Expressionsprofil proinflammatorisch modulierender Zytokine aus Splenozyten nach DSS-induzierter Colitis. Die Konzentrationsbestimmung von IL-6, IFN- γ , MIP-2 und TNF erfolgte mittels ELISA (je im Triplikat) aus Zellkulturüberständen nach 24-stündiger Inkubation ohne Stimulation. Angabe des MW \pm SD.

4.5.5 Zytokinsekretion nach DSS-induzierter Colitis

Um ein umfassenderes Bild hinsichtlich des systemischen, immunologischen Status der Versuchstiere aus Experimental- und Kontrollgruppe nach akuter DSS-induzierter Colitis zu erhalten, wurde ein Zytokinexpressionsprofil aus isolierten Milzzellen erstellt. Eine erfolgreiche *in vivo* Neutralisation des proinflammatorischen Faktors LIGHT durch Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 15B2 könnte im Verlauf der Colitisinduktion ein verändertes Sekretionsmuster entzündungsfördernder Mediatoren aus Immunzellen im Organismus bedingen. Zur Untersuchung eines solchen Systemeffektes wurden Splenozyten aus den Versuchstieren isoliert und unstimuliert für 24 h inkubiert, um anschließend in den Kulturüberständen die Konzentrationen von Il-6, IFN- γ , MIP-2 und TNF per ELISA zu quantifizieren.

Die Ergebnisse sind in Diagramm 9 dargestellt. Im Vergleich zu Immunzellen aus Mäusen mit LIGHT-neutralisierender Behandlung produzieren Milzzellen der Kontrolltiere die ausgemessenen, für Entzündungsaktivität charakteristischen Zytokine im Übermaß. Besonders deutlich differieren hierbei die Sezernierung von IFN- γ und MIP-2 zwischen den Versuchsgruppen. Verabreichung von Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern führt im Modell der akuten DSS-Colitis folglich zu einer verminderten Freisetzung entzündungsunterstützender Botenstoffe aus der Milz. Systemische Auswirkungen der Darmentzündung im Sinne eines SIRS können durch diese reduzierte Zytokineinschwemmung in den Blutkreislauf milder ausfallen.

5. Diskussion

Den Strukturkomponenten der Tumornekrosefaktorsuperfamilie obliegt ein weites Spektrum der Regulation von Immunprozessen, reichend von Entzündungsgenese und Infektabwehr bis hin zu Gewebedestruktion und Defektbildung. Innerhalb der potenten TNFSF vermittelt das Lymphotoxin/LIGHT-Signalnetzwerk wichtige proinflammatorische Effekte. Die physiologische Bedeutung dieses Systems bei der Einleitung oder Verstärkung von Entzündungsreaktionen in von Pathogenen affiziertem Gewebe kehrt sich bei unkontrollierter Fehllenkung ins Gegenteil. Inadäquate Überexpression einzelner Mediatoren bzw. konstitutive Signaltransduktionsabläufe generieren schädigende Auswirkungen für den Organismus, fassbar in Form von SIRS oder Autoimmunerkrankungen (Hehlhans, 2005).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit Defekt im LIGHT-Gen verglichen zu Wildtyptieren im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis nur eine sehr milde Form der Darmentzündung ausprägen (Jungbeck, 2006). Diese Vorergebnisse verweisen auf die Bedeutsamkeit des LT/LIGHT-Signalnetzwerkes in der Entstehung intestinaler Entzündungsreaktionen. Inwiefern es möglich ist durch Eingriff in dieses TNF/TNFR-System mit monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern Entzündung zu vermeiden, wurde in vorliegender Arbeit evaluiert.

5.1 Charakterisierung und funktionelle Analyse der monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper

Die in den Experimenten verwendeten Klone 9D10 und 15B2 wurden gemäß Standard-Hybridomtechnik nach Immunisierung von LIGHT-defizienten Mäusen mit rekombinantem, löslichem Maus-LIGHT generiert. Um korrekte Aussagen bezüglich der Effekte einer Antikörperbehandlung im Versuch der akuten DSS-Colitis treffen zu können, ist eine exakte Austestung der Antikörpereigenschaften entscheidend. Zum Einen interessiert die Bindungsfähigkeit gegenüber LIGHT im löslichen bzw. membrangebundenen Zustand, zum Anderen die Analyse einer biologisch funktionellen Neutralisation des Zytokins durch Klon 9D10 bzw. 15B2. Das Augenmerk liegt gleichzeitig auf der Prüfung einer Kreuzreaktivität gegenüber dem humanen Ortholog von Maus-LIGHT. Da sich beide speziesspezifischen Proteinformen in ihrer Aminosäuresequenz zu 77% gleichen (Tamada, 2000b), ist die Überlegung verständlich, dass die von den Antikörpern erkannten Epitope bei Maus- und Human-LIGHT strukturell ähnlich ausgeprägt sein können.

Die Versuchsergebnisse aus Dot Blot und Immunpräzipitation zeigen, dass sowohl Klon 9D10 als auch 15B2 an rekombinant hergestelltes, lösliches Maus-LIGHT bindet. Ob fixiert auf Nitrocellulosemembran oder vollständig im wässrigen Puffermilieu – aufgrund der Abwesenheit reduzierender oder denaturierender Agenzien können die Antikörper bei beiden Techniken mit dem Protein in seiner natürlichen Struktur interagieren. Die Ergebnisse aus den zwei Experimenten erweisen sich als kongruent. Es ist hervorzuheben, dass Klon 15B2 zusätzlich spezifisch an rekombinant hergestelltes Human-LIGHT bindet. Die Kreuzreaktivität lässt vermuten, dass dieser Antikörper an ein Epitop bindet, welches bei den orthologen Proteinen konserviert zu sein scheint.

Die Western-Blot Analyse nach SDS-PAGE präsentiert ein verändertes Bild des Antikörperbindungsverhaltens. Während nun weder 9D10 noch 15B2 Maus-LIGHT erkennt, lässt sich für beide Klone eine Bindung mit Human-LIGHT nachweisen. Zu diskutieren ist dieses Ergebnis vorm Hintergrund der Proteindenaturierung im SDS-Polyacrylamidgel. Maus- und Human-LIGHT verlieren ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur durch Anlagerung der Dodecylsulfationen und wandern auf diese Weise linearisiert und mit maskierter Eigenladung im Gel Richtung Anode. Die denaturierten, strukturveränderten Peptide zeigen nun in der Immundetektion veränderte Wechselwirkungen mit dem primären Detektionsantikörper.

In *in vitro* Stimulationsexperimenten auf zellulärer Grundlage gelingt der Nachweis des funktionell neutralisierenden Charakters der beiden Antikörperklone. Bei Zugabe von 9D10 oder 15B2 zu Kulturansätzen von BFS-1 Zellen, die zusätzlich mit Maus-LIGHT versehen wurden, ergibt sich eine Verminderung der zytokinbedingten Zellstimulation, messbar an der Konzentration des in den Überstand sezernierten MIP-2. Ähnlich einer Titration ist dieser Effekt in Abhängigkeit der zugesetzten Antikörpermenge in einem gewissen Maße variabel.¹ Es lässt sich schlussfolgern, dass einerseits rekombinant hergestelltes Maus-LIGHT in löslicher Form BFS-1 Zellen zur MIP-2-Produktion anzuregen vermag (Hehlhans, 2003) und dass andererseits beide monoklonalen Antikörper zur funktionellen Neutralisierung von Maus-LIGHT *in vitro* im Stande sind.

Nachdem mittels vorausstehender, proteinchemischer Versuchstechniken die Bindung von 9D10 an Human-LIGHT ausgeschlossen worden war, bleibt erwartungsgemäß ein Neutralisationseffekt bei Antikörperzugabe zu humanen A-375 Zellen, welche mit Human-LIGHT stimuliert wurden, aus. Die bereits gezeigte Kreuzreaktivität von 15B2 gegenüber dem humanen Ortholog erweist sich im Neutralisationsassay als biologisch funktionell: der Stimulationseffekt des rekombinant hergestellten, löslichen Human-LIGHT auf A-375 Zellen (Hehlhans, 2001) wird durch Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 15B2 – abhängig von der zugegebenen Konzentration – antagonisiert, so dass die Induktion der Il-8

¹ Da ein Anti-Maus-LIGHT-Antikörper vom Typ IgG (ca. 150 kD Molekülmasse) insgesamt zwei LIGHT-Moleküle (je ca. 25 kD) binden kann, liegt das theoretisch optimale Massenverhältnis von Antigen zu Antikörper hier bei etwa 1:3. Zu beachten sind aber mannigfaltige, unspezifische Wechselwirkungen mit den Proteinzusätzen des Kulturmediums.

Sekretion in den Kulturüberstand abnimmt. Diese Fähigkeit zur funktionellen Interaktion mit beiden speziesspezifischen Proteinformen lenkt ganz besonderes Interesse auf Klon 15B2.

LIGHT fungiert als wichtiges kostimulatorisches Molekül bei T-Zell-Aktivierung bzw. T-Zell-Expansion und damit bei der Verstärkung von Entzündungsreaktionen. Membranständig exprimiert auf aktivierten T-Lymphozyten tritt es über HVEM in Wechselwirkung mit anderen Immunzellen. T-T-Zell Interaktionen werden damit möglich. Die Bindung an LT β R vermittelt gleichzeitig proinflammatorische oder apoptotische Stimuli ubiquitär im Gewebe (Wang, 2005; Ware, 2005). Da diese Signalübertragungsmechanismen insbesondere der membrangebundenen Form von LIGHT zugeschrieben werden (Wang, 2004), fiel bei der Charakterisierung der monoklonalen Antikörper Augenmerk auf die Bindungsfähigkeit gegenüber der membrangebundenen Form des Zytokins.

Die durchflusszytometrischen Austestungen von Klon 9D10 und 15B2 erfolgten zum Einen auf stimulierten Primärzellen (T-Lymphozyten) der Maus, zum Anderen auf stabil mit einem Vektor zur Expression von Maus-LIGHT transfizierten CHO-Zellen. Trotz positiver Prüfung der Anwesenheit von Maus-LIGHT auf der Oberfläche der CHO-Zellen per FACS-Analyse mit LT β R/F_C und Anti-Human-IgG/PE, bleibt ein Signal bei Zugabe von 9D10/FITC oder 15B2/FITC zu den Zellen aus. Eine spezifische Interaktion der Antikörper ist somit ausschließlich mit löslichem LIGHT möglich – im membranständigen Zustand wird Maus-LIGHT hingegen nicht erkannt. Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen Antikörpern und Antigenen auf Zelloberflächen verglichen mit der löslichen Form sind bekannt und biochemisch erklärlich. Zwar gleichen sich die Epitop-charakterisierenden Domänen beider Proteinzustände in ihrer Primärstruktur, intermolekulare Wechselwirkungen mit benachbarten Membranproteinen könnten aber ursächlich für eine Behinderung der Antikörperbindung sein – z.B. aufgrund diskreter räumlicher Veränderung am Extrazelluläranteil im Sinne einer ‚epitope-encryption‘.

Nach Abschluss dieser Experimente zur Antikörpercharakterisierung sollte speziell Klon 15B2 *in vivo* auf seine Effekte bei Applikation im Mausmodell der akuten DSS-induzierten Colitis geprüft werden. Die Bedeutung von LIGHT in diesem Tiermodell wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt. Im Gegensatz zu gesunden Tieren ergibt sich bei RT-PCR Untersuchungen von Darmgewebeproben aus Wildtyp-Mäusen nach DSS-Behandlung ein deutlich gesteigertes Expressionslevel für das Zytokin. Überdies prägen LIGHT-defiziente Mäuse trotz DSS-Gabe eine nur schwache intestinale Entzündungsreaktion aus (Jungbeck, 2006; Jungbeck, 2009).

DSS ist ein Polymer, welches den Tieren über das Trinkwasser verabreicht wird. Nach wenigen Tagen prägen die Mäuse eine Entzündung des Dickdarms mit Gewichtsverlust und blutiger Diarrhö aus (Okayasu, 1990). Das Detergens stört die intestinale Barrierefunktion. Folge des Integritätsverlustes der Epithelzellbarriere ist eine unkontrollierte Antigenstimulation des GALT, was in der akuten DSS-Colitis eine charakteristische, T-Zell-vermittelte, granulozytäre Immunreaktion bedingt

(Kitajima, 1999; Strober, 2002). In erster Linie kommt es zur verstärkten Expression von T_H1 -Zytokinen, wie IFN- γ , TNF und IL-1 (Egger, 2000). Vom immunologischen sowie histologischen Standpunkt her sind demnach Parallelen zwischen dieser Art der intestinalen Inflammation und der Entzündungsaktivität bei CED festzuhalten.

Bei histologischer Aufarbeitung zeigen sich im Infiltrat der *Lamina propria mucosae* vor allem Makrophagen, neutrophile Granulozyten sowie Lymphozyten. Es imponieren Epithelschädigungen mit Zerstörung der mukosalen Kryptenstruktur und Depletion der Becherzellen. Pathogenetisch entscheidend sind aktivierte Makrophagen, die DSS phagozytieren. Mit zunehmender DSS-Konzentration im Trinkwasser steigt der histologische Score als aussagekräftigster Beurteilungsparameter der Colitis an. Dabei ist nicht so sehr die absolute Menge an DSS-Wasser, welches eine Maus zu sich nimmt, ausschlaggebend, als die kontinuierliche Applikation während der gesamten Versuchsdauer (Egger, 2000).

Die Versuchsergebnisse bescheinigen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 15B2 Wirksamkeit *in vivo*. Die Intensität der intestinalen Entzündung fällt – gemessen an Gewichtsverlauf, darmspezifischen Parametern und Zytokinexpression aus Splenozyten – in der Experimentalgruppe nach i.p.-Applikation des Antikörpers signifikant geringer aus als in der Kontrollgruppe. Dies deutet hin auf die Möglichkeit der Neutralisierung des proinflammatorischen LIGHT durch 15B2 *in vivo*.

5.2 Die Rolle von membranungebundenem, löslichem LIGHT im Organismus

TNF, der zentrale Mediator von Entzündung, bedingt eine Hochregulation der Produktion von Proteasen, radikalen Sauerstoffspezies, vasoaktiven Komponenten, Adhäsionsmolekülen und anderer Zytokine. Das Typ-II Transmembranprotein mit intrazellulärem N-Terminus und Zytokinaktivität an der C-terminalen Ektodomäne wird auf Immunzellen exprimiert. ‚Tumor necrosis factor α converting enzyme‘ (TACE), eine Metalloproteinase, kann in einer für das Enzym charakteristischen proteolytischen Spaltung zwischen den Aminosäuren Alanin und Valin (Ala⁷⁶/Val⁷⁷) den extrazellulären Molekülanteil abtrennen. Eine ausschließliche Spezifität der Proteinase für TNF ist nicht gegeben: auch zahlreiche andere, für die Kommunikation auf zellulärer Ebene entscheidende, membran-gebundene Mediatoren werden durch TACE in die lösliche Form überführt (Black, 2003). Nach Abtrennung von der Zelloberfläche behält TNF seine biologische Funktion bei. Interessant ist die These, dass das Zytokin nur im freien, löslichen Zustand seine volle proinflammatorische Wirkung im Organismus erreichen kann. In zellgebundener Form wird eher die Vermittlung lokaler Signale für eine korrekte Ausprägung lymphoider Gewebsstrukturen diskutiert (Ruuls, 2001). Effekte von TNF

werden folglich einerseits durch Zell-Zell-Interaktionen vor Ort und andererseits mittels ‚ectodomain-shedding‘ über Organgrenzen hinweg im gesamten Organismus möglich.

Typischerweise handelt es sich auch bei LIGHT als Mitglied der TNFSF um ein Typ-II Transmembranprotein. In Molekülbau und Reaktionsverhalten sind klare Parallelen zu TNF zu erkennen. So findet sich in der Zytokinaktivität-tragenden Extrazellulärdomäne von membrangebundenem LIGHT ein Angriffspunkt für Metalloproteinasen wieder. Im Kulturüberstand einer 293T-Zelllinie, die mit der transmembranen Form des Proteins transfiziert worden war, gelang der Nachweis eines ca. 26 kD schweren Fragments, das dem apparenten Molekulargewicht von löslichem LIGHT entspricht. Eine noch unidentifizierte Furinprotease soll diese enzymatische Abspaltung von der Zelloberfläche bewerkstelligen (Ware, 2005), wobei das freigesetzte Molekül die Bindungsfähigkeit an seine Rezeptoren behält (Granger, 2001; Ware 2008). Welche Wirkungen LIGHT in den zwei Erscheinungsformen (membrangebunden versus gelöst) entwickeln kann, ist im Folgenden zu beleuchten.

Im membranständigen Zustand aggregieren – wie für Liganden des TNF-Systems charakteristisch – drei LIGHT-Moleküle zu einem nicht-kovalent gebundenen Homotrimer (Mauri, 1998). Bindung an HVEM in der Membran einer gegenüberliegenden Zelle induziert die Aneinanderlagerung dreier Rezeptoren, in deren Folge ein hexamerer Interaktionskomplex aus LIGHT-Homotrimer und drei HVEM-Molekülen entsteht (Bodmer, 2002; s. Abbildung 1). Der in mehreren Veröffentlichungen beschriebene kostimulatorische Effekt hinsichtlich T-Zell-Aktivierung und klonaler T-Zell-Expansion wird diesem Muster der membranabhängigen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zwischen LIGHT und HVEM zugeschrieben (Wan, 2002; Wang, 2004; Ware, 2008).

Unterstrichen wird die Bedeutsamkeit von Membran-LIGHT durch Untersuchung der Bindung von HVEM mit BTLA. Wie biophysikalische Analysen zeigen, tritt HVEM als monomerer Ligand mit BTLA auf T- bzw. B-Lymphozyten oder DCs im Verhältnis 1:1 in Kontakt. Für die Immunzellen entstehen aus dieser Interaktion inhibierende Effekte – speziell im Falle der T-Zellen aufgrund einer Verminderung der T-Zell-Rezeptoraktivität (Murphy, 2006). Diesen konstitutiven ‚Off-Signalweg‘ der Immuneffektoren vermag ausschließlich LIGHT in membrangebundener Form aufzuheben. Zwar bindet auch lösliches LIGHT hochaffin an den BTLA-HVEM-Komplex – die Trennung der beiden Komplexpartner oder eine Trimerisierung von HVEM, wie sie für intrazelluläre Signalwirkungen nötig wäre, kommt jedoch nicht zu Stande (Cheung, 2005; Ware, 2008).

Dennoch ist LIGHT auch in freier, löslicher Form von großer biologischer Relevanz. In Zellstimulationsexperimenten – wie sie in dieser Arbeit Verwendung fanden – wird die erfolgreiche Aktivierung von Human-LT β R-tragenden A-375 Zellen durch rekombinantes, lösliches Human-LIGHT in Form einer gesteigerten Il-8 Expression in die Kulturüberstände messbar. Eine vergleichbare Beobachtung gilt für die Zugabe von rekombinantem, löslichem Maus-LIGHT zu Maus-LT β R-exprimierenden BFS-1 Zellen (Hehlhans, 2001; Hehlhans, 2003).

Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ermöglichen in dieser Hinsicht noch anschaulichere Aussagen. Verglichen mit Gewebeproben gesunder Menschen wird während des aktiven Schubs eines MC oder einer CU in quantitativen PCR-Analysen des entzündeten Darmgewebes eine signifikant erhöhte Transkription von LIGHT-mRNA detektiert (Wang, 2005). Gleichzeitig gelingt auf CD-4⁺ T_H1-Zellen, gewonnen aus Darmresektaten von CED-Patienten, der Nachweis einer Membranexpression von LIGHT (Cohavy, 2004). Interessanterweise fällt die Messung des LIGHT-Spiegels im Blutserum von Personen mit aktiver CED signifikant und durchschnittlich um das Vierfache höher aus als bei gesunden Probanden (Jungbeck, 2006). Eine Erklärung dafür könnte das proteolytische ‚Shedding‘ des Mediators von den Membranen aktivierter Lymphozyten im entzündeten Intestinaltrakt bieten. In der Tat geht die Stimulation bzw. Aktivierung von Immunzellen mit einer deutlichen Aktivitätssteigerung von TACE und vielen anderen Matrix-Metalloproteinasen einher (Black, 2003). Das chronische Entzündungsgeschehen bei MC und CU könnte daher als direkter Trigger für eine vermehrte Abspaltung proinflammatorischer Zytokine von der Zelloberfläche wirken. Bezüglich TNF wurde gezeigt, dass TACE ubiquitär in der Darmwand zur Expression kommt und insbesondere bei Colitis ulcerosa in deutlich erhöhter Konzentration im Gewebe vorliegt. Synchron dazu fallen CED-Patienten durch eine gesteigerte Sekretion von TNF in den Organismus auf (Brynskov, 2002).

Es liegt die Vermutung nahe, dass LIGHT *in vivo* – ähnlich TNF – durch ‚ectodomain-shedding‘ über Furinproteasen aus Entzündungsherden freigesetzt und in den Körper eingeschwemmt werden kann. Proinflammatorische Effekte von löslichem LIGHT werden dann über Organgrenzen hinweg denkbar, bis hin zu disseminierten Entzündungsreaktionen in Form von SIRS. Die Ergebnisse aus dem Tierversuch zur DSS-induzierten Colitis unterstreichen die Wichtigkeit von LIGHT in löslicher Form für inflammatorisches Geschehen. Obwohl die Bindungscharakterisierung des monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörpers 15B2 eine Interaktion mit membrangebundenem LIGHT ausschließt, führt dessen Applikation während Colitisinduktion zu einer deutlichen Abmilderung der intestinalen Entzündung. Diese antiinflammatorische Wirkung einer spezifischen Antagonisierung allein von löslichem LIGHT betont die Bedeutung des Mediators im zellungebundenen Zustand.

Welcher Rezeptor dabei in die Signalübermittlung auf Immunzellen involviert ist, kann nur spekuliert werden. Bindungsanalysen zu Folge scheint die Inaktivierung einer HVEM/BTLA-Interaktion durch lösliches LIGHT nicht möglich: es kommt zwar zur Anlagerung des Zytokins an den Komplex, eine Trennung von HVEM/BTLA bzw. eine Rezeptortrimerisierung, wie sie für die funktionelle Bindung von LIGHT wichtig wäre, bleibt jedoch aus (Cheung, 2005; Ware, 2008). Dennoch weisen *in vitro* Stimulationsexperimente mit Monozyten und Neutrophilen auf die Fähigkeit von rekombinantem, löslichem LIGHT hin, diese Immunzellen über HVEM zur Pathogenabwehr anzuregen (Heo, 2006).

Eine Signaltransduktion nach Wechselwirkung von löslichem LIGHT mit dem LT β R ist ebenfalls denkbar. Stöchiometrische Untersuchungen zur Ligand-Rezeptor Wechselwirkung von LIGHT und LT β R zeigen einen Bruch mit dem Paradigma einer Trimerisierung interagierender Strukturen, wie für Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie sonst typisch. Eine biologisch funktionelle Bindung im Verhältnis 3:2, wobei ein LIGHT-Homotrimer mit lediglich zwei LT β R-Molekülen in Kontakt tritt, scheint möglich. Auch die löslichen LIGHT-Trimere prägen gegenüber LT β R exakt dieses Bindungsmuster aus (Eldredge, 2006). Die Bedeutung der LT β R-vermittelten Signalwege wird dadurch betont, dass für die Ausprägung des Vollbilds der intestinalen Entzündung im Versuch mit LIGHT-transgenen Mäusen beide Strukturen, HVEM und LT β R, anwesend sein müssen. LT β R-defiziente Tiere entwickeln nur milde Zeichen einer Inflammation (Wang, 2005).

Zukünftige wissenschaftliche Anstrengungen werden Licht in die Frage der Rezeptorinteraktionen von löslichem LIGHT bringen. Offensichtlich ist, dass der Mediator in beiden Zuständen – gebunden auf Zellmembranen oder frei im Organismus zirkulierend – einen großen Stellenwert in Entzündungsvorgängen besitzt.

5.3 Eine neue Therapieoption bei intestinalen Entzündungserkrankungen?

Die komplexe Organisation der Ligand-Rezeptor-Interaktionen stellt eine Möglichkeit der Steuerung proinflammatorischer oder entzündungsmildernder Effekte im TNF/TNFR-System dar. Mittels ‚ectodomain-shedding‘ von TNF-Liganden wie LIGHT oder auch TNF werden Entzündungsreaktionen fernab vom primären Herd denkbar. Es ist zudem vorstellbar, dass die proteolytische Abspaltung eines Mediators von der Zellmembran eine Modulation des inflammatorischen Prozesses vor Ort – infolge veränderter Rezeptorwechselwirkungen des löslichen Proteins – bedingt.

Ein weiterer, möglicher Regulationsmechanismus lässt sich auf Nukleinsäure-Ebene erkennen. RT-PCR Analysen zur LIGHT-Expression humaner T-Zell-Hybridome deuten auf die Existenz eines zweiten, etwa 100 Nukleotide kürzeren m-RNA Transkripts für das Protein hin. Als Produkt alternativen Splicings fehlt diesem abgewandelten m-RNA Transkript die Information zur Ausprägung der Transmembrandomäne. Da der Transport an die Zelloberfläche unterbleibt, kumuliert LIGHT aus abweichend gesplicter m-RNA im Zytoplasma (Granger, 2001). Eine solche alternativ intrazelluläre Form könnte als molekularer Mechanismus zur Verringerung der Expression des Mediators im membrangebundenen Zustand dienen und damit LIGHT-vermittelte Signalkaskaden limitieren.

LIGHT beeinflusst Entstehung und Intensität von Entzündungsreaktionen an der mukosalen Grenzfläche des Gastrointestinaltrakts. Seine Bedeutung in experimentellen Modellen der Colitis

lassen insbesondere Versuche mit transgenen Mäusen erkennen: eine konstitutive Expression von LIGHT auf T-Zellen dieser Tiere führt zu schwerer intestinaler Entzündung und Gewebedestruktion (Shaikh, 2001). Vice versa gelingt bei Applikation von LT β R/Fc in verschiedenen experimentellen Colitismodellen eine Verminderung der Entzündungsaktivität – bedingt durch eine Hemmung der LIGHT/HVEM-Interaktion (Mackay, 1998; An, 2005).

Klinisches Interesse erweckt diese Ligand-Rezeptor-Interaktion wegen ihrer Stellung in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Für Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa sind während des aktiven Schubs eine gesteigerte Transkriptionsrate des LIGHT-Gens (Wang, 2005), eine rasche und intensive Induzierbarkeit der LIGHT-Expression auf T-Zellen des Verdauungstrakts (Cohavy, 2004) sowie ein deutlich erhöhter LIGHT-Spiegel im Blutserum kennzeichnend (Jungbeck, 2006). Auffälligerweise fällt der Genlocus von LIGHT auf Chromosom 19p13 exakt in IBD-6, eine Suszeptibilitätsregion für CED im menschlichen Genom (Bonen, 2003). Untersuchungen anderer Suszeptibilitätsloci wie *CARD15* (alias NOD-2, auf Chromosom 16) zeigten, dass Patienten mit homozygoten Mutationen in diesen DNA-Abschnitten zur Ausprägung einer CED prädestiniert sind (Schreiber, 2007). Mit Blick auf den immunologischen Phänotypus der Entzündungsaktivität finden sich Parallelen zwischen der Colitis in Tiermodellen, die mit konstitutiver LIGHT-Expression einhergehen, und an Personen mit Morbus Crohn: beide Male kommt es zur Ausprägung einer T_H1-basierten, zytotoxischen Immunantwort (Wang, 2005; Cohavy, 2005).

Durch Induktion bzw. Verstärkung von Immunreaktionen kann LIGHT die Pathogenabwehr an der inneren Grenzfläche des Organismus unterstützen. Eine übermäßige, unkontrollierte Expression des Mediators und die damit verbundene Dauerstimulation nachgeschalteter, proinflammatorischer Signalkaskaden manifestieren sich dagegen in pathologischer, chronifizierender Entzündung. Gezielte Eingriffe in dieses Ligand-Rezeptor-System aus Lymphotoxin, LIGHT und BTLA, respektive den dazugehörigen Interaktionspartnern, bergen folglich das Potential neuer Therapiestrategien bei entzündlichen Darmerkrankungen.

Aufgrund der Komplexität dieses Netzwerkes sind therapeutische Angriffspunkte in mehrerer Hinsicht denkbar. Die extrazelluläre Position von Molekülen der TNF-Familie bietet insbesondere die Möglichkeit des Einsatzes von Biologika. Ihren erheblichen Stellenwert bei der Linderung von Entzündungssymptomen, welche assoziiert mit autoimmunologischen Prozessen auftreten, haben TNF-Inhibitoren vom Antikörpertypus (Infliximab) bzw. aus der Klasse der „Fangrezeptoren“ (Etanercept) bereits in der klinischen Praxis unter Beweis gestellt. LIGHT besitzt drei Wirkmechanismen: die Aktivierung von LT β R, die Aktivierung von HVEM und die Unterbrechung des hemmenden HVEM/BTLA Weges. Eine spezifische Blockade des proinflammatorischen Mediators wird demnach die Signaltransduktion über LT β R und HVEM ausschalten, während der immuninhibitorische Effekt einer HVEM/BTLA Interaktion sowie das für Homöostase und Mikroarchitektur

lymphatischen Gewebes wichtige $LT\alpha\beta$ -Signalling intakt bleiben. Da $LT\beta R/F_C$ als Decoy-Rezeptor neben LIGHT zusätzlich $LT\alpha_1\beta_2$ neutralisieren kann, sind im Falle einer therapeutischen Anwendung potentiell unerwünschte Nebeneffekte vorstellbar. Die inaktivierende Bindung ausschließlich von LIGHT durch monoklonale Antikörper erscheint daher vorteilhafter. Vorliegende Arbeit legt dar, dass die Antagonisierung des entzündungsfördernden Mediators in löslicher Form durch entsprechende Antikörper eine signifikante Besserung der Darmentzündung im experimentellen Modell der DSS-induzierten Colitis erzielt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der durch LIGHT vermittelten Signale im mukosalen Entzündungsprozess und weisen zugleich auf den Nutzen einer spezifischen Pharmakotherapie mittels Targeting involvierter Strukturen hin.

Abgesehen von antagonistischen Interventionen soll das Augenmerk auch auf mögliche agonistische Optionen der Einflussnahme auf dieses System fallen. Besonders interessant ist in diesem Kontext die physiologische, antiinflammatorische Wirkung einer Aktivierung des BTLA-Rezeptors auf Immunzellen. Bei $HVEM^{-/-} Rag^{-/-}$ Mäusen, welche in der Folge adoptiven Transfers $CD4$ -positiver $CD45RB^{high}$ T-Zellen eine Colitis ausprägen, lässt sich nach Applikation von agonistischem Anti-BTLA-Rezeptor-Antikörper eine histologisch signifikante Verringerung der Entzündungsintensität im Darm feststellen (Steinberg, 2008). Neben agonistischen Antikörpern ermöglicht HVEM als natürlicher Bindungspartner ebenfalls eine verstärkte Aktivierung des BTLA-Signalweges. Einem denkbaren, therapeutischen Einsatz von $HVEM/F_C$ Fusionsprotein gilt – aufgrund zweierlei inhibitorischer Wirkweisen – besondere Aufmerksamkeit: einerseits dient die Interaktion von $HVEM/F_C$ mit BTLA dem Aufrechterhalt des konstitutiven ‚off-Signalweges‘ der Immunzellen, andererseits kann das Fusionsprotein als spezifischer Fangrezeptor für LIGHT fungieren und so dessen entzündungsfördernden Effekt unterbrechen.

Die Signalübermittlung durch LIGHT/HVEM bzw. HVEM/BTLA präsentiert zusammenfassend ein eng verflochtenes System mit konträren physiologischen Wirkungen, die sich nur im korrekten Zusammenspiel positiv komplettieren können. Dies gilt es bei Überlegungen zu neuen Behandlungskonzepten, welche auf dieses Gefüge zielen, zu berücksichtigen.

Im Fokus dieser Dissertation stehen die Effekte und Mechanismen, die LIGHT bei der Genese intestinaler Entzündung – mit Schwerpunkt Colitis – vermittelt. Viele weitere immunologische Vorgänge im Organismus werden ebenfalls durch dieses TNF/TNFR-System beeinflusst oder gelenkt.

Ähnlich wie TNF nimmt LIGHT in verschiedenen Autoimmunerkrankungen, beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis, eine maßgebliche Rolle ein und führt zur Verstärkung des pathologischen Inflammationsgeschehens (Kim, 2005). Ferner agiert LIGHT als wichtige Stütze in der Virusabwehr: HSV-1 gebraucht HVEM als Eintrittspforte in die Zelle und verhindert durch Abbindung des Rezeptors mit gD des Virus-Envelope die Übertragung LIGHT-vermittelter kostimulatorischer Signale an

T-Lymphozyten. Eine effektive LIGHT/HVEM Interaktion vermag das Eindringen des Virus in Zellen zu unterbinden und ermöglicht parallel die Einleitung einer Immunabwehr (Cheung, 2005). Das Wirkspektrum von LIGHT ist noch breiter. Ein Schlüssel für erfolgreiche Krebstherapien könnte im Bruch der körpereigenen Toleranz gegen entartetes Gewebe liegen. Die Wiederherstellung einer Immunreaktion gegen maligne Zellen durch Expression von LIGHT im Tumor oder lokal im umgebenden Gewebe könnte helfen, eine aufgebaute pathologische Selbsttoleranz zu überwinden. In der Tat erweist sich das Mitglied aus der TNFSF im Tierversuch als essentiell bei der Einleitung einer zytotoxischen Immunantwort gegen Krebszellen (Yu, 2004).

Zytokinabhängige Inflammation und Gewebszerstörung sind Gemeinsamkeiten entzündlicher, nicht-infektiöser Systemerkrankungen. Zytokine sind integraler Bestandteil der physiologischen Abwehr von Pathogenen, der Tumorummunität und der Zellzyklusregulation. Andererseits sind sie an zentralen pathophysiologischen Vorgängen autoimmunologischer Erkrankungen beteiligt. Intensive Forschung über die letzten zwei Jahrzehnte identifizierte in diesem Zusammenhang zahlreiche potentielle therapeutische Zielstrukturen, von denen TNF in der Pharmakotherapie bereits genutzt wird. Mit der Modulation von LIGHT könnte zukünftig eine neue Therapiestrategie für Patienten mit zytokinbedingten Entzündungsreaktionen zur Verfügung stehen. Vor ca. 2000 Jahren fasste GALENOS VON PERGAMON seine Beobachtungen über φλεγμονή deskriptiv in fünf Kardinalzeichen. Mit der Entdeckung der Antibiotika vor 150 Jahren wurde Entzündung infektiöser Ätiologie erstmals effektiv behandelbar. Die heutige molekulare Erforschung autoimmunologischer Ursachen von Inflammation gilt als Hoffnungsträger für neue Optionen der Intervention, wenn der Körper sich selbst attackiert.

6. Zusammenfassung

HINTERGRUND Den Zytokinen der Tumornekrosefaktorsuperfamilie (TNFSF) obliegt in hohem Maße die Regulation entzündlicher Prozesse im Organismus. LIGHT, als unlängst charakterisiertes Mitglied dieses Systems, besitzt große Bedeutung in der Pathogenese von Entzündungsreaktionen, wie sie kennzeichnend für rheumatoide Arthritis oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind. In physiologischer Hinsicht erfüllt das proinflammatorisch wirkende LIGHT hauptsächlich Funktionen bei der Virusabwehr, der Apoptoseinduktion und der Aufrechterhaltung der mukosalen Immunhomöostase an der inneren Grenzfläche des Körpers. Wegen seiner pathophysiologischen Relevanz in fehlgelenkten Entzündungsreaktionen und der komplexen Steuermechanismen innerhalb eines eigenen Signalnetzwerkes zieht LIGHT das besondere Interesse der Zytokinforschung auf sich. LIGHT wird ausschließlich auf Leukozyten, vornehmlich auf aktivierten T-Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Ein nachgeschaltetes, verzweigtes System aus Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen reguliert die Intensität von Entzündungsreaktionen. Störungen dieses Signalnetzwerkes durch konstitutive Überexpression von LIGHT verursachen Inflammation, Gewebsdestruktion und Defektbildung. Folglich könnte spezifisches pharmakotherapeutisches Targeting von LIGHT als neue Behandlungsstrategie bei chronischen Entzündungserkrankungen erfolgreich sein.

METHODEN Die Untersuchung der Einflussnahme einer LIGHT-neutralisierenden Behandlung auf das Entzündungsgeschehen erfolgte im Maus-Modell der akuten DSS-induzierten Colitis. Für die Experimente standen zwei monoklonale Anti-Maus-LIGHT-Antikörper (9D10 und 15B2) zur Verfügung, welche gemäß Standardhybridomtechnik nach Immunisierung von LIGHT-defizienten Mäusen mit rekombinantem Maus-LIGHT generiert wurden. Bei der Charakterisierung der Antikörpereigenschaften lag besonderes Augenmerk auf der Bindungsanalyse gegenüber der Zielstruktur in löslicher sowie membrangebundener Form, auf der Austestung einer biologisch funktionellen Antagonisierung von LIGHT und auf der Evaluation einer Kreuzreaktivität mit dem humanen Ortholog des Proteins. Die Prüfung der Antikörperbindungsfähigkeit erfolgte mittels Dot Blot, Western Blot und Immunpräzipitation gegenüber dem Molekül im löslichen Zustand – sodann in durchflusszytometrischen Analysen mit LIGHT-exprimierenden Zellen gegenüber dem membranständigen Protein. Zur Untersuchung der Antikörperwirkung *in vivo* wurde bei weiblichen C57BL/6-Mäusen durch Beimischung von Dextran-Sulfat-Natrium (DSS) ins Trinkwasser über sieben Tage eine akute Darmentzündung induziert. Die LIGHT-Expression ist während der DSS-Colitis gesteigert. Über die Versuchsdauer hinweg wurde Tieren der Experimentalgruppe täglich Anti-LIGHT-Antikörper intraperitoneal injiziert – die Mäuse der Kontrollgruppe hingegen erhielten eine identische

Menge an IgG aus Mausserum. Der Vergleich der Entzündungsintensität zwischen den beiden Versuchsgruppen geschah anhand folgender fünf Parameter: 1) Gewichtsverlauf, 2) Colonlänge, 3) Histologischer Score, 4) Myeloperoxidase-Aktivität in der Darmwand und 5) Zytokinexpression aus Milzzellen.

ERGEBNISSE Wichtige Aussagen über Bindungsfähigkeit und Funktionalität liefert die Charakterisierung der Antikörper *in vitro*. Dot Blot und Immunpräzipitation bescheinigen die Bindung an rekombinantes, lösliches Maus-LIGHT. Klon 15B2 erweist sich hierbei zusätzlich spezifisch gegen das humane Ortholog. Durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe von transfizierten, Maus-LIGHT auf der Oberfläche exprimierenden Zellen bestätigen, dass eine Bindung der hergestellten Antikörper an das Zytokin im membrangebundenen Zustand nicht zu Stande kommt. Ihre LIGHT-neutralisierende Wirkung und damit biologische Funktionalität stellen beide Antikörperklone im zellbiologischen Stimulationsexperiment unter Beweis. Die Applikation von Antikörper 15B2 während Induktion der DSS-Colitis führt *in vivo* zu einer signifikant geringeren Entzündungsreaktion im Intestinum. Beim Vergleich der zwei Versuchsgruppen ergeben sich für Tiere, die keine Anti-LIGHT-Behandlung erhielten, deutlich negativere Ergebnisse bezüglich der zur Klassifikation der Erkrankungsschwere bestimmten Parameter. Eine verringerte Freisetzungsrates verschiedener proinflammatorischer Zytokine aus Milzzellen weist bei den Mäusen der Experimentalgruppe insbesondere auf eine schwächere systemische Entzündungsaktivität hin. Damit gelingt eine Linderung der Entzündungssymptomatik in akuter DSS-induzierter Colitis durch den monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 15B2.

SCHLUSSFOLGERUNG Spezifisches Targeting des proinflammatorischen Liganden aus der TNFSF, LIGHT, mit monoklonalen Antikörpern bewirkt eine signifikante Besserung der Entzündungsreaktion im Tiermodell der akuten DSS-induzierten Colitis. Dieser antiinflammatorische Behandlungseffekt präsentiert sich trotz des Unvermögens der verwendeten Antikörper das Zytokin in seiner membrangebundenen Form zu neutralisieren. Die Ergebnisse betonen die große Bedeutung von löslichem LIGHT bei der Ausbreitung akuter Entzündungsprozesse. Da sich unkontrollierte Expression von LIGHT als charakteristisch für autoreaktives Inflammationsgeschehen zeigt, könnten spezifische Eingriffe in dieses Signaltransduktionsnetzwerk zukünftig neue Therapieoptionen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eröffnen.

7. Verzeichnisse · Nachweise

7.1 Auflösung der Abkürzungen

Für Abkürzungen bezüglich in den Versuchen verwendeter, spezifischer Reagenzien oder Lösungen sei auf den Materialenteil (Punkt 2, S. 19 ff) verwiesen. Die Abkürzung der im Text verwendeten Zahleneinheiten erfolgt gemäß DIN1301.

ANCAs	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
BTLA	B- and T-Lymphocyte Attenuator
bzw.	beziehungsweise
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung(en)
CU	Colitis ulcerosa
d.h.	das heißt
DC	dendritic cell
DCR3	decoy receptor 3
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
evt.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell sorting
FDC	follicular dendritic cell
FSC	forward scatter
GALT	gut associated lymphatic tissue
gD	Glykoprotein D
HAT-Medium	Selektionsmedium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HPLC	high performance liquid chromatography

HPRT	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase
HSV	Herpes simplex Virus
Hu-L	Human-LIGHT
HVEM	Herpes virus entry mediator
i.p.	intraperitoneal
IBD	inflammatory bowel disease
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IVC	individual ventilated cage
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kD	Kilo-Dalton
LIGHT	homologous to Lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV gD for HVEM, a receptor expressed on T-cells (TNFSF14)
LP	Lamina propria mucosae
LT	Lymphotoxin
LTβR	Lymphotoxin-β Rezeptor
MC	Morbus Crohn
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
M-L	Maus-LIGHT
MPO	Myeloperoxidase

m-RNA	messenger ribonucleic acid	SIRS	systemic inflammatory response syndrome
NFκB	Nukleärer Faktor κB	sog.	so genannt
NKs	Natürliche Killerzellen	SSC	side scatter
NOD	nucleotide oligomerization domain	TACE	tumor necrosis factor-α converting enzyme
o.	oder	TLR	toll like receptor
OD	optische Dichte	TM-Domäne	Transmembrandomäne
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese	TNF	Tumornekrosefaktor (TNFSF2)
PECs	peritoneal exudates cells	TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
POX	Peroxidase	TNFSF	Tumornekrosefaktorsuperfamilie
PPs	Peyer Plaques	TRAF	TNF receptor associated factor
PRR	pattern recognition receptor	UV	ultraviolett
rcf	relative centrifugal force	v.a.	vor allem
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion	vgl.	vergleiche
s.	siehe	z.T.	zum Teil

7.2 Literaturverzeichnis

Ahmad, 2004

Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF (2004) Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* **126** (6), 1533-1549.

An, 2005

An MM, Fan KX, Zhang JD, Li HJ, Song SC, Liu BG, Gao PH, Zhou Q, Jiang YY (2005) Lymphotoxin beta receptor-Ig ameliorates TNBS-induced colitis via blocking LIGHT/HVEM signaling. *Pharmacol Res* **52** (3), 234-244.

Ashkenazi, 2002

Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2** (6), 420-430.

Bamias, 2007

Bamias G, Cominelli F (2007) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. *Curr Opin Gastroenterol* **23** (4), 365-369.

Bertazza, 2008

Bertazza L, Mocellin S (2008) Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci* **13**, 2736-2743.

Black, 2003

Black RA, Doedens JR, Mahimkar R, Johnson R, Guo L, Wallace A, Virca D, Eisenmann J, Slack J, Castner BJ, Sunnarborg SW, Lee DC, Cowling R, Jin G, Charrier K, Peschon JJ, Paxton RJ (2003) Substrate specificity and inducibility of TACE (tumor necrosis factor α -converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference and induced activity. *Biochem Soc Symp* **70**, 39-52.

Bodmer, 2002

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* **27** (1), 19-26.

Bonen, 2003

Bonen DK, Cho JH (2003) The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **124** (2), 521-536.

Bonifacino, 2001

Bonifacino JS, Dell'Angelica EC (2001) Immunoprecipitation. *Curr Protoc Cell Biol* **2**, Chapter 7.

Bradley, 1982

Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* **78** (3), 206-209.

Brynskov, 2002

Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, Saermark T (2002) Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **51** (1), 37-43.

Cheung, 2005

Cheung TC, Humphreys IR, Potter KG, Norris PS, Shumway HM, Tran BR, Patterson G, Jean-Jacques R, Yoon M, Spear PG, Murphy KM, Lurain NS, Benedict CA, Ware CF (2005) Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** (37), 13218-13223.

Cohavy, 2004

Cohavy O, Zhou J, Granger SW, Ware CF, Targan SR (2004) LIGHT expression by mucosal T cells may regulate IFN- γ expression in the intestine. *J Immunol* **173**, 251-258.

Cohavy, 2005

Cohavy O, Zhou J, Ware CF, Targan SR (2005) LIGHT is constitutively expressed on T and NK cells in the human gut and can be induced by CD2-mediated signaling. *J Immunol* **174** (2), 646-653.

Danese, 2006

Danese S, Fiocchi C (2006) Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* **12** (30), 4807-4812.

Dell'Angelica, 2001

Dell'Angelica EC, Bonifacino JS (2001) Staining proteins in gels. *Curr Protoc Cell Biol* **2**, Chapter 6.

Dempsey, 2003

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* **14** (3-4), 193-209.

Dücker, 2007

Dücker G, Lentze MJ (2007) Biologische Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. *Monatsschr Kinderheilkd* **115**, 118-126.

Egger, 2000

Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, and Buchler MW (2000) Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* **62** (4), 240-248.

Eldredge, 2006

Eldredge J, Berkowitz S, Corin AF, Day ES, Hayes D, Meier W, Strauch K, Zafari M, Tadi M, Farrington GK (2006) Stoichiometry of LTbetaR binding to LIGHT. *Biochemistry* **45** (33), 10117-10128.

Fava, 2003

Fava RA, Notidis E, Hunt J, Szanya V, Ratcliffe N, Ngam-Ek A, De Fougerolles AR, Sprague A, Browning JL (2003) A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* **171** (1), 115-126.

Forchielli, 2005

Forchielli ML, Walker WA (2005) The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* **93 Suppl 1**, 41-48.

Fuss, 2004

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W (2004) Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* **113** (10), 1490-1497.

Fütterer, 1998

Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K (1998) The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* **9** (1), 59-70.

Gommerman, 2003

Gommerman JL, Browning JL (2003) Lymphotoxin/Light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **3** (8), 642-655.

Granger, 2001

Granger SW, Butrovich KD, Houshmand P, Edwards WR, Ware CF (2001) Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13.3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis. *J Immunol* **167** (9), 5122-5128.

Gruss, 1996

Gruss HJ (1996) Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res* **26** (3), 143-159.

Harrop, 1998

Harrop JA, Reddy M, Dede K, Brigham-Burke M, Lyn S, Tan KB, Silverman C, Eichman C, DiPrinzio R, Spanpanato J, Porter T, Holmes S, Young PR, Truneh A (1998) Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J Immunol* **161** (4), 1786-1794.

Hauri, 1986

Hauri HP, Bucher K (1986) Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal Biochem* **159** (2), 386-389.

Heel, 1997

Heel KA, McCauley RD, Papadimitriou JM, Hall JC (1997) Review: Peyer's patches. *J Gastroenterol Hepatol* **12** (2), 122-136.

Hehlgers, 2001

Hehlgers T, Mannel DN (2001) Recombinant, soluble LIGHT (HVEM ligand) induces increased IL-8 secretion and growth arrest in A375 melanoma cells. *J Interferon Cytokine Res* **21** (5), 333-338.

Hehlgers, 2002a

Hehlgers T, Stoelcker B, Stopfer P, Muller P, Cernaianu G, Guba M, Steinbauer M, Nedospasov SA, Pfeffer K, Mannel DN (2002) Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer Res* **62** (14), 4034-4040.

Hehlgers, 2002b

Hehlgers T, Mannel DN (2002) The TNF-TNF receptor system. *Biol Chem* **383** (10), 1581-1585.

Hehlgers, 2003

Hehlgers T, Muller P, Stopfer P, Mannel DN (2003) Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NFkappaB-dependent interleukin-6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *Eur Cytokine Netw* **14** (2), 103-107.

Hehlgers, 2005

Hehlgers T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115** (1), 1-20.

Heo, 2006

Heo SK, Ju SA, Lee SC, Park SM, Choe SY, Kwon B, Kwon BS, Kim BS (2006) LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *J Leukoc Biol* **79** (2), 330-338.

Herbrink, 1982

Herbrink P, van Bussel FJ, Warnaar SO (1982) The antigen spot test (AST): a highly sensitive assay for the detection of antibodies. *J Immunol Methods* **48** (3), 293-298.

Hooper, 2002

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* **22**, 283-307.

Idriss, 2000

Idriss HT, Naismith JH (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* **50** (3), 184-195.

Jungbeck, 2006

Jungbeck M (2006) Aktivierung des Lymphotoxin- β -Rezeptors in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Disseratationsschrift, Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München.

Jungbeck, 2009

Jungbeck M, Daller B, Federhofer J, Wege AK, Wimmer N, Mannel DN, Hehlgers T (2009) Neutralization of LIGHT ameliorates acute dextran sodium sulphate-induced intestinal inflammation. *Immunology* **128**, 451-458.

Kim, 2005

Kim WJ, Kang YJ, Koh EM, Ahn KS, Cha HS, Lee WH (2005) LIGHT is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9 in macrophages. *Immunology* **114** (2), 272-279.

Kitajima, 1999

Kitajima S, Takuma S, Morimoto M (1999) Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* **48** (3), 137-143.

Koloski, 2008

Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G (2008) Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* **14** (2), 165-173.

Kruis, 2007

Kruis W, Herrlinger K, Stange EF (2007) Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.
in: Schölmerich J: *Medizinische Therapie 2007/2008*, 3. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 836-849.

Kwon, 1997

Kwon BS, Tan KB, Ni J, Oh KO, Lee ZH, Kim KK, Kim YJ, Wang S, Gentz R, Yu GL, Harrop J, Lyn SD, Silverman C, Porter TG, Truneh A, Young PR (1997) A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation.
J Biol Chem **272** (22), 14272-14276.

Laemmli, 1970

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.

Locksley, 2001

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104** (4), 487-501.

Loyet, 2005

Loyet KM, Ouyang W, Eaton DL, Stults JT (2005) Proteomic profiling of surface proteins on Th1 and Th2 cells.
J Proteome Res **4** (2), 400-409.

Mackay, 1998

Mackay F, Browning JL, Lawton P, Shah SA, Comiskey M, Bhan AK, Mizoguchi E, Terhorst C, Simpson SJ (1998) Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis.
Gastroenterology **115** (6), 1464-1475.

Mauri, 1998

Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, Ware CF (1998) LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* **8** (1), 21-30.

Monteleone, 2006

Monteleone G, Fina D, Caruso R, Pallone F (2006) New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **22** (4), 361-364.

Moore, 1974

Moore WE, Holdeman LV (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians.
Appl Microbiol **27** (5), 961-979.

Morel, 2000

Morel Y, Schiano de Colella JM, Harrop J, Deen KC, Holmes SD, Wattam TA, Khandekar SS, Truneh A, Sweet RW, Gastaut JA, Olive D, Costello RT (2000) Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor.
J Immunol **165** (8), 4397-4404.

Morel, 2001

Morel Y, Truneh A, Sweet RW, Olive D, Costello RT (2001) The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 Ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation. *J Immunol* **167**, 2479-2486.

Mowat, 1997

Mowat AM, Viney JL (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* **156**, 145-166.

Murphy, 1998

Murphy M, Walter BN, Pike-Nobile L, Fanger NA, Guyre PM, Browning JL, Ware CF, Epstein LB (1998) Expression of the lymphotoxin beta receptor on follicular stromal cells in human lymphoid tissues. *Cell Death Differ* **5** (6), 497-505.

Murphy, 2006

Murphy KM, Nelson CA, Sedy JR (2006) Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. *Nat Rev Immunol* **6** (9), 671-681.

Nikolaus, 2007

Nikolaus S, Schreiber S (2007) Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **133** (5), 1670-1689.

Nikolaus, 2008

Nikolaus S, Schreiber S (2008) Anti-TNF-Biologika in der Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. *Internist* **49**, 947-954.

Okayasu, 1990

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98** (3), 694-702.

Otsuki, 2006

Otsuki N, Kamimura Y, Hashiguchi M, Azuma M (2006) Expression and function of the B and T lymphocyte attenuator (BTLA/CD272) on human T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **344** (4), 1121-1127.

Pabst, 2006

Pabst R, Rothkötter HJ (2006) Structure and function of the gut mucosal immune system. *Adv Exp Med Biol* **579**, 1-14.

Peschon, 1998

Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281-1284.

Pezzutto, 2007

Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester GR (2007) Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Taschenatlas der Immunologie*, 2. Auflage, Thieme-Verlag Stuttgart, 226-227.

Rescigno, 2001

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2** (4), 361-367.

Rooney, 2000

Rooney IA, Butrovich KD, Glass AA, Borboroglu S, Benedict CA, Whitbeck JC, Cohen GH, Eisenberg RJ, Ware CF (2000) The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem* **275** (19), 14307-14315.

Rutgeerts, 2004

Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S (2004) Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **126** (6), 1593-1610.

Ruuls, 2001

Ruuls SR, Hoek RM, Ngo VN, McNeil T, Lucian LA, Janatpour MJ, Korner H, Scheerens H, Hessel EM, Cyster JG, McEvoy LM, Sedgwick JD (2001) Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* **15** (4), 533-543

Savage, 1977

Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**, 107-133.

Scheu, 2002

Scheu S, Alferink J, Potzel T, Barchet W, Kalinke U, Pfeffer K (2002) Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *J Exp Med* **195** (12), 1613-1624.

Schreiber, 2008

Schreiber S (2008) Chronisch-entzündliche Krankheiten: Von Krankheitsgenen zur genomischen Pathophysiologie. *Med Genetik* **19** (1), 5-9.

Sedy, 2005

Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, Scheu S, Pfeffer K, Ware CF, Murphy TL, Murphy KM (2005) B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat Immunol* **6** (1), 90-98.

Shih, 2008

Shih DQ, Targan SR (2008) Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14** (3), 390-400.

Spahn, 2004

Spahn TW, Kucharzik T (2004) Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* **53** (3), 456-465.

Steinberg, 2008

Steinberg MW, Turovskaya O, Shaikh RB, Kim G, McCole DF, Pfeffer K, Murphy KM, Ware CF, Kronenberg M (2008) A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J Exp Med* **205** (6), 1463-1476.

Strober, 2002

Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **20**, 495-549.

Strober, 2007

Strober W, Fuss I, Mannon P (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* **117** (3), 514-521.

Tamada, 2000a

Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, Zhu G, Sica G, Flies D, Boone T, Hsu H, Fu YX, Nagata S, Ni J, Chen L (2000) Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nat Med* **6** (3), 283-289.

Tamada, 2000b

Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, Zhai Y, Su J, Chen SF, Hsieh SL, Nagata S, Ni J, Chen L (2000) LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J Immunol* **164** (8), 4105-4110.

Tamada, 2002

Tamada K, Ni J, Zhu G, Fiscella M, Teng B, van Deursen JM, Chen L (2002) Cutting edge: selective impairment of CD8+ T cell function in mice lacking the TNF superfamily member LIGHT. *J Immunol* **168** (10), 4832-4835.

Tlaskalova-Hogenova, 2004

Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesova A (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* **93** (2-3), 97-108.

Towbin, 1989

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* **27** (8), 495-501.

Tumanov, 2003

Tumanov AV, Kuprash DV, Nedospasov SA (2003) The role of lymphotoxin in development and maintenance of secondary lymphoid tissues. *Cytokine Growth Factor Rev* **14** (3-4), 275-288.

Wan, 2002

Wan X, Zhang J, Luo H, Shi G, Kapnik E, Kim S, Kanakaraj P, Wu J (2002) A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells. *J Immunol* **169** (12), 6813-6821.

Wang, 2001

Wang J, Lo JC, Foster A, Yu P, Chen HM, Wang Y, Tamada K, Chen L, Fu YX (2001) The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J Clin Invest* **108** (12), 1771-1780.

Wang, 2003

Wang J, Fu YX (2003) LIGHT (a cellular ligand for herpes virus entry mediator and lymphotoxin receptor)-mediated thymocyte deletion is dependent on the interaction between TCR and MHC/self-peptide. *J Immunol* **170** (8), 3986-3993.

Wang, 2004a

Wang J, Fu YX (2004) The role of LIGHT in T cell-mediated immunity. *Immunol Res* **30** (2), 201-214.

Wang, 2004b

Wang J, Anders RA, Wu Q, Peng D, Cho JH, Sun Y, Karaliukas R, Kang HS, Turner JR, Fu YX (2004) Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy. *J Clin Invest* **113** (6), 826-835.

Wang, 2005

Wang J, Anders RA, Wang Y, Turner JR, Abraham C, Pfeiffer K, Fu YX (2005) The critical role of LIGHT in promoting intestinal inflammation and Crohn's disease. *J Immunol* **174** (12), 8173-8182.

Ware, 1992

Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewicz MJ, Browning JL (1992) Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* **149** (12), 3881-3888.

Ware, 1995

Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, Browning JL (1995) The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* **198**, 175-218.

Ware, 2005

Ware CF (2005) Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* **23**, 787-819.

Ware, 2008

Ware CF (2008) Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunol Rev* **223**, 186-201.

Weinstock, 2009

Weinstock JV, Elliott DE (2009) Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis* **15** (1), 128-133

Xavier, 2007

Xavier RJ, Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427-434.

Xu, 2007

Xu G, Liu D, Okwor I, Wang Y, Korner H, Kung SK, Fu YX, Uzonna JE (2007) LIGHT is critical for IL-12 production by dendritic cells, optimal CD4⁺ Th1 cell response, and resistance to *Leishmania major*. *J Immunol* **179** (10), 6901-6909.

Yu, 1999

Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS (1999) A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **274** (20), 13733-13736.

Yu, 2004

Yu P, Lee Y, Liu W, Chin RK, Wang J, Wang Y, Schietinger A, Philip M, Schreiber H, Fu YX (2004) Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. *Nat Immunol* **5** (2), 141-149.

Zhai, 1998

Zhai Y, Guo R, Hsu TL, Yu GL, Ni J, Kwon BS, Jiang GW, Lu J, Tan J, Ugustus M, Carter K, Rojas L, Zhu F, Lincoln C, Endress G, Xing L, Wang S, Oh KO, Gentz R, Ruben S, Lippman ME, Hsieh SL, Yang D (1998) LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/ HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J Clin Invest* **102** (6), 1142-1151.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Ligand-Rezeptor Interaktionen im Lymphotoxin/LIGHT-Signalnetzwerk. (modifiziert nach Murphy, 2006)
Abbildung 2	Histologische Schichtengliederung des Verdauungskanals und Feinbau der Darmschleimhaut. (modifiziert nach Pabst, 2006)
Abbildung 3	Zukünftig denkbare „biologische Therapieoptionen“ bei CED. Darstellung einer Auswahl von Biologika und deren Angriffspunkte im intestinalen Immungefüge. (modifiziert nach Düker, 2007)
Abbildung 4	Das Verfahren der Immunpräzipitation.
Abbildung 5	Standard-Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein.

Abbildung 6	Vergleich der Struktur von endogenem, membranständigem Human- bzw. Maus-LIGHT mit den rekombinanten, löslichen Proteinvarianten.
Abbildung 7	Das Verfahren der durchflusszytometrischen Untersuchung der monoklonalen Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 9D10/FITC und 15B2/FITC.
Abbildung 8	Übersicht zum Ablauf des Tierversuches zur Austestung von Anti-Maus-LIGHT-Antikörpern <i>in vivo</i> .
Abbildung 9	Dot Blot von Human- und Maus-LIGHT.
Abbildung 10	Untersuchung der Anti-Maus-LIGHT-Antikörper gegen Human- und Maus-LIGHT im Western Blot.
Abbildung 11	Immunpräzipitationen mit Anti-Maus-LIGHT-Antikörper 9D10 und 15B2 mit Human- bzw. Maus-LIGHT.
Abbildung 12	Dot Blot Untersuchungen mit Kulturüberständen der Hybridomzellkulturen von Klon 9D10 und 15B2.
Abbildung 13	Analyse der Eluatfraktionen aus den Antikörperaufreinigungen von 15B2 bzw. 9D10 durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Gele.
Abbildung 14	Austestung verschiedener Imidazolkonzentrationen für die Elution von Maus-LIGHT.
Abbildung 15	Ergebnis der Aufreinigung von rekombinantem Maus-LIGHT. Analyse des Eluats durch Immundetektion mit Anti-His-Tag-Antikörpern.
Abbildung 16	Dot-Plot Auftragungen der FACS-Analysen monoklonaler Anti-Maus-LIGHT-Antikörper auf Milzzellen einer Wildtyp-Maus.
Abbildung 17	Dot-Plots zur FACS-Analyse der mit Maus-LIGHT-transfizierten CHO-Zellen.
Abbildung 18	Ergebnisse der FACS-Analysen von FITC-markiertem Antikörper 9D10 bzw. 15B2 gegenüber LIGHT-exprimierenden CHO-Zellen als Dot-Plot.
Abbildung 19	Repräsentative Darmgewebeschnitte nach akuter DSS-induzierter Colitis (Hämatoxylin-Eosin Färbung).

7.4 Publikationen

Posterpräsentation

Jungbeck M, Daller B, Federhofer J, Pfeffer K, Männel DN, Hehlhans T (2007) Neutralization of LIGHT ameliorates DSS-induced intestinal inflammation.

Posterpräsentation auf der 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Heidelberg September 2007.

Wissenschaftlicher Journalartikel

Jungbeck M, Daller B, Federhofer J, Wege AK, Wimmer N, Männel DN, Hehlhans T (2009) Neutralization of LIGHT ameliorates acute dextran sodium sulphate-induced intestinal inflammation. *Immunology* **128**, 451-458.

7.5 Curriculum vitae

Vorname, Name	Josef, Federhofer
Geburtstag und -ort	30. Juni 1983 in Passau
Schulische Ausbildung	<p>1989 – 1993 Grundschule Haag–Wolkar</p> <p>1993 – 2002 Europäisches Gymnasium Leopoldinum Passau</p> <p>Juni 2002 Allgemeine Hochschulreife</p>
Studium	<p>Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg ab dem Wintersemester 2003</p> <p>September 2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</p> <p>November 2009 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</p> <p>Dezember 2009 Ärztliche Approbation</p>

Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an alle, die mir während der Tätigkeit im Labor und der Verfassung der Dissertation sachkundig zur Seite gestanden sind und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Immunologie für die freundliche Integration in ihr Team, die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft, die mir stets entgegengebracht wurde. Von einer namentlichen Nennung der helfenden Hände, auf deren Unterstützung jederzeit Verlass war, möchte ich absehen – sicherlich würde ich jemanden vergessen. Jeder und jedem einzelnen von ihnen gilt ein Dankeschön für das Engagement in meiner Forschungssache. Die angenehme, von gegenseitiger Einsatzbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre werde ich sehr vermissen.

Ganz herzlich danke ich meiner direkten Ansprechpartnerin im Labor und Helferin in jeder Lage, Frau Dr. rer. nat. Barbara Daller. Ohne ihre freundliche und unermüdliche Unterstützung wäre diese Arbeit wohl in anfänglichen Schwierigkeiten untergegangen. Was die Labortätigkeit anbelangt, ließ sie mich teilhaben an ihrem wertvollen, praktischen Erfahrungsschatz und zeigte mir zahlreiche Tipps und Tricks, die die Arbeit erleichterten.

Herrn Prof. Dr. Edward K. Geissler danke ich für die freundliche Erstellung des Zweitgutachtens zu dieser Arbeit.

Besonders großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hehlhans für die Überlassung dieses spannenden, brisanten Themas. Seine exzellente Betreuung während der zwei Entstehungsjahre, das immer motivierende und freundliche Arbeitsklima und seine stete Bereitschaft zur Klärung von Fragen oder etwaigen Problemen erleichterten das Gelingen dieser Arbeit ungemein. Vielen Dank für die vielen Gespräche und fruchtbaren Diskussionen aus denen kreative Ideen und Lösungen für den experimentellen Erfolg erwuchsen.

Regensburg im Dezember 2009

Josef Federhofer