

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Rolle der NK-Zellen in entzündlichen Darmerkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Fides Mouris

2013

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Rolle der NK-Zellen in entzündlichen Darmerkrankungen
Role of NK- cells in inflammatory bowel disease

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Verena Fides Mouris

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Fichtner-Feigl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Obermeier

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Ätiologie	4
1.1.3 Pathophysiologie.....	5
1.1.4 Therapie.....	7
1.2 DSS-Tiermodell für CED	10
1.2.1 C57BL/6 (Wildtyp).....	12
1.2.2 Rag1 ^{-/-}	12
1.2.3 Rag2 γ C ^{-/-}	13
1.3 Die NK-Zelle	13
1.3.1 Charakteristika von NK-Zellen	13
1.3.2 Reifung von NK-Zellen.....	14
1.3.3 Aktivierung und zytotoxische Funktion von NK-Zellen	15
1.4 Ziele der Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Geräte	17
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3 Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen	18
2.4 Kits	20
2.5 Puffer und Medien	20
2.6 Versuchstiere.....	22
2.7 Antikörper	22
2.8 Oligonukleotide/Primer	23
2.9 Software und Internetdienste.....	23

Inhaltsverzeichnis

3	Methoden	24
3.1	Tierexperimentelle Methoden	24
3.1.1	Mäuse & Tierhaltung	24
3.1.2	Induktion einer akuten und chronischen Kolitis mittels Dextran-Sulfat-Sodium (DSS).....	24
3.1.3	Gewichtsverlust.....	26
3.2	Histologische Methoden	26
3.2.1	Präparation der Kolonpräparate nach Organentnahme	26
3.2.2	HE-Färbung (Hämatoxylin/Eosin)	26
3.2.3	Histologischer Score	27
3.2.4	Immunhistochemie (IH) Ki-67.....	27
3.2.4.1	Immunfluoreszenzvariante Ki-67	28
3.2.5	Alcianblau-PAS-Färbung.....	29
3.3	Quantifizierung der Zytokinexpression	29
3.3.1	Ex-vivo-Kolon-Kultur	29
3.3.2	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	30
3.4	Zellbiologische Methoden.....	31
3.4.1	MACS-Sort/magnetische Sortierung von Nkp46-positiven Milzzellen ...	31
3.4.2	LPMC-Isolation	33
3.4.3	Durchflusszytometrie /FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)	35
3.4.3.1	Surface Staining	35
3.4.3.2	Intrazelluläres Staining	36
3.4.3.3	Kompensation	36
3.4.3.4	FACS–Sort	37
3.5	Molekularbiologische Methoden	38
3.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.5.2	mRNA-Isolation.....	40
3.5.3	Messung des RNA-Gehaltes.....	41

Inhaltsverzeichnis

3.5.4	Reverse Transkriptase	41
3.5.5	Herstellung einer Standardkurve („slope“)	42
3.5.6	Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)	43
3.5.6.1	Primeretablierung	45
3.5.7	DNA-Gelelektrophorese und -extraktion	46
3.5.8	Gen-Sequenzierung IL-22.....	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Akute DSS-induzierte Wildtyp-Kolitis.....	48
4.1.1	Gewichtsverlauf	49
4.1.2	Histologie und histologischer Score	49
4.1.3	Quantifizierung Nkp46-positiver Zellen	52
4.2	Akute DSS-induzierte Kolitis WT/ Rag1 ^{-/-} / Rag2 ^γ C ^{-/-}	55
4.2.1	Gewichtsverlauf	55
4.2.2	Histologie und histologischer Score	56
4.2.3	Immunhistochemie Ki-67.....	60
4.2.4	Durchflusszytometrische Analyse zur Quantifizierung der einzelnen Zellpopulationen.....	63
4.2.4.1	Monozyten/Granulozyten.....	64
4.2.4.2	Makrophagen	65
4.2.4.3	Dendritische Zellen.....	66
4.2.5	Zytokinexpression in der akuten Kolitis.....	68
4.2.5.1	IL-6	68
4.2.5.2	IL-22	71
4.2.5.3	IL-23	73
4.3	Chronische DSS-induzierte Kolitis WT/ Rag1 ^{-/-} / Rag2 ^γ C ^{-/-}	76
4.3.1	Gewichtsverlauf	76
4.3.2	Histologie und histologischer Score	77
4.3.3	Imunhistochemie Ki-67	80

Inhaltsverzeichnis

5	Diskussion.....	84
5.1	Bedeutung/Relevanz der Studie.....	84
5.2	Was für eine Rolle spielen NK-Zellen bei CED?.....	85
5.3	DSS-Kolitismodell.....	88
5.4	Kritische Zusammenfassung eigener Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Studien	90
5.4.1	Akute DSS-induzierte Wildtyp-Kolitis	90
5.4.2	Akute DSS-induzierte WT/ Rag1 ^{-/-} / Rag2 _v C ^{-/-} -Kolitis	91
5.4.3	Chronische DSS-induzierte WT/ Rag1 ^{-/-} / Rag2 _v C ^{-/-} -Kolitis	94
6	Konklusion	95
7	Abkürzungsverzeichnis	V
8	Abbildungsverzeichnis	VI
9	Literaturverzeichnis	VII

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter die Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) fällt eine Reihe von kontinuierlichen und rezidivierenden entzündlichen Erkrankungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes (GIT), deren Hauptvertreter die Colitis Ulcerosa (**CU**) und der Morbus Crohn (**MC**) darstellen. Klassischerweise manifestieren sich die CED erstmals in der zweiten und dritten Lebensdekade, wobei die Ätiologie bisher nur lückenhaft geklärt ist.[1] Die beiden Hauptformen unterscheiden sich bezüglich klinischer Manifestation, pathologischen, endoskopischen und radiologischen Merkmalen aber auch bezüglich ihrer Ätiologie. Im Folgenden soll auf genannte Aspekte näher eingegangen werden:

Die **Colitis Ulcerosa** ist eine meist in Schüben auftretende, gastrointestinale Entzündung des Darmes, welche auf das Kolon begrenzt ist und nur die Darmschleimhaut befällt. Endoskopisch kann man bei der CU gewöhnlich Ulzerationen und Pseudopolypen erkennen, auch kommt es bei endoskopischen Untersuchungen schnell zu Kontaktblutungen. Ein histologisch bedeutsames Merkmal ist die Kryptitis mit Abszessbildung.

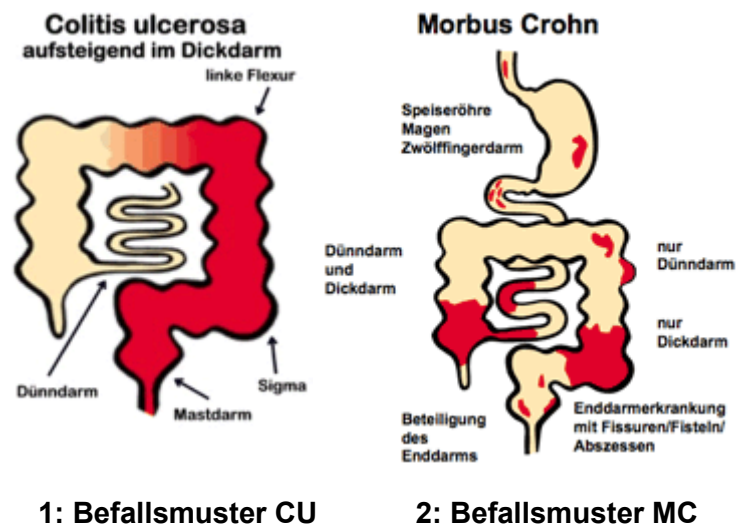
Die Ausbreitung ist individuell unterschiedlich: die CU kann als Proktitis, linksseitige Kolitis mit oder ohne deszendierendes Kolon, als Pankolitis, oder auch in seltenen Fällen in Form einer „backwash Ileitis“, auftreten. Klinisch präsentiert sich die Erkrankung zumeist mit blutigem, oft auch eitrigem und schleimigem Durchfall und abdominellen Krämpfen. Bei schweren Verläufen kann es zu systemischen Symptomen wie Fieber, Tachykardie, schwerer Anämie oder auch einem toxischen Megakolon kommen.[2, 3]

Beim **Morbus Crohn** handelt es sich um eine transmurale Entzündung der Darmwand, welche meist in Schüben verläuft. Anders als bei der CU, kann hier der gesamte Gastrointestinaltrakt von der Mundhöhle bis zum Anus betroffen sein. In der Endoskopie kann man häufig eine lymphofollikuläre Hyperplasie sowie zahlreiche schneckenpurartige Ulzerationen ausmachen. Der segmentale, inselartige Befall erinnert an ein Pflastersteinrelief. Histologisch sind beim MC klassischerweise Epitheloidzellgranulome mit mehrkernigen Riesenzellen zu finden.

Einleitung

In 47% der Fälle ist zum Diagnosezeitpunkt das terminale Ileum befallen, während das Kolon in 28%, das Ileokolon in 21% und der obere GIT nur in 3 % bereits betroffen sind. Klinisch kann sich der MC je nach Lokalisation sehr vielfältig äußern: Im Verlauf der Erkrankung kommt es außerdem oftmals zu unblutigen Durchfällen, abdominellen Krämpfen, Fieber und Gewichtsverlust. Ein häufig auftretendes Erstsymptom sind Fisteln, vor allem im Bereich des Anus. Außerdem kommt es gelegentlich im Verlauf der Erkrankung zu Strikturen, die sich in Symptomen eines Darmverschlusses äußern können und oft nur chirurgisch behoben werden können.[4]

Beide Erkrankungen können sich zudem auch extraintestinal äußern, worauf an dieser Stelle aber nicht genauer eingegangen werden soll.



Quelle: www.kompetenznetz-CED.de

1.1.1 Epidemiologie

Während fast jeder Mensch im Laufe seines Lebens mit einer Darmerkrankung, wie zum Beispiel einer banalen Virusinfektion zu kämpfen hat, sind nur sehr wenige Menschen von einer CED wie dem Morbus Crohn oder der Colitis Ulcerosa betroffen. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass diese Krankheitsgruppe erst seit Anfang des 20. Jahrhunderts stärker in den Fokus der Medizin gerückt ist und zudem aufgrund von milderer Verläufe der CED, den Prävalenz- und Inzidenzzahlen eine nicht unerhebliche Dunkelziffer zu addieren ist.[5]

Weltweit beträgt die Zahl der Menschen, bei welchen eine chronisch entzündliche Darmerkrankung diagnostiziert wurde, circa 3,6 Millionen. Bemerkenswert sind

Einleitung

hierbei die geographischen Unterschiede: Nordeuropa und Nordamerika stellen mit ca. 1,4 Millionen bzw. 2,2 Millionen Erkrankten die Ballungsräume der CED dar, wohingegen die übrigen Kontinente, vor allem Asien, Lateinamerika, Südeuropa und auch weite Teile Afrikas, eine verschwindend geringe Prävalenz für MC und CU aufweisen. In Nordamerika beträgt die Inzidenz für CU 8,25/100,000/Jahr, für MC 8,85/100,000/Jahr.[6] In einer von der Europäischen Union unterstützten prospektiven Studie, die vor allem der Detektion von geographischen innereuropäischen Inzidenzunterschieden dienen sollte, wurde für CU eine Inzidenz von 10,4/100,000/Jahr und für MC eine Inzidenz von 5,4/100,000/Jahr festgestellt. Auffallend war hier ein starkes Nord-Süd-Gefälle, was derart auch in Nordamerika festgestellt werden konnte:[6] In den nördlichen europäischen Staaten war die Inzidenz für CU um 40% erhöht, für MC sogar um 80% gesteigert.[7] In Deutschland sind derzeit ca.320.000 Menschen von einer CED betroffen. Die Inzidenzen für CU und MC betragen hier 6/100.000/Jahr und MC 5/100.000/Jahr.[2][3]In den westlichen Ländern konnte bei initial starkem Inzidenzanstieg von CU und MC in den 60er und 70er Jahren, mittlerweile ein stabiles Niveau bei einer durchschnittlichen Inzidenz von 12/100.000/Jahr und 7/100.000/Jahr erreicht werden.[8] Diese Tatsache und die steigenden Inzidenzen vor allem für CU außerhalb von Nordamerika und Nordeuropa, besonders in Japan, Lateinamerika, Südkorea, Indien und auch anderen Entwicklungsländern, verschmälert die west-östliche Diskrepanz für das Vorkommen von CED, die vermutlich auf einem steigenden Lebensstandard zurückzuführen ist.[6, 9-11] Interessanterweise kann man bei CU und MC auch unterschiedliche Inzidenzen und Prävalenzen abhängig von ethnischer Herkunft, Rasse und Zugehörigkeit bestimmter Bevölkerungsgruppen ausmachen. Jüdische Bevölkerungsgruppen haben unabhängig von ihrem Herkunftsland ein höheres Risiko für die Entwicklung von CED, dennoch nähern sich deren Prävalenzen an die der Bevölkerung, in welcher sie leben, an. Entgegengesetzt hierzu weisen die in Ungarn beheimateten Roma eine deutlich niedrigere Lebenszeitprävalenz als die Durchschnittsbevölkerung auf, [12, 13] eine Tatsache, die durch allgemein erhöhte Inzidenzen und Prävalenzen für CED in Gesellschaften mit hohem sozioökonomischen Standard gefestigt wird.[12]In Hinblick auf das Geschlecht kann eine leichte Dominanz des männlichen Geschlechtes in der Prävalenz von CU und eine weibliche Dominanz in der des MC festgestellt werden. Die Inzidenz für CU sinkt zudem bei Frauen mit steigendem Alter, während sie bei Männern gleichbleibend

Einleitung

ist.[7, 12] Für das erstmalige Auftreten von CED gibt es grundsätzlich zwei Altersgipfel: die meisten von CU oder MC betroffenen Menschen erkranken in der zweiten oder dritten Lebensdekade, ein weiterer, geringerer Anteil erfährt eine Erstmanifestation erst jenseits des 60. Lebensjahres.[12]

1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung von CED wird durch eine Reihe verschiedenster Faktoren begünstigt und stellt ein sehr komplexes Geschehen dar, welches bisher nur bruchstückhaft verstanden wurde. Ohne Zweifel spielen sowohl genetische wie immunologische Aspekte, aber auch Umweltfaktoren eine tragende Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankungen.[14]

In epidemiologischen Studien und speziell in Zwillingsstudien, konnte eine deutliche familiäre Häufung von CED festgestellt werden.[14] Mit dem NOD2/CARD15 Gen auf Chromosom 16, konnte schon relativ früh ein Gen identifiziert werden, welches das Risiko für die Entstehung von MC erhöht.[15, 16] IBD5, IL23R und ATG16L1 sind einige weitere Genloci, welche die Anfälligkeit MC zu entwickeln erhöhen; dies konnte durch zahlreiche Untersuchungen belegt werden.[17-25] Das Risiko für die zukünftige Erkrankung an einer CED für Verwandte ersten Grades von Betroffenen ist 4-20mal so hoch wie in der Normalbevölkerung. Das absolute Risiko für eine CED beträgt bei dieser Personengruppe ca. 7%. Grundsätzlich spielt der genetische Aspekt bei MC eine deutlich größere Rolle als bei der CU, was durch Studien an monozygoten und dizygoten Zwillingen belegt werden konnte.[26, 27]

Dass auch Umweltfaktoren die Entstehung von CED beeinflussen, zeigt sich unter anderem anhand daran, dass in Zwillingsstudien mit monozygoten, also identischen Menschen, die Konkordanz für MC lediglich 45% betrug.[28] In einer prospektiv angelegten Fall-Kontroll-Studie, konnte eine deutliche Verschlechterung der gesundheitlichen Situation bei CED-Patienten nach Einnahme von NSAR sowie auch gehäuftes erstmaliges Auftreten von CED-assoziierten Kolitiden gezeigt werden.[29] Im Gegensatz dazu führt eine frühzeitig durchgeführte Appendektomie zu einer sinkenden Inzidenz von CU.[30] Ein weiterer Einflussfaktor stellt das Rauchen dar: Während regelmäßiges Rauchen das Risiko für die Entstehung einer CU vermindert, erhöht es selbiges für das Auftreten von MC. Bemerkenswert ist, dass starke, langjährige Raucher ein niedrigeres Risiko für CU aufweisen als

Einleitung

Gelegenheitsraucher; hier ist also zusätzlich eine Dosisabhängigkeit festzustellen.[31]

Ein weiterer, vermutlich sehr bedeutender Faktor, ist die luminale Mikroflora des Darmes. Anhand von Mausmodellen wurde gezeigt, dass eine spontane Kolitis bei genmutierten Tieren nur in Anwesenheit von mikrobieller Flora auftrat, wurden die Mäuse in keimfreier Umgebung gehalten, blieben sie gesund.[28] In einer anderen Untersuchung von ilealen Resektaten von MC Patienten, wurde eine erhöhte Anzahl an adhäsiven E. coli Bakterien gefunden, die möglicherweise zu Epithelläsionen führen und so einen Defekt der intestinalen Barriere herbeiführen können.[32]

1.1.3 Pathophysiologie

Für die Entstehung der CED in ansonsten immunkompetenten Menschen gibt es verschiedene Erklärungsansätze, welche aber nicht ganz scharf voneinander zu trennen sind. Es wird zum Einen von einer zum Teil genetisch bedingten Dysregulation des enteralen Immunsystems ausgegangen, welches überschießend auf die normale Mikroflora des Darmes reagiert, diese also als fremd einstuft und so zu einer Entzündungsreaktion führt. Wichtige „Wachposten“ des enteralen Immunsystems stellen M-Zellen, IgA-Komplexe und antigenpräsentierende Zellen dar. Die Peyer-Plaques und isolierte Lymphfollikel mit B- und T-Zellen induzieren die mukosale Immunantwort, während die Lamina propria als Detektionsort und Effektorort fungiert.[33, 34] Auf der anderen Seite steht die Hypothese, dass eine veränderte Mikroflora oder auch eine gestörte Funktion der intestinalen Barriere, zu einer verstärkten Aktivität des Immunsystems, vor allem des angeborenen Immunsystems (innate) führt. Eine erhöhte Anzahl oder eine veränderte Zusammensetzung der Mikroorganismen kann zum Beispiel zu einer überschießenden Immunantwort führen. Diese These konnte unter anderem durch klinische Studien, in welchen an CED erkrankte Personen von antibiotischer und probiotischer Behandlung profitierten, bestätigt werden.[35, 36]

Anhand von Mausmodellen konnte herausgefunden werden, dass es zu keiner spontanen Kolitis bei keimfreien Tieren kommt. Erst bei Kontakt mit Keimen im Darmlumen kommt es vor allem zur Stimulation des angeborenen Immunsystems (Innate-Kolitis).[3] Über toll-like-Rezeptoren (TLR's), NOD's (nucleotide-binding-oligomerization domains) und vermutlich über andere Proteine mit ähnlichen Kapazitäten, binden bakterielle, virale und parasitäre Komponenten und führen über eine Stimulation immunologischer Zellreihen zur Inflammation. [37, 38] Anhand von

Einleitung

Experimenten mit STAT3-defizienten Mäusen konnte dies folgendermaßen belegt werden: Bekannterweise spielt der STAT3-Transkriptionsfaktor eine große Rolle im Signaltransduktionsweg des immunsupprimierend wirkenden IL-10.[39] STAT3 defiziente Mäuse entwickeln eine spontane, von IL-12p40 abhängige Enterokolitis, ähnlich dem pathophysiologischen Bild des MC. Bei Tieren die eine Defizienz für STAT3 und TLR4 aufwiesen, wurde eine deutlich schwächere Kolitis mit geringerer IFN- γ Produktion festgestellt. Dies zeigte, dass die Lipopolysaccharide der Mikroflora, welche den TLR4-Rezeptoren als Liganden dienen, verantwortlich sind für eine stärkere entzündliche Reaktion über Th1-Zellen. Bekräftigt wurde dieses Erkenntnis des Weiteren durch Versuche mit IL-10 defizienten MyD88 knockout-Mäusen, bei denen die Signaltransduktion über jegliche TLRs ausgeschaltet war und es infolge dessen zu keinerlei Entzündung kam.[40] Diese Tatsachen weisen darauf hin, dass Menschen mit CED evtl. Gendefekte im Bereich des angeborenen Immunsystems aufweisen, denn dieses ist verantwortlich für die initiale Erkennung von stereotypen molekularen Strukturen, die Bakterien zugeordnet werden können.[3]

Die Lamina mucosa, die innerste Epithelschicht der Darmschleimhaut, übt sowohl absorbierende als auch sekretorische Funktionen aus. Die epithelialen Zellen sind über tight junctions miteinander verbunden; sie besitzen eine Barrierefunktion, indem sie das Eindringen von intakten Bakterien und Makromolekülen in die Darmwand verhindern. Beispielsweise konnte man nachweisen, dass die Permeabilität der intestinalen Barriere bei erstgradigen Verwandten von MC-Patienten erhöht ist.[41, 42] Genexpressionsanalysen menschlicher Darmbiopsien bei Patienten mit CED haben zudem gezeigt, dass die Zelladhäsionsproteine beta-Catenin und E-cadherin, die an dem Aufbau der besagten tight junctions beteiligt sind, bei dem untersuchten Patientengut downreguliert waren.[43] Die intestinalen Epithelzellen sind über TLRs, NOD 1,2, Zytokinrezeptoren und Rezeptoren für antikörperspezifische Fc-Fragmente in ständiger Kommunikation mit angeborenem und adaptivem Immunsystem.[44-46] Zusätzlich zu den säulenartig angeordneten Epithelzellen, befinden sich vor allem in den Krypten spezielle Zellen, wie zum Beispiel Paneth Zellen und fördern zusätzlich durch die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden wie α -Defensinen den Schutz vor Bakterien und die Barrierefunktion. Bestimmte Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Reduktion von α -Defensinen der Paneth Zellen zur Pathogenese von terminaler Ileitis bei MC bei Patienten mit NOD2 Mutation beiträgt.[47, 48] Überdies

Einleitung

sind Becherzellen wichtige Bestandteile der intestinalen Lamina mucosa: Sie produzieren Peptide, welche sowohl für Immunabwehr als auch für epitheliale Reparaturmechanismen eine wichtige Rolle spielen.[49]

Pathophysiologisch handelt es sich bei den CED um nicht-infektiöse Entzündungen, welche durch die starke Expression proinflammatorischer Zytokine charakterisiert werden. Abhängig von der Zytokin- und Chemokinexpression sowie von Adhäsionsmolekülen, migrieren vor allem Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen in das Zielgewebe. Genannte Zellen bilden Sauerstoffradikale und bewirken so Zellschaden und eine erhöhte Permeabilität der tight junctions.[50] Während die Rekrutierung von aktivierten neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen in die Lamina propria die lokale Immunantwort verstärkt, amplifizieren aktivierte NK-Zellen antimikrobielle Faktoren und führen so zu einer Abmilderung der Entzündung.[51] Grundsätzlich ist die angeborene Immunantwort die Voraussetzung für die spätere adaptive Immunantwort. Das adaptive Immunsystem ist hierbei der Haupteffektor des entstehenden Zellschadens bei CED und besteht aus residenten und rekrutierten Abwehrzellen.

Während bei der CU vor allem die Th2 Zellen mit dominierender IL-13, IL5, IL4-Expression vorherrschen, kommt es beim MC zu exzessiver Produktion von IL-12, IL-13, INF- γ und IL-17, vor allem durch Th1-Zellen bedingt.[3] Das Verständnis für die unterschiedlichen Lokalisationen der CED bei verbreiteten Gen-Mutationen ist noch nicht vorhanden und stellt eine große Herausforderung für die Zukunft dar.[50]

1.1.4 Therapie

Sowohl bei der Colitis ulcerosa als auch beim Morbus Crohn gibt es gewisse therapeutische Allgemeinmaßnahmen, die zu treffen sind:

Grundsätzlich sollen Lebensmittel, die nicht vertragen werden, gemieden werden. Im Falle einer Laktoseintoleranz, welche sich bei 30% der Patienten mit CED im Verlauf entwickelt, sollte beispielsweise eine laktosefreie Ernährung berücksichtigt werden. Überdies kann es bei Befall von Jejunum und Ileum zu einem Malabsorptionssyndrom kommen, was evtl. die Substitution von fettlöslichen Vitaminen E, D, K, A, Vitamin B12, Spurenelementen, Eisen etc. von Nöten macht. Im akuten Schub ist zudem eine ballaststofffreie Ernährung anzustreben.[52] Im Folgenden wird auf die medikamentöse Behandlung von CU und MC eingegangen.

Einleitung

Im aktiven Schub bei mild bis mäßig ausgeprägter **Colitis ulcerosa** stellt Mesalazin, ein Retardpräparat der 5-Aminosalicylsäure die Standardtherapie zur Remissionsinduktion dar. Es kann oral entweder unverändert oder als pro-drug z.B. Sulfasalazin, Olsalazin (pharmakologisch inaktiver Stoff, der durch Metabolisierung in den eigentlichen Wirkstoff überführt wird) eingenommen werden.[53, 54]

Alternativ zur oralen Verabreichung macht es vor allem bei einer Proktitis oder linksseitiger Kolitis Sinn, Mesalazin oder topische Kortikosteroide wie z.B. als Budesonid, Hydrokortison oder Beclomethason rektal als Klysma, Schaum oder Suppositorium zu geben. Durch die herabgesetzte Bioverfügbarkeit können so systemische Nebenwirkungen der Steroide weitestgehend vermieden werden.[55] In einer Meta-Analyse bezüglich der Wirksamkeit rektal eingesetzter Steroide und Mesalazin bei distaler Colitis ulcerosa, konnte anhand von klinischen, histologischen und endoskopischen Aspekten gezeigt werden, dass Mesalazin in seiner Effektivität stärker ist als topische Steroide. Bei einem Vergleich von rektalem Budesonid mit herkömmlichen rektalen Steroiden konnten bis auf ein deutlich geringeres Nebenwirkungsprofil auf Seiten des Budesonids keine merklichen Effektivitätsunterschiede festgestellt werden.[56]

Bei Patienten mit mittelschweren bis schweren akuten Schüben einer CU und bei jenen, welche auf die oben genannte Behandlung nicht ansprechen, sollte eine Therapie mit Prednison über mehrere Wochen durchgeführt werden. Bei Nichtansprechen auf die orale Gabe oder sehr schwerem Verlauf kann auch ein stationärer Aufenthalt mit intravenöser Gabe der Steroide von Nöten sein.[53, 54, 57] Alternativ können bei unzureichendem Ansprechen auf Kortikosteroiden auch Immunsuppressiva wie z.B. Tacrolimus, Ciclosporin oder Azathioprin zusätzlich oder ausschließlich verabreicht werden; allerdings ist die Datenlage bezüglich ihrer Wirksamkeit nur unzureichend.[4] Ein Reservemittel bei therapierefraktären Verläufen, stellt der chimäre monoklonale Antikörper gegen TNF- α dar. Er wird eingesetzt bei Patienten, die sich in einem akuten schweren Schub befinden und auf genannte Medikamente nicht ansprechen.[58] Wie schon bei der Remissionsinduktion ist Mesalazin, entweder oral oder rektal verabreicht, auch das Mittel der Wahl zur Remissionserhaltung bei CU.[53, 54, 59] Azathioprin oder Mercaptopurin können alternativ nach einem fulminanten Schub oder auch nach Vorbehandlung mit einem Immunsuppressivum eingesetzt werden. Infliximab dient auch hier als Reservemittel für therapierefraktäre Fälle.[53, 54, 57, 58]

Einleitung

Bei lebensbedrohlichen Komplikationen wie Darmperforationen, unstillbaren Blutungen oder dem toxischen Megakolon muss eine Notfalloperation durchgeführt werden. Elektive Operationen sind indiziert bei Epitheldysplasien oder Malignomen im Bereich des Kolons aber auch bei Versagen der medikamentösen Therapie oder häufigen Rezidiven. Üblicherweise wird eine totale Proktokolektomie mit ileoanaler Pouchanlage durchgeführt.[60, 61]

Das therapeutische Management des **Morbus Crohn** unterscheidet sich in einigen Punkten von dem der Colitis ulcerosa: Zur Remissionsinduktion bei leichten bis mäßigen Schüben, profitieren vor allem Patienten mit Kolonbefall von einer Therapie mit Sulfasalazin, wobei beachtet werden muss, dass es auch Sulfasalazin-tolerante Menschen gibt.[62, 63] Im Gegensatz zur CU wird Mesalazin bei MC nicht gerne eingesetzt, da dessen Wirksamkeit vor allem klinisch hier nicht sicher nachgewiesen werden konnte und sogar die Rate an Hospitalisierungen aufgrund des Vorenthaltens einer effektiveren Therapie erhöht.[64] Breite Anwendung findet das topische Glukokortikoid Budesonid vor allem bei ileozökalem Befall und Befall des rechtsseitigen Kolons. Es ist nur geringfügig der systemischen Steroidtherapie unterlegen und weist einen sehr hohen First-Pass-Mechanismus auf, weswegen systemische Nebenwirkungen der Glukokortikoide wie z.B die Osteoporose weitgehend ausbleiben. Außerdem konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass Budesonid in der Remissionsinduktion von MC effektiver ist als 5-Aminosalicylsäuren. Wie auch bei der CU, können Glukokortikoide auch rektal in verschiedenen Darreichungsformen gegeben werden.[65, 66] Patienten mit mäßigen bis schweren Verläufen oder auch solche, die nicht auf Budesonid und Sulfasalazin/Mesalazin ansprechen, profitieren von einer oralen Steroidtherapie, z.B. mit Prednisolon.[53, 57, 62, 63, 67, 68] Bei Steroidabhängigkeit, Steroidrefraktion, häufigen Schüben oder auch bei Fistelbildung können die Immunsuppressiva Azathioprin oder bei Intoleranz Methotrexat eingesetzt werden.[69] Die Biologicals Infliximab und Adalimumab, beides TNF- α Antikörper, stellen Reservemittel für schwere therapierefraktäre Schübe und rezidivierende Fistelbildungen dar.[70, 71] Zur Remissionserhaltung bei MC können vor allem bei mäßig bis schweren Krankheitsbildern oder steroidabhängigen Verläufen die Immunsuppressiva Azathioprin, Mercaptopurin und Methotrexat eingesetzt werden; dies eignet sich

Einleitung

besonders, wenn diese schon zuvor zur Remissionsinduktion eingesetzt wurden.[53, 57, 67, 68, 70, 72-74]

Für Sulfasalazin und Mesalazin konnte in klinischen Studien keine Wirksamkeit für die Induktionserhaltung nachgewiesen werden und liegen teilweise uneinheitliche Daten vor.[75] Eine Behandlung mit Budesonid zur Remissionserhaltung führt erwiesenermaßen zur Verlängerung des rezidivfreien Intervalls. Die Remission hält hiermit durchschnittlich für weniger als ein Jahr an.[76] Patienten, welche auf die genannten medikamentösen Maßnahmen zur Remissionserhaltung nicht ansprechen, profitieren von den TNF- α Antikörpern Infliximab und Adalimumab.[77, 78]

Standardtherapie für bei MC häufig auftretende Fisteln, stellen die Antibiotika Metronidazol und Ciprofloxacin dar.[53, 57, 67, 68] Alternativ können die Immunsuppressiva Azathioprin und Mercaptopurin sowie als ultima Ratio Infliximab eingesetzt werden.[72, 79] Während sich eine totale Proktokolektomie bei der CU kurativ auswirkt, kann MC nicht durch chirurgische Interventionen geheilt werden. Indikationen für eine Operation bei Patienten mit Mitbeteiligung des Kolons sind grundsätzlich die gleichen wie bei der CU.[60, 80] Spezielle Indikationen für chirurgisches Vorgehen bei MC sind mit einer Subileus- bzw. Ileussympptomatik einhergehende Strikturen sowie abszedierende innere Fisteln, enterokutane und enterovesikale Fisteln.[61]

Wie es den aktuellen Therapiestandards zu entnehmen ist, werden die Hauptformen der CED MC und CU aktuell vor allem behandelt, indem versucht wird, überschießende Entzündungsreaktionen des Immunsystems medikamentös zu unterdrücken. Als zukünftige Therapieoption könnte der therapeutische Schwerpunkt mehr auf Unterstützung der körpereigenen regulatorisch wirksamen Komponenten unseres Immunsystems wie den NK-Zellen oder den regulatorischen T-Zellen liegen. Deshalb wird in dieser Arbeit die Rolle der natürlichen Killerzelle in der Entstehung und dem Verlauf von CED näher beleuchtet.

1.2 DSS-Tiermodell für CED

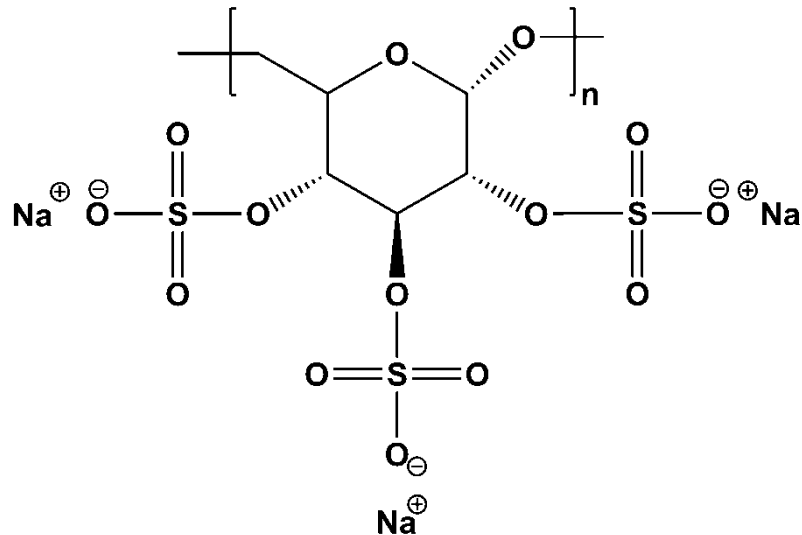
Dank vieler epidemiologischer und genetischer Studien am Patientengut, aber vor allem aufgrund von zahlreichen experimentellen Tiermodellen, konnten in den letzten Jahren sehr wichtige neue Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese von CED gewonnen werden.[81] Auch wenn Tierversuche sicherlich nicht die volle Komplexität

Einleitung

von MC und CU beim Menschen widerspiegeln und auch keine klinischen Studien ersetzen können, so sind sie doch von großem Wert, um Informationen über pathophysiologische Mechanismen, insbesondere in der Frühphase der Inflammation, zu erfassen oder auch um die Wirkung neuer therapeutischer Ansätze zu überprüfen.[82, 83] Die Tatsache, dass das klinische Erscheinungsbild von Menschen mit CED sehr vielfältig ist, konnte anhand von Tiermodellen mit transgenen und gezielt genveränderten Mäusen, bei denen verschiedene für CED typische intestinale Läsionen auftraten, bestätigt werden.[84] Dank der schnell eintretenden Entzündungsreaktion und der unkomplizierten Durchführung, werden bevorzugt Tierversuche mit chemisch induzierter intestinaler Entzündung durchgeführt :[82]

Das Polymer Dextran Sodium Sulfat (DSS, Abbildung 3) wird häufig für die chemische Induktion einer akuten oder chronischen intestinalen Entzündung in experimentellen Tierversuchen verwendet. Man geht davon aus, dass es eine direkt toxische Wirkung auf die Epithelzellen der basalen Krypten ausübt und so die Integrität der intestinalen Barriere beeinträchtigt.[82] Bei den Tieren äußert sich die akute DSS-Kolitis klinisch mit Verabreichung von 3-10% DSS im Trinkwasser über 5 Tage in Form von Diarrhöe, rektalem Blutabgang sowie progredientem Gewichtsverlust. Histologisch lassen sich intestinal multiple Erosionen, Ulzerationen, granulozytäre Infiltrationen und Kryptenabszesse nachweisen. Es ist vor allem das linksseitige Kolon betroffen, sodass sich zusammenfassend sagen lässt, dass die akute DSS-Kolitis dem Erscheinungsbild der CU beim Menschen ähnelt.[85] Da gezeigt werden konnte, dass auch B- und T-Zell-defiziente Mäuse unter Einfluss von DSS eine schwere Kolitis entwickeln, spielt zumindest im akuten Modell vor allem das angeborene Immunsystem eine tragende Rolle und kann genauer studiert werden.[86]

Die Verabreichung von 2% DSS über mehrere Wochen im Wechsel mit Wasser, führt bei empfänglichen Tierstämmen zu einer chronischen Kolitis.[82] Histologisch konnten hier intestinale Erosionen, mukosale Dysplasien, prominente Lymphfollikel sowie Verkürzungen des Kolons gefunden werden.[85]



3: Molekulare Struktur von DSS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei Mäusen mit unterschiedlicher genetischer Ausstattung sowohl eine akute als auch eine chronische Kolitis induziert. Im Folgenden wird näher auf die verwendeten Tiere eingegangen.

1.2.1 C57BL/6 (Wildtyp)

Der Stamm der C57BL/6-Mäuse wurde durch den amerikanischen Genetiker C.C. Little 1921 erzeugt. Besser bekannt unter dem Namen „Black 6“ stellt er heutzutage in der experimentellen Forschung den meist verwandten Inzuchtstamm dar. Die Tiere werden in den verschiedensten Bereichen der Forschung eingesetzt, wie auch in dieser Arbeit als genetischer Hintergrund für Mäuse mit einem veränderten Genom.[87]

1.2.2 Rag1^{-/-}

Bei den Rag1^{-/-} Mäusen handelt es sich um Tiere, bei welchen das Rag1-Gen ausgeschaltet ist. Die Expression des Rag1-Gens (recombination activating gene) ist auf die reifenden Lymphozyten beschränkt. Es spielt eine wichtige Rolle in der VDJ-Rekombination, welche verantwortlich ist für die Variabilität von Antikörpern und T-Zell Rezeptoren in Wirbeltieren und so das Kernstück des adaptiven Immunsystems bildet. [88]

Die Tiere verfügen über keine CD3⁺ oder T-Zell-Rezeptor alpha-beta positiven Zellen. Der Thymus dieser genmutierten Mäuse enthält 15 bis 130mal weniger Zellen als bei Wildtypen. Weder in der Milz noch im Knochenmark lassen sich IgM oder IgD

Einleitung

markierte Zellen finden, was auf das Nichtvorhandensein von B-Zellen hinweist. Man vermutet, dass die Entwicklung von B- und T-Zellen in einem frühen Stadium sistiert, sodass diese Mäuse keine reifen B- und T-Zellen produzieren können und somit nur ein defizitäres Immunsystem aufweisen.

Es ist zu sagen, dass sich Rag1^{-/-}-Mäuse gut für die genauere Betrachtung des angeborenen Immunsystems eignen, bzw. im Vergleich mit WT-Mäusen, zur Untersuchung der Rolle des adaptiven Immunsystems in verschiedenen Krankheitsprozessen dienen können.[89]

1.2.3 Rag2 γ C^{-/-}

Bei Rag2 γ C^{-/-}-Mäusen ist neben dem Rag2-Gen auch der weit verbreitete Zytokinrezeptor „Gamma Chain“ nicht vorhanden. Aufgrund der fehlenden Rezeptoren beispielsweise für die Interleukine 2,4,7,9 und 15 ist die lymphozytäre Reifung stark eingeschränkt, sodass sich nur wenige periphere funktionstüchtige B- und T-Zellen und zudem keine Aktivität von NK-Zellen nachweisen lassen. Durch die Kreuzung mit Rag2-defizienten Mäusen entstand dann die homozygote „double-knockout mouse“, welche charakteristischerweise weder über funktionstüchtige B- und T-Zellen noch über NK-Zellen verfügt. [90][91-93] Wie auch das Rag1-Gen trägt Rag2 zur VDJ-Rekombination bei. Da bei diesen Mäusen ein großer Teil dieses Genes nicht vorhanden ist, kann keine Reifung von T- und B-Lymphozyten stattfinden, lediglich unreife Vorstufen derselben können in den primär lymphatischen Organen der Tiere gefunden werden was zu einem schweren Immundefekt führt.[94] In vorausgehenden Analysen dieses Mausotypus konnten keine Zellen in der Milz detektiert werden, die für den NK-Zell Marker Nk1.1, den B-Zell Marker B220+ oder den T-Zell Marker Thy1+ positiv waren. Auch funktionelle Tests bezüglich der NK-Zell Aktivität in der Milz fielen negativ aus.[95]

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Verwendung dieser Tiere mehr Aufschluss über die Rolle der NK-Zellen bei entzündlichen Darmerkrankungen geben.

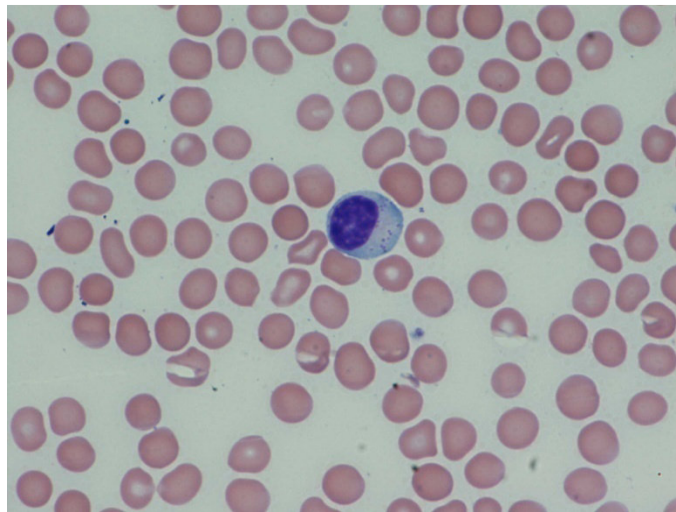
1.3 Die NK-Zelle

1.3.1 Charakteristika von NK-Zellen

NK-Zellen sind im Blut zirkulierende große granuläre Lymphozyten und bilden, da sie keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen, neben dem Komplementsystem und

Einleitung

den Phagozyten einen wichtigen Bestandteil des angeborenen Immunsystems.[96] Sie verfügen über die Kapazität, infizierte und transformierte Zellen zu überprüfen und bei Bedarf durch Lyse oder Apoptoseinduktion zu eliminieren. Durch die Produktion von proinflammatorischen Markern wie Interferon- γ nehmen sie auch Einfluss auf die adaptive Immunantwort. Zusätzlich sezernieren sie weitere Zytokine wie das immunsupprimierende IL-10, Wachstumsfaktoren und verschiedene Chemokine.[97] Ähnlich den B- und T-Zellen wird ihre Aktivität durch lösliche Faktoren und durch Zell-Zell Interaktion reguliert.[98]



4: Blutausstrich mit NK-Zelle

Quelle: www.gesundheit.gv.at

1.3.2 Reifung von NK-Zellen

Die Entwicklung zu reifen Zellen findet vor allem im Knochenmark, aber auch in Thymus und Lymphknoten statt:[99] CD34+ hämatopoietische Stammzellen differenzieren sich zu normalen lymphatischen Progenitorzellen, die sich dann weiter zu NK-Zell-Präkursoren und anschließend zu unreifen NK-Zellen entwickeln können. Mit dem Erwerb aktivierender und inhibitorischer Rezeptoren entwickelt sich die NK-Zelle zu voller Funktionstüchtigkeit.[100] In den verschiedenen Reifeszuständen exprimieren NK-Zellen auch verschiedene Zytokinrezeptoren und reagieren so auf unterschiedliche Stimulanzen.[101] Obwohl dies Thema vieler Studien war, ist die genaue Regulation der Reifungsprozesse von NK-Zellen auf molekularer Ebene noch in großen Teilen unbekannt, könnte aber zukünftig für immunomodulatorische Therapien eine große Rolle spielen.[102, 103]

1.3.3 Aktivierung und zytotoxische Funktion von NK-Zellen

Im Ruhezustand residieren NK-Zellen in lymphatischen Organen wie Knochenmark, Milz und den Lymphknoten.[98] Das reaktive Verhalten der NK-Zellen ist abhängig von inhibitorischen und stimulatorischen Faktoren in deren Umgebung.[104, 105] Eine besondere Rolle spielt dabei das Zytokin IL-15: es reguliert die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen und auch T-Zellen, vor allem der T-memory cells.[106] Bisher konnten mehrere Untergruppen von NK-Zellen beschrieben werden, doch ist es noch unklar, inwieweit sich deren Verhalten in verschiedenen Aktivitätszuständen unterscheidet.[107]

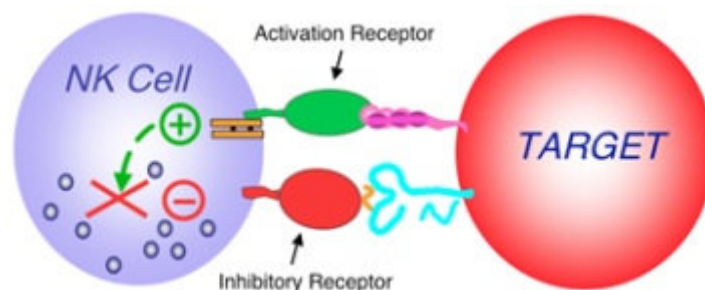
Während die Aktivität der NK-Zellen im Ruhezustand herabgesetzt ist, kann diese durch die Zytokine IL-2, IL-12, IL-18 sowie Interferone,[108-110] Interaktion mit anderen (infizierten bzw. mutierten) Zellen und durch Pathogene deutlich gesteigert werden.[109, 111, 112] Außerdem wichtige Voraussetzung für das sogenannte Priming ist der Kontakt mit dendritischen Zellen und deren Transpräsentation von IL-15[113] Durch das Priming kommt es zu einer Mehrexpression verschiedener Aktivitätsmarker, vermehrtem intrazellulären Granzym B sowie stärkerer Zytotoxizität der Zellen.[113] Im Gegensatz zu T-Zellen, welche ein eher statisches Verhalten während ihrer Aktivierung und Interaktion mit dendritischen Zellen an den Tag legen, bewahren NK-Zellen in aktiviertem Zustand eine rege Motilität: Um die Signale von Zytokinen in der Umgebung von dendritischen Zellen aufzuspüren, patrouillieren sie in entzündlichen Gebieten und interagieren intermittierend jeweils nur für 1-3 Minuten mit dendritischen Zellen.[98]

NK-Zellen verfügen über zwei Mechanismen ihre Zielzellen zu zerstören: Entweder durch eine Art Injektionssystem, wobei lytische Granula in die Zielzelle injiziert werden welche Perforin und Granzyme enthalten, oder durch die Expression von sogenannten „death ligands“ wie der Fas-Ligand, der mit dem Fas-Protein auf der Zielzelle interagiert, kann der Untergang der Zielzelle herbeigeführt werden.[114, 115]

Im Vergleich zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die ihre Zielzellen durch T-Zell Rezeptoren anhand von auf MHC I-Komplexend präsentierten Fremdartigenen erkennen, detektieren NK-Zellen mittels spezieller Rezeptoren, welche mit MHC I

Einleitung

Molekülen in Wechselwirkung treten, zu eliminierende Zellen. MHC I Moleküle sind Oberflächenmarker, die auf fast allen gesunden Zellen des Organismus exprimiert werden. NK-Zellen sind sowohl mit aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren ausgestattet. Bei Erkennen von MHC I Komplexen durch den inhibitorischen Rezeptor, wird die Zelle als gesund eingestuft. Wenn der aktivierende Rezeptor ungewöhnliche Kohlenhydrat- oder Proteinstrukturen bzw. das Fehlen von MHC I Komplexen wahrnimmt, so führt dies zur Aktivierung der zytotoxischen NK-Zell Funktion. Infizierte oder tumorös entartete Zellen weisen eine verminderte Expression von MHC I auf ihrer Oberfläche auf und werden so von NK-Zellen als bösartig erkannt und zerstört.[116]



5: Erkennung einer Zielzelle durch die NK-Zelle

Quelle: www.research.peds.wustl.edu

1.4 Ziele der Arbeit

Wie bereits in der Einleitung näher ausgeführt, wirft die Pathophysiologie der (chronisch) entzündlichen Darmerkrankungen trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten noch immer viele Fragen auf.

Ziel dieser Arbeit ist es vor allem, genauere Erkenntnisse bezüglich der Funktion der natürlichen Killerzelle in diesem Formenkreis zu erfahren. Wir wählten hierzu das Modell sowohl einer akuten als auch einer chronischen DSS-induzierten Kolitis. Als Versuchstiere verwendeten wir C57BL/6 Tiere, B- und T-Zell defiziente Rag1^{-/-}-Mäuse sowie B-, T-, und NK-Zell defiziente Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse. So erhofften wir uns, durch den Vergleich klinischer und histologischer Parameter aber auch durch zellbiologische Untersuchungen der verschiedenen Mausstämme, auf basisimmunologischer Ebene Einblick in die Abläufe von intestinalen Entzündungen zu erlangen.

2 Material

2.1 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Reader	Molecular Devices Sunnyvale, USA
FACS Calibur und Canto II	BD, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop, Axio Observer Z1	Carl Zeiss, Oberkochen
Gelkammer	BioRad, München
HeraSafe Steribank	Heraeus, Hanau
HistoKassetten	Simport, Beloeil, Canada
Inkubator, Serie 6000	Heraeus, Hanau
Light Cycler und Light Cycler480	Roche, Mannheim
Midi- MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop DMRB	Leica, Solms
Mikrotom Microm HM350	Microm International, Walldorf
PEN	Roche, Mannheim
pH-Meter PH538	WTW, Weilheim
Pipetten, diverse Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Quarzküvette Suprasil 10 mm Schichtdicke	Hellma, Müllheim
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zählkammer Neubauer improved	Schubert und Weiss, München
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 mL Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
10 mL Spritzen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
2,0 mL Eppendorfgefäße	Corning, Kaiserslautern
20 G Kanülen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Material

5 mL Rundboden-(FACS-)Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg
6-Well Platte	Corning, Kaiserslautern
96-Well MaxiSorp™	Nunc, Rochester, NY, USA
Cell Scraper 25 mm	TPP, St. Louis, USA
Deckgläser 24x50 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Histokassetten	Simport, Beloeil, Canada
LS Separation Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Marker II SuperFrost	Aspen, Caledonia, USA
Mikrotommesser	Feather, Osaka, Japan
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha, WI, USA
PCR Kapillaren	Roche, Mannheim
PCR Pipetten	Roche, Mannheim
Petrischale 100 mm x 20 mm	Non pyrogenic, Corning, Kaiserslautern
PP Röhrchen 15 mL (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster
PP Röhrchen 50 mL (Falcon)	Greiner Bio-one, Kremsmünster
Präparier- und Strabismusschere,	Aesculap, Tuttlingen
Steritop-Filtereinheit, 250 ml Millipore	Billerica, MA, USA
SuperFrost Plus Objektträge	Langenbrinck, Emmendingen
Zellsiebe, 40 µm	BD Falcon, Heidelberg
Zellsiebe, 70 µm	BD Falcon, Heidelberg

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Fertiglösungen

Albumin bovine serum (BSA)	Biomol, Hamburg
Alcianblau	Merck, Darmstadt
Antikörper-Verdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostic Systems, Hamburg
Aquatex	Merck, Darmstadt
BSA	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citric Acid Trisodium Salt, Dihydrate	Cleveland, Ohio, USA
Collagenase D	Roche, Mannheim
DAB	Merck, Darmstadt
DEPC Wasser	Ambion, Foster City, USA

Material

DNase I from bovine pancreas	Sigma, München
EDTA 500 mM	Merck, Darmstadt
Enthellan	Merck, Darmstadt
Eosin Y Solution	Sigma, München
Ethanol 75%	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
HBSS	Gibco, Darmstadt
Hoechst Reagenz 33342	Höchst AG, Frankfurt a. Main
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Mini Elute Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen
PeqGold Universal Agarose	Peqlab, Erlangen
Periodsäure	Merck, Darmstadt
Quickload 100bp DNA Ladder	NEB, Ipswich UK
Roti [®] -Histol	Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640	Gibco, Darmstadt
Schiffs Reagenz	Merck, Darmstadt
SensiTek HRP	ScyTec Laboratories, Logan, Utah, USA
Stop solution (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Tissue Tek	Sakura, Staufen
TMB	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Tris Pufferan [®]	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau 0,5%	Biochrom, Berlin
Tween20	Sigma, München
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Gibco, Paisley, UK

Material

2.4 Kits

AffinityScript™ QPCR cDNA Kit	Aiglent Technologies, Böblingen
BD OptEIA Set Mouse IL- 2	BD, Heidelberg
BD OptEIA Set Mouse IL- 22	BD, Heidelberg
BD OptEIA Set Mouse TNF	BD, Heidelberg
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Mouse IL-6 ELISA	e-Bioscience, Frankfurt
Nkp46 cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
SuperScript III FirstStrandSynthesisSupermix	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SYBR Green I	Roche, Mannheim

2.5 Puffer und Medien

Erythrozyten Lyse Puffer	BioWhittaker, Lonza, USA
Flow Cytometry Fixations Buffer (1x)	R&D, Minneapolis, USA
Formaldehyd 1%	Pathologie, Uniklinikum Regensburg
PBS 1x	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Agarosegel (1%)

H₂O
67% TAE (1x)
1% (w/v) Agarose
0,007% Ethidiumbromid

Blockserum

5% Ziegenserum
1x T-TBS

Citrat Puffer

2,93 g Citric Acid Trisodium Salt
1 L Aqua Dest., pH 6

DSS 5%

12,5 g Dextran Sodium Sulfat
250 mL Leitungswasser

Material

DSS 3%

7,5 g Dextran Sodium Sulfat

250 mL Leitungswasser

Ladepuffer

500 µL Glycerin

425 µL steriles DEPC-Wasser

75 µL einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung

Laufpuffer (TAE-Puffer) 10x

144,13 g Glycin

60,55 g Tris

10 g SDS (1%)

1 L Aqua Dest.

MACS-Puffer 10x

0,74 g EDTA

5 g BSA

1 L PBS

Primärzellmedium

RPMI

10% FCS

1% Penicillin/Streptomycin

0,1% β-Mercaptoethanol

TBS

60,5 g Tris

87,6 g NaCl

1 L A. Dest., pH 7,5

T-TBS

1 mL Tween20

Material

1 L TBS

Waschpuffer

PBS

0,5% Triton-X-100

FACS-Puffer (3%)

48,5 mL PBS

1,5 mL FCS

Predigestion Solution

25 mL HBSS

0,047 g EDTA (5 nM)

250 µL DTT

Digestion Solution

50 mL PBS

0,025 g Collagenase D

0,025 g DNase I

0,15 g Dispase II

2.6 Versuchstiere

Wildtyp (WT), C57BL/6

B6.129S7-*Rag1*^{tm1Mom}/J

B6-*Rag2*^{tm1Fwa} *I12rg*^{tm1Wjl}

Charles River, Wilmington, USA

The Jackson Laboratory, Bar Harbor,
USA

Taconic Europe, Borup, Dänemark

2.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Fluorochrom/ Konjugat	Verdünnung Histo	Isotyp	Klon	Hersteller
KI-67	Ratte	-	1:25	IgG2a	TEC-3	DakoCytomation, Glostrup
CD27	Hamster	APC		IgG	LG.749	eBioscience
Nkp46	Ratte	FITC	-	IgG2a,k	29A1.4	eBioscience
CD45	Ratte	V500		IgG2a	104	BD
CD11b	Ratte	PE Cy7		IgG2b,k	M1/70	BF

Material

CD11c	Hamster	PerCP CY5.5		IgG	N418	eBioscience
F4 80	Rat	APC Cy7		IgG2a,k	BM8	eBioscience
Gr1	Rat	VioBlue		IgG2b	RB6-8C5	Miltenyi
IL 23	Rat	APC		IgG2a	320244	R&D
TNF a	FITC	Rat		IgG1,k	MP6-XT22	eBioscience
IL-6	Rat	PE		IgG1,k	MP5-20F3	eBioscience
Streptavidin (IF KI67)		AF568	1:200			Invitrogen
IgG-B	Hase	biotinyliert	1:200			DakoCytomation, Gostrup
IgG-B (IF-KI 67)	Ziege	biotinyliert	1:100			

2.8 Oligonukleotide/Primer

mAktin For 5' - aga ggg aaa tcg tgc gtg ac - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
mAktin Rev 5' - caa tag tga tga cct ggc cgt - 3'	TIB MOLBIOL, Berlin
IL-22 For 5' - GTCAACCGCACCTTTATGCT – 3'	Sigma, München
IL-22 Rev 5' – CATGTAGGGCTGGAACCTGT – 3'	Sigma, München

2.9 Software und Internetdienste

FlowJo Tree Star Inc.,	Ashland, OR, USA
AxioVision Vs40 4.8.2.0	Carl Zeiss, Oberkochen
BD FACSDiva Software 6.0	BD, Heidelberg
LightCycler® 480 SW 1.5	Roche, Mannheim
LightCycler3 Version 3.5	Roche, Mannheim
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington
Mirax Viewer 1.12	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
Pubmed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Pubmed Nucleotide	http://www.pubmed.com/nucleotide
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Mäuse & Tierhaltung

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 21°C und einer mittleren Luftfeuchtigkeit von 55% gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in den Tierställen der Universität Regensburg gehalten. Die Tiere hatten einen 12-Stunden Tag-Nacht Rhythmus und erhielten eine speziesspezifische Diät sowie Flüssigkeit ad libitum.

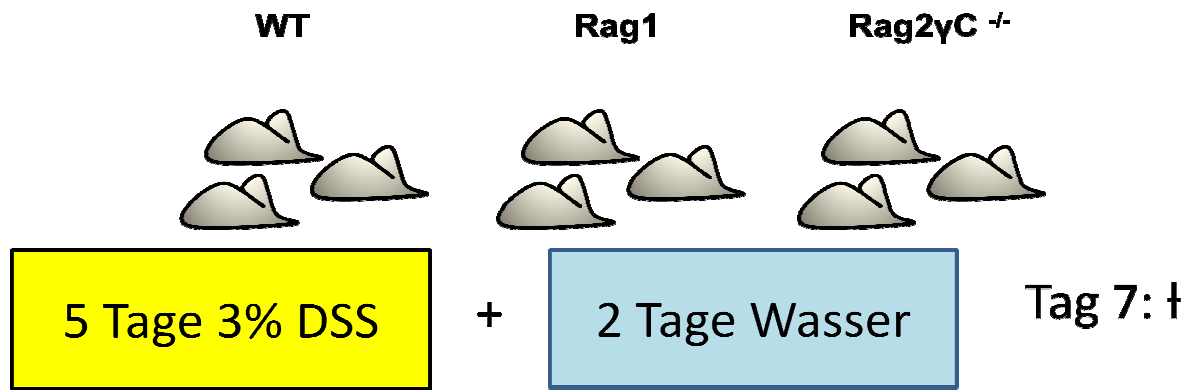
Die C57BL/6 Mäuse waren in Typ-3 Käfigen untergebracht, wohingegen die immundefizienten B6-*Rag2^{tm1Fwa} Il2rg^{tm1Wjl}* und *Rag1^{-/-}*-Mäuse in gewissen IVC-Käfigen (IIL/2) gehalten wurden, welche der Luftfilterung dienen.

Die pathogenfreien Tiere hatten ein mittleres Gewicht von 20 g bei Versuchsbeginn.

3.1.2 Induktion einer akuten und chronischen Kolitis mittels Dextran-Sulfat-Sodium (DSS)

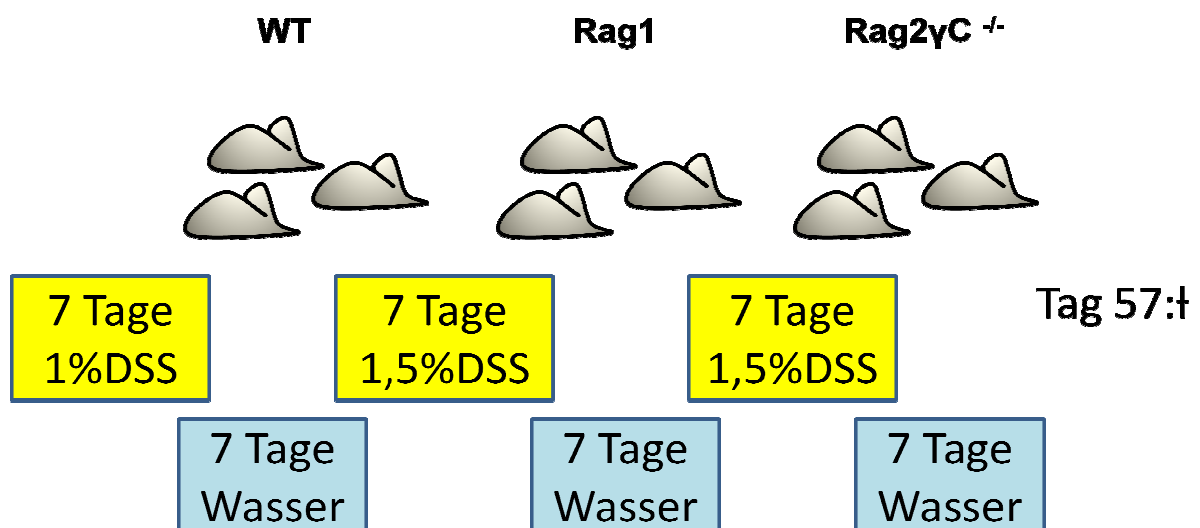
Den gesunden Tieren wurde das Polymer Dextran-Sulfat-Sodium (DSS) in einer bestimmten Menge (je nachdem ob eine chronische oder akute Kolitis induziert wurde) über mehrere Tage in das Trinkwasser gegeben um eine Entzündung des Dickdarmes auszulösen. Die vermeintliche Toxizität des DSS führt zu einer Destruktion der epithelialen Barriere, daraus resultierend zu Lymphozyteninfiltrationen in submuköses Gewebe.

Bei der akuten DSS-Kolitis bekamen die Mäuse über 5 Tage 5% DSS-Lösung, die restlichen 2 Tage reines Leitungswasser. Das Körpergewicht der Tiere wurde täglich bestimmt. An Tag 7 wurde der Versuch beendet und die Organe (distales und proximales Kolon) entnommen. Der Bauchraum der Mäuse wurde hierzu geöffnet, das Kolon proximal vom Ileum bzw. 1 cm proximal des terminalen Ileums und distal proximal der Ampulla recti abgesetzt. Anschließend wurde das Kolon von Fett befreit und in PBS gewaschen. Nun wurden sowohl vom proximalen sowie vom distalen Kolon bzw. vom Ileum ca. 4 mm dicke Scheiben abgeschnitten, um in Histokassetten zunächst in Formalin eingebettet zu werden.



6: Modell der akuten DSS-Kolitis

Die chronische DSS-Kolitis wurde in 3 Zyklen à 2 Wochen aufgeteilt. Die Tiere bekamen jeweils 1 Woche lang 1,5 % bzw. 1% DSS-Lösung, danach 1 Woche reines Leitungswasser. So bestand über die Zeitspanne von 6 Wochen eine Inflammation im Dickdarm der Tiere. Hier wurde das Körpergewicht der Mäuse wöchentlich bestimmt. An Tag 57 wurde der Versuch beendet, die Tiere durch Genickbruch getötet und die Organentnahme (distales und proximales Kolon) durchgeführt. Der Bauchraum der Mäuse wurde hierzu geöffnet, das Kolon proximal vom Ileum und proximal der Ampulla recti abgesetzt. Anschließend wurde das Kolon von Fett befreit und in PBS gewaschen. Nun wurden sowohl vom proximalen sowie vom distalen Kolon bzw. vom Ileum ca. 4 mm dicke Scheiben abgeschnitten, um in Histokassetten zunächst in Formalin eingebettet zu werden



7: Modell der chronischen DSS-Kolitis

Methoden

Zu jeder DSS-Versuchstiergruppe gab es jeweils eine negative Kontrollgruppe, welche über den Versuchszeitraum lediglich mit Leitungswasser versorgt wurde.

3.1.3 Gewichtsverlust

Während der Versuchsdauer wurde das Gewicht der Tiere, bei der akuten täglich und bei der chronischen Kolitis wöchentlich, bestimmt. Die Abweichung des Körpergewichts der Mäuse ausgehend vom Ursprungsgewicht wurde prozentual in einem Diagramm dargestellt.

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Präparation der Kolonpräparate nach Organentnahme

Die entnommenen Kolonstücke wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom wurden aus den gekühlten Paraffinblöcken 3µm dicke Schnitte angefertigt, welche in einem 47°C heißen Wasserbad auf Objektträger gezogen wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 48 Stunden in einem Wärmerraum gelagert und konnten dann für histologische Analysen weiterverarbeitet werden.

3.2.2 HE-Färbung (Hämatoxylin/Eosin)

Um die Schnitte zu färben wurden sie zunächst 2x10 Minuten in Rotihistol entparaffiniert. Nun wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe hydratisiert (jeweils 5 Minuten in 99% - 70% Ethanol). Nachdem die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen wurden, wurden sie für ca. 3 Minuten in Hämalaun gestellt, welches v.a. Zellkerne und Mitochondrien, also anionische Zellbestandteile anfärbt. Nun wurden die Schnitte wiederum mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in Leitungswasser gebläut, was zu einem Farbumschlag nach blau führte. Das Zytoplasma wurde mittels des Eosin sichtbar gemacht, welches kationische Verbindungen pink anfärbte. Nach einer ca. 3 Minuten andauernden Färbung wurden die Schnitte abermals in destilliertem Wasser gespült. In der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte wieder dehydratisiert. Abschließend wurden die Präparate mit dem Medium Enthellan (Merck, Darmstadt) und einem Deckglas luftdicht eingedeckelt.

Die HE-Färbung bildete die Grundlage zur Erstellung von Histoscores, um die verschiedenen Maustypen in ihrer inflammatorischen Aktivität zu unterscheiden.

Methoden

3.2.3 Histologischer Score

Mit dem histologischen Score sollte die intestinale Entzündungsaktivität der jeweiligen Versuchsgruppe ermittelt werden. Hierzu wurden nach den Kolitis-Versuchen HE-Färbungen von distalem und proximalem Kolon von jeder Maus der verschiedenen Versuchsgruppen angefertigt. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend eingescannt und konnten nun mit dem Programm Mirax Viewer 1.12 von 3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn in verschiedenen Vergrößerungen bei sehr guter Bildqualität beurteilt werden:

Score	Kriterien
0	Keine Leukozyteninfiltrationen
1	Geringe Leukozyteninfiltration
2	Mäßige Leukozyteninfiltration
3	Starke Leukozyteninfiltration, verstärkte Vaskularisierung, Verdickung der Kolonwand
4	Transmurale Leukozyteninfiltration, starke Vaskularisierung und Verdickung der Kolonwand

Es wurde jedem Versuchstier jeweils von distalem und proximalem Kolon ein eigener Wert zugeteilt.

3.2.4 Immunhistochemie (IH) Ki-67

Mittels IH lassen sich Proteine und Saccharide durch die Bindung eines Antikörpers, welcher für das zu detektierende Molekül hochspezifisch ist, gezielt nachweisen. Es können zum Beispiel polyklonale Antikörper verwendet werden, welche ein Gemisch aus Antikörpern gegen verschiedene Epitope eines Antigens darstellen. Die alternativen monoklonalen Antikörper erkennen lediglich ein Epitop des Antigens und sind deswegen weitaus spezifischer als polyklonale Antikörper.

Wie auch schon bei der HE-Färbung wurden bei der IH die zu färbenden Schnitte zunächst entparaffiniert und hydratisiert. In einem Zitratpuffer mit pH-Wert 6 wurden die Schnitte für 10 Minuten gekocht, anschließend kühlten sie ca. 20 Minuten im Puffer aus. Die Schnitte wurden mit destilliertem Wasser gespült und für 10 Minuten in 0,3 % H₂O₂ gestellt. Nach anschließender Spülung mit destilliertem Wasser und 1xT-TBS Puffer wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem

Methoden

Blockserum (in diesem Fall Ziegenserum) inkubiert um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers auszuschließen. Dieser (in diesem Fall KI-67) wurde in einer Verdünnung von 1:25 mit Blockserum auf die Schnitte gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurde der Antikörper mit destilliertem Wasser und 1xT-TBS abgewaschen und die Schnitte mit dem 1:100 in Blockserum verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper goat-ant-Rat Fab für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abermals wurden die Schnitte mit 1x T-TBS gewaschen um überschüssige Bindungen und Rückstände zu vermeiden. Nun wurde Streptavidin-HRP Reagenz, eine Meerrettich-Peroxidase, die an den biotinylierten Primärantikörper bindet, für 15 Minuten auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem Waschvorgang mit 1x T-TBS wurde das zu detektierende Antigen durch das chromogene Peroxidasesubstrat DAB bräunlich angefärbt. Abschließend wurde mit Hämalaun gegengefärbt, um die Zellkerne darzustellen. Nach dem Bläuungsvorgang wurden die Schnitte luftdicht mit Aquatex, einem hydrophilen Medium, eingedeckelt. Zu jeder IH wurde eine Negativkontrolle angefertigt, ein Schnitt, welcher nicht mit dem Primärantikörper behandelt wurde.

KI-67 stellt einen Zellproliferationsmarker dar, welcher vor allem während den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird.

3.2.4.1 Immunfluoreszenzvariante Ki-67

Alternativ zu der oben beschriebenen herkömmlichen Immunhistochemie kann der Oberflächenmarker Ki-67 auch mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie in diesem Fall AlexaFluor568 markiert werden und mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop, zum Beispiel Axio Observer Z1 von Zeiss, anschließend betrachtet werden. Die Arbeitsschritte bei dieser Variante sind identisch mit denen, welche in 2.2.4 beschrieben wurden. Es wurde allerdings ein anderer Tertiärantikörper verwendet, nämlich anti-mouse Streptavidin Alexa 568, welcher in einer Verdünnung von 1:200 in Blockserum für eine Stunde auf die Schnitte gegeben wird. Die Kernfärbung erfolgt bei Immunfluoreszenzfärbungen nicht mit Hämalaun, sondern mit dem Hoechst-Reagenz, welches für 5 Minuten auf den Schnitten weilt bevor es mit 1x T-TBS abgewaschen wird. Abschließend werden die Schnitte mit Deckgläsern und dem Mounting-Medium Aquatex eingedeckelt und können nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.2.5 Alcianblau-PAS-Färbung

Diese Färbung gehört mit der HE-Färbung zu den am häufigsten eingesetzten Färbetechniken. Die Periodsäure oxidiert Glykole und Aminogruppen, das Produkt reagiert anschließend mit dem Schiffs-Reagenz, es entsteht so eine magentafarbene Anfärbung der genannten Zellbestandteile.

Polysaccharide, neutrale Mucopolysaccharide, Glykolipide, Glykoproteine, ungesättigte Fette etc. lassen sich besonders gut durch die PAS-Färbung darstellen. Mittels Alcianblau, welches einen pH-Wert von 2,5 aufweist, lassen sich saure Mukopolysaccharide gut anfärben.

Wie schon bei der IH und HE erläutert, wurden die Schnitte zuerst entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydratisiert. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für ca. 5 Minuten in eine Lösung mit Alcianblau gestellt. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 3 Minuten mit fließendem Leitungswasser umspült und danach wieder mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach 10 Minuten Inkubation in Periodsäure wurde wieder mit Leitungswasser und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Das Schiffs-Reagenz, in welches die Schnitte danach für 15 Minuten gestellt wurden, färbt die Strukturen des Zytoplasmas pinkrot an. Nach einem wiederholten Waschvorgang wurden die Schnitte mit der Kernfärbung Hämalaun gegengefärbt. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe zur Dehydratisierung wurden die Schnitte mit Enthellan und Deckplättchen luftdicht eingedeckelt.

3.3 Quantifizierung der Zytokinexpression

3.3.1 Ex-vivo-Kolon-Kultur

Nach Tötung der Mäuse per Genickbruch wurde zunächst der Bauchraum geöffnet, anschließend das Kolon von Fett befreit und freipräpariert. Nach Absetzen desselben proximal vom terminalen Ileum und distal vom Rektum wurde der Darmabschnitt in PBS gewaschen. Nun wurde von jeder Maus der einzelnen Versuchsgruppen ein ca. 2 cm langes Kolonstück abgetrennt und dieses längs aufgeschnitten. Die Kolonstücke wurden dann versuchsgruppenweise gepoolt und für 48 Stunden in Nährmedium in 6-well Platten im Wärmeschrank inkubiert.

Die vitalen Kolonzellen produzierten so während der 2 Tage weiterhin Zytokine, welche sich im flüssigen Überstand in den Wells befanden und mittels einer Stripette nach 48 Stunden abgenommen wurden. Nun konnten die verschiedenen

Methoden

Mauspopulationen bzw. ihre negativen Kontrollgruppen mittels ELISA bezüglich ihrer Zytokinproduktion untersucht werden.

3.3.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Aus den Überständen der Ex-vivo-Kolon-Kultur wurden verschiedene Zytokine (TNF, IL-2, IL-6, IL-22) mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Es handelt sich hierbei um ein enzymgekoppeltes immunologisches Nachweisverfahren von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen. Ein monoklonaler Antikörper, an welchen ein Enzym (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist, bindet spezifisch an ein Antigen. Durch Zugabe eines für das Enzym passenden Substrates kommt es zu einer Farbreaktion. Je intensiver die Färbung, desto höher die Antigenkonzentration in der jeweiligen Probe. Die Konzentration des nachzuweisenden Zytokins wird photometrisch bestimmt. Überschüssige Antikörper werden in zahlreichen Waschvorgängen abgespült, sodass es bei Einhaltung des Protokolls zu keinen falsch hohen Werten kommt.

Das Schema, nach welchem beim ELISA vorgegangen wird, ist unabhängig vom Hersteller meist sehr ähnlich:

Es wurde eine immuno 96 MicroWell Platte verwendet. Sowohl die Standardkurve (7 Standards + Negativkontrolle) als auch die zu bestimmenden Proben wurden doppelt angesetzt. So errechnete sich die Anzahl der Wells. Zunächst wurden je 100 µl Capture Antibody, den Angaben entsprechend in Coating Buffer verdünnt in jedes Well gegeben. Der Capture Antibody bindet mit seinem Fc-Fragment an den Boden des Wells. Durch diese Haftung wird verhindert, dass bei den folgenden Waschvorgängen der Antikörper-Antigenkomplex weggespült wird. Die Platte wurde nun versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells mit einer Waschlösung 3x gespült, anschließend wurde die Platte auf Zellophanpapier ausgeklopft um möglichst alle Waschrückstände zu beseitigen. Mit 300 µL pro Well Assay Diluent wurden unspezifische Bindungen blockiert. Das Blockiermedium blieb für 1 Stunde versiegelt bei Raumtemperatur auf den Proben. Nun wurde der vorherige Waschvorgang identisch wiederholt, das Assay Diluent wurde abgewaschen. Je 100 µL der vorbereiteten Standards und Proben wurden in die Wells gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung der Proben hing von dem nachzuweisenden Zytokin ab und variierte recht stark. Die Standardkonzentrationen sind in den Protokollen vorgegeben, die Negativkontrollen bestanden immer aus reinem Assay Diluent. Es folgte ein weiterer Waschvorgang,

Methoden

mit dem einzigen Unterschied, dass 5x gewaschen wurde anstatt 3x. Nun wurden 100 µL Working Detector, bestehend aus dem Detection Antibody und gebundenem Enzym in jedes Well gegeben und für 1 Stunde versiegelt bei Raumtemperatur inkubiert. Da der Detection Antibody eine höhere Affinität zu dem nachzuweisenden Antigen hat als das Blockiermedium, wurde dieses kompetitiv verdrängt. Anschließend wurde 7x gewaschen. Nachdem 100 µL Substratlösung in jedes Well gegeben wurden, wurde die Platte für 30 Minuten unversiegelt in einen lichtgeschützten Bereich gestellt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 30 µL Stop Solution pro Well beendet. Innerhalb der folgenden 30 Minuten wurde mittels Photometer bei Wellenlängensubtraktion 450 nm – 570 nm die Farbintensität jedes einzelnen Wells bestimmt. Mithilfe des Computerprogrammes SoftMax und der Standardkurve konnten schließlich die Zytokinkonzentrationen in den verschiedenen Proben ermittelt werden.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 MACS-Sort/magnetische Sortierung von Nkp46 positiven Milzzellen

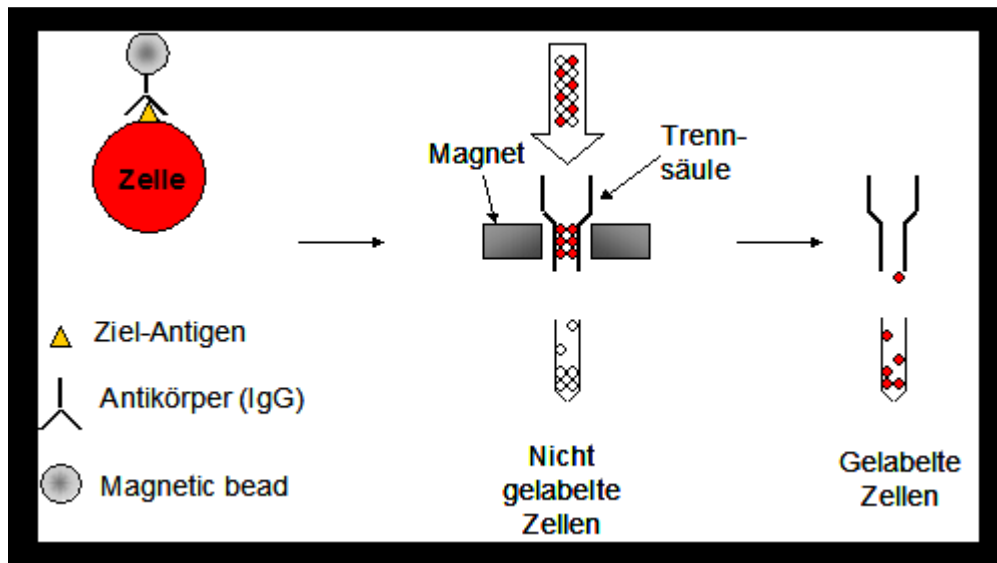
Durch die magnetische Sortierung von Zellsuspensionen ist es möglich, Zellen mit bestimmten Oberflächenmerkmalen herauszufiltern bzw. diese aus einem Zellgemisch zu eliminieren. Für ein beliebiges Oberflächenmerkmal spezifische biotinylierte Antikörper (z.B. Anti-Nkp46) binden an ihr Antigen. Gegen Biotin gerichtete superparamagnetische Nanopartikel, sogenannte Microbeads, binden nun an den Antikörper. Die Zellsuspension wird über eine, in einem starken Magnetfeld installierte speziell beschichtete Säule gegeben, welche die Microbeads zurückhält bzw. anzieht. Der Durchlauf enthält nur Zellen, welche das antikörperspezifische Antigen nicht enthalten. Im Folgenden wird auf den MACS-Sort in detaillierter Form eingegangen:

Um herauszufinden, wie hoch der Anteil an Nkp46 positiven Zellen in der Milz bei Mäusen ist, wurde in einem Vorversuch sowie in allen weiterführenden Versuchen ein MACS-Sort auf Nkp46 positive Zellen mit anschließendem FACS durchgeführt. Die Vorselektion durch MACS-Sort erleichterte die spätere FACS-Analyse und führte zu anschaulicheren Ergebnissen.

Die entnommenen Milzen wurden in Eppendorfcups in HBSS (Hank's buffered salt solution) eingelegt. Mittels eines Spritzenstempels wurden die nun kleingeschnittenen Milzen über ein Sieb (70 µm) in ein 50 mL Falcon gedrückt.

Methoden

Mittels HBSS wurden die Zellen befeuchtet bzw. gespült. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 1500 rpm setzten sich die Zellen als Pellet ab, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL Erylysepuffer pro Milz für 5 Minuten resuspendiert, um im Pellet vorhandene Erythrozyten zu zerstören. Die Zellsuspension wurde mit HBSS auf 10 mL aufgefüllt und anschließend wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 mL HBSS aufgenommen, die Zellsuspension wurde abermals auf ein Sieb gegeben, um den Zelldetritus herauszufiltern. Mittels Trypanblau-Exklusion wurde nun die Anzahl der vitalen Milzzellen mittels der Neubauer-Zählkammer erfasst. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen. Nun wurde der biotinylierte Nkp46 Antikörper auf die Lösung gegeben. Antikörper und MACS-Puffer Volumina richteten sich nach der zu sortierenden Zellzahl. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4°C und Zentrifugierung wurde das Pellet wiederum mit MACS-Puffer resuspendiert. Magnetisch wirksame anti-Biotin MicroBeads wurden in ihrer Menge entsprechend der Zellzahl auf die Suspension gegeben, sie binden an den biotinylierten Nkp46 Antikörper. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C, Zugabe von 20 mL MACS und Zentrifugieren wurde das entstandene Pellet in 3 mL MACS-Puffer aufgenommen und über einen Sieb (50 µm) in ein neues Falcon gegeben. Die Zellsuspension wurde nun über die sogenannte MACS-Säule gegeben. Die an magnetische Beads gebundenen Nkp46 positiven Zellen blieben in der Säule haften, man nennt dies eine positive Selektion. Die Säule wurde nun von dem Magnet entfernt und auf ein 15 mL Falcon gestellt. Die Nkp46 positiven Zellen/ Positivfraktion wurden mittels MACS-Puffer und einem Spritzenstempel herausgewaschen bzw. gedrückt und konnten nun entweder für eine durchflusszytometrische Analyse oder auch für die Herstellung von complementary-DNA mit anschließender PCR verwendet werden.



8: magnetische Zellsortierung

Quelle: <http://www.uni-leipzig.de/~pharm/phatech>

3.4.2 LPMC-Isolation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen der Lamina Propria der verschiedenen Maustypen mit und ohne induzierte Kolitis untersucht. Die Lamina propria befindet sich im intestinalen Wandaufbau zwischen Lamina epithelialis und Lamina muscularis mucosae und beherbergt neben retikulärem Bindegewebe Blutkapillaren, Lymphgefäße, Nerven und vor allem die hier untersuchten zahlreichen freien Abwehrzellen.

Es wurden jeweils die Kolonstücke einer Versuchsgruppe (z.B. WT mit DSS), welcher jeweils 5 Tiere angehörten, gepoolt. Bei der Organentnahme wurde jeweils das Kolon der Tiere entfernt, von Fettgewebe mechanisch gesäubert, und pro Maus ein 1 cm langes Stück Kolon längs aufgetrennt und in kaltem PBS (Phosphate-buffered Saline) gewaschen.

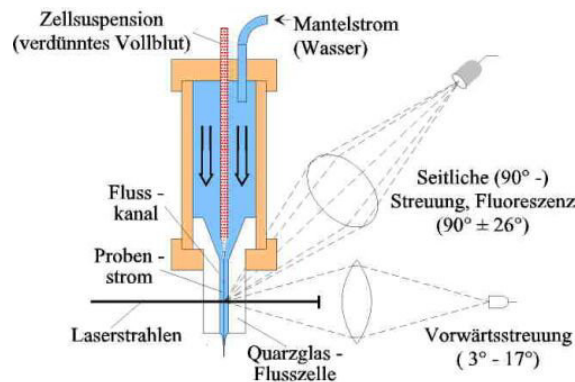
So gab es jeweils drei Proben der verschiedenen Maustypen mit induzierter Kolitis und diesen zugeordnet drei Negativkontrollen. (bei welchen es sich um kolitisfreie Tiere handelte.) Nun wurde jeweils die Hälfte der einzelnen Kolonstücke einer Probe für 20 Minuten in einem 50 mL Falcon mit je 5 mL Predigestion Solution unter starker Rotation bei 37°C inkubiert. Die Predigestion Solution setzt sich zusammen aus HBSS, 5 mM EDTA und 1 mM DTT und sollte vor dem Versuch frisch hergestellt werden, um anschließend kurz bei 37°C inkubiert zu werden. Mit einer 5 mL Stripette wurde anschließend der flüssige Überstand, welcher vor allem Epithelzellen enthielt,

Methoden

abgesaugt und verworfen. Erneut wurden die Proben mit frischer Predigestion Solution inkubiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Der im Falcon verbliebene Rest, bestehend aus Lamina Propria und Lamina Muscularis, wurde jeweils über ein 100 µm Sieb gegeben, wobei noch verbliebene größere Kolonstücke mittels einer Schere auf ca. 1 mm große Stücke auf dem Sieb verkleinert wurden. Um das EDTA aus dem Gewebe zu waschen wurde zusätzlich PBS über das Sieb gegeben. Die anfangs halbierten Proben wurden im nächsten Schritt in einem 50 mL Falcon wieder zusammengeführt und mit 5 mL der Digestion Solution unter starker Rotation bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Die Digestion Solution bestehend aus PBS, CollagenaseD, DNase I und Dispase II, diente dem weiteren Verdau der Zellen. Nachdem die Zellsuspension für 20 Sekunden gevortext wurde, wurde sie mittels eines Spritzenstempels und unter gleichzeitiger Spülung mit PBS über einen 100 µm Sieb gedrückt. Anschließend wurde der Vorgang unter Verwendung eines 40 µm Siebes wiederholt. Dieser zweifache Siebvorgang wurde nach erneuter Inkubation mit frischer Digestion Solution wiederholt. Es folgte nun ein Zentrifugationsschritt (1500rpm, 4°C, 5 Minuten) um die Zellbestandteile von der flüssigen Phase abzusetzen. Das entstandene Pellet wurde anschließend in kaltem FACS-Puffer (bestehend aus PBS und FCS = fötales Kälberserum) resuspendiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet in 40%igem Percoll (29 mL PBS+21 mL Percoll) wieder resuspendiert und die Zellsuspension in einem nächsten Schritt mittels einer 5 mL Stripette vorsichtig mit 5 mL Percoll 80%(10 mL PBS + 40 mL Percoll) überlagert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (2400 rpm, 20°C, 20 Minuten ohne Bremse!) bei welchem sich deutlich ein Zweiphasensystem abzeichnete, bedingt durch die unterschiedlichen Percoll-Gemische. Zelldetritus sammelte sich am Boden der Falcons, im Gegensatz dazu konnte man Epithelzellen an der Oberfläche finden. Die Zellen der Lamina Propria bildeten als weißer Ring die Interphase, Erythrozyten lagerten sich dieser als roter Streifen von unten an. Die Interphase wurde nun mit einer Glaspipette vorsichtig abgesaugt, in ein 15 mL Falcon überführt, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1500rpm, 4°C, 5 Minuten). Zum Schluss wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und konnten nach einer Zählung derselben zur weiteren FACS-Analyse verwendet werden.

3.4.3 Durchflusszytometrie /FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen bezüglich verschiedenster Merkmale zu analysieren. Die Zellen gelangen über eine Kapillare in ein Gerät und passieren dort einzeln einen Lichtstrahl einer bestimmten Wellenlänge. Trifft der Strahl auf die Zellen, wird Licht gestreut. Dieses wird genutzt, um eine Charakterisierung der Zellen bezüglich ihrer Größe und Granularität vorzunehmen. Das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter) lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zellen zu, wohingegen das Seitstreulicht (Sideward-Scatter), welches im rechten Winkel zur Lichtquelle gemessen wird Hinweise auf die Granularität und die Größe des Zellkerns zulässt. Die zwei Größen werden in einem Diagramm aufgetragen, es lassen sich einzelne Zellpopulationen unterscheiden. Es können auch Oberflächenmerkmale von Zellen mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Antikörper markiert werden und bei Passage des Laserstrahls (mit entsprechender Anregungswellenlänge) quantitativ aufgrund der Lichtemission erfasst werden.



9: Prinzip der Durchflusszytometrie

Quelle: www.ptb.de

3.4.3.1 Surface Staining

Die durch MACS-Sort gewonnenen Nkp46 positiven Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Oberflächenproteine, Größe und Granularität genauer untersucht. In jedes FACS-Tube wurden ca. 1 Million Zellen gegeben. Für 15 Minuten bei 4°C in der Dunkelheit wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 30 µL 1% Mausserum inkubiert um die Fc-Rezeptoren der Zellen zu blockieren. In einem Waschvorgang wurde auf die Zelllösung je 1 mL Macs Puffer gegeben, bei 1500 rpm und 4°C wurde anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde durch leichtes Aufklopfen mit der Restflüssigkeit in Lösung gebracht. Es wurde je 1 µL des

Methoden

fluoreszenzmarkierten Extrazellulärantikörpers (Nkp46, CD27, CD11b, CD11c, Gr1, F4 80, CD45) in jedes Tube gegeben. Um nun eine optimale Bindung der Antikörper sicherzustellen, wurde die Zelllösung anschließend für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein zweiter Waschvorgang mit Macs-Puffer, worauf folgend die Zellen wieder in FACS-Puffer aufgenommen wurden und durchflusszytometrisch analysiert werden konnten.

3.4.3.2 Intrazelluläres Staining

Zusätzlich zur Zellanalyse von oberflächenmarkierten Zellen kann man mit der Durchflusszytometrie auch intrazelluläre Proteine markieren und so zum Beispiel Aussagen über die Zytokinexpression von schon mittels Surface-Staining markierten Zellen treffen. Das Färbeverfahren ist zunächst identisch mit dem der Färbung der Oberflächenmarker. Es ist etwas langwieriger, da die Zellen fixiert und für Antikörper permeabel gemacht werden müssen.

Nach dem zweiten Waschvorgang mit Macs-Puffer wurden 500 µL Flow Cytometry Fixation Buffer pro FACS-Tube gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang, das Pellet wurde hier durch leichtes Schütteln resuspendiert. Mit 500 µL Flow Cytometry Permeabilization Buffer wurde abermals gewaschen und zentrifugiert. 1 µL des intrazellulären Antikörpers (IL-22, IL-6, IL-23, TNF- α) wurde in Permeabilization Buffer auf die Proben, bzw. in jedes FACS-Tube gegeben und bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach 20 Minuten wurde ein fünfter Waschvorgang mit Flow Cytometric Permeabilization Buffer durchgeführt, anschließend wurden die Zellen in 100–200 µL Macs-Puffer resuspendiert und konnten nun für die Analyse verwendet werden.

3.4.3.3 Kompensation

Um möglichst alle Störeffekte bei der Durchflusszytometrie ausschließen zu können, wird normalerweise sowohl eine Isotypenkontrolle als auch eine Backgroundkontrolle, d.h. durchflußzytometrisches Messen ungefärbter Zellen durchgeführt. Die unspezifische Anfärbung der Zellen wird durch die Isotypenkontrolle bestimmt, indem ein Antikörper des gleichen Subtyps wie der im Versuch verwendete Antikörper auf die Proben gegeben wird. Die Autofluoreszenz von Zellen konnte man ermitteln, indem man ungefärbte Zellen per FACS

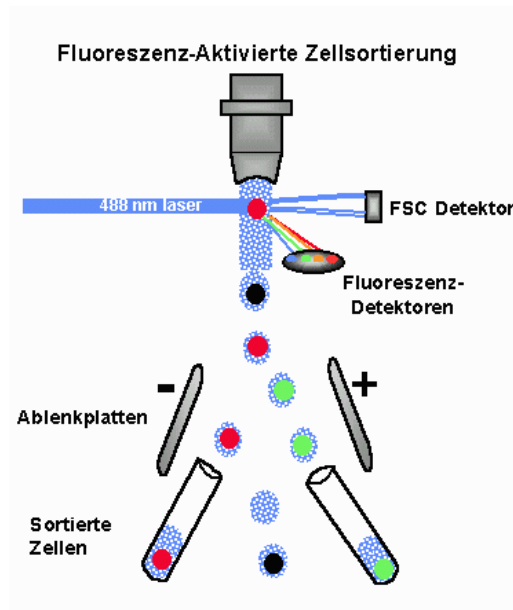
Methoden

analysierte. Für die Isotypenkontrolle wurde pro verwendete Farbe ein Tube mit jeweils 1 μL Antikörper (Ratte anti-Maus) und 2 Tropfen positiven Kompensationsbeads, welche an den Antikörper binden hergenommen. Das Gemisch wurde für 10 Minuten inkubiert und die Reaktion anschließend mit 300 μL PBS gestoppt. Das Tube mit den ungefärbten Zellen wurde lediglich mit 2 Tropfen negativen Compensation Beads versehen.

3.4.3.4 FACS-Sort

Neben der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen bezüglich verschiedenster Parameter können an dafür vorgesehenen Geräten wie z.B. BD FACSAria Zellen per Durchflusszytometrie auch hinsichtlich ihrer Oberflächenproteine sortiert werden. Dies ist zum Beispiel dann sinnvoll, wenn der MACS-Sort nicht zufriedenstellend ausfällt, d.h. wenn die erhaltene Zellsuspension nicht rein genug ist, also viele „unerwünschte“ Zellen enthält oder kein MACS-Kit für ein bestimmtes Protein verfügbar ist.

Es wurden Milzzellen der verschiedenen Mauspopulationen (WT, Rag1, Rag2 $\gamma\text{C}^{-/-}$) mit DSS-Colitis und deren negativen Kontrollgruppen gesortet. Die Vorbereitung musste im Vergleich zur durchflusszytometrischen Analyse steril ablaufen. Pro 1 Million Milzzellen wurden 30 μL steriles 1% Mausserum auf die Zellsuspensionen gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit sterilem MACS Puffer gewaschen und bei 1500 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde aufgeklopft und anschließend folgendermaßen gefärbt (Nkp46, FITC Färbung). Es wurden 0,4 μL Antikörper aus der Stocklösung pro eine Million Milzzellen auf das Pellet gegeben und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang mit sterilem MACS Puffer, anschließend mit sterilem PBS. Unmittelbar vor der Sortierung wurden je 20 Millionen Zellen mit 1mL PBS steril filtriert. Die Zellen wurden in ein 15 mL Falcon mit vorgelegtem Medium sortiert und konnten nun weiter analysiert werden



10: Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Quelle: www.ruhr-uni-bochum.de

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Kary Mullis 1983 etablierte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren bzw. spezifischer DNA-Sequenzen, welche heutzutage in der Molekularbiologie zu den meist angewandten Verfahren gehört und der somit eine immense Importanz zuteil kommt. Zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes ist die Kenntnis über die Basenabfolge eines kleinen Teils an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes notwendig, denn dieser stellt anschließend den Angriffspunkt für die sogenannten Primer dar. Primer sind Oligonukleotide, welche komplementär zu dem zu kopierenden DNA-Abschnitt (Matrize, Template) sind und an welchen die Polymerase (meist Taq-Polymerase) anschließend ansetzt, um eine copy-DNA komplementär zum Amplikom zu erstellen. Die PCR stellt ein zyklisches Verfahren dar, wobei jeder Zyklus je nach Reaktionstemperatur in unterschiedliche Phasen unterteilt werden kann:

- 1) **Denaturierung:** Die Reaktionslösung, mit den zu kopierenden DNA-Molekülen, den Primern (markieren Anfang und Ende der Matrize) und den Nukleotiden, welche als Bausteine dienen, wird auf 95°C erhitzt, was eine Trennung des DNA-Doppelstrangs bewirkt.

- 2) **Annealing:** Bei auf 55°C herabgesetzter Temperatur legen sich die Primer an ihren komplementären DNA-Abschnitt an, was als Hybridisierung bezeichnet wird. Anschließend können die Polymerasen mit dem Anbau von Nukleotiden beginnen.
- 3) **Elongation:** Abhängig von der verwendeten hitzestabilen Polymerase (i.d.R. taq-Polymerase), beträgt deren ideale Arbeitstemperatur zwischen 70-75°C, bei welcher nun komplementär zur Matrize weitere Nukleotide (die Triphosphat-Nukleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP, allgemeinen als dNTPs bezeichnet) an die Primer angebaut werden.

Das Enzym Polymerase baut solange Nukleotide an, bis der kopierte Strang sich von selbst von der Matrize löst, die Inkubationstemperatur auf 95 °C gesteigert wird oder keine Nukleotide mehr in Lösung sind. Neu entstandene DNA-Moleküle stehen dann im nächsten Zyklus zur weiteren Amplifikation erneut zur Verfügung. Theoretisch könnte man aus einer PCR-Reaktion die ursprünglich vorhandene DNA-Menge ausrechnen, denn pro Zyklus verdoppelt sich die vorhandene DNA, sodass man nach zwei Zyklen 4 und nach 3 Zyklen 8 Kopien der ursprünglichen Sequenz vorfinden sollte. Es handelt sich theoretisch um ein exponentielles Wachstum mit dem Multiplikationsfaktor 2. Praktisch ist dies dennoch nicht der Fall, hier beträgt der Faktor lediglich 1,6 bis 1,7. Begründen kann man dies durch die nicht ganz optimalen Bedingungen für die Polymerasen: anfangs wird die Kapazität des Enzymes durch die geringe Menge an Templaten nicht genutzt, gegen Ende der PCR-Reaktion ist die Effizienz der Polymerasen durch den ständigen Temperaturwechsel herabgesetzt. Außerdem wird deren Arbeit dadurch „behindert“, dass es bei höherer Anzahl an DNA-Kopien häufig zu Bindungen der Produkte untereinander kommt. Zusätzlich ist die Leistung der Enzyme aber natürlich auch abhängig von der Anzahl der bereitstehenden Nukleotide, welche im Laufe der Reaktion stark abnimmt. An dieser Stelle muss auch erwähnt werden, dass die PCR zusätzlich durch mehrere zufällige Faktoren beeinflusst wird, sodass zusammenfassend zu sagen ist, dass man mit der konventionellen PCR Methode keine Aussagen über die vorhandene Menge an DNA-Sequenzen, weder zu Beginn, noch am Ende der Reaktion treffen kann. Hierfür eignen sich andere PCR Verfahren, wie zum Beispiel die real-time PCR.

3.5.2 mRNA-Isolation

Bei der Durchführung der RNA-Isolation wurde ausschließlich auf Eis gearbeitet und es wurden zudem Filterspitzen und RNAase freie Plastikware verwendet, um die Gefahr der Probenkontamination durch endogene und exogene RNAsen möglichst gering zu halten. Aufgrund des gesundheitsgefährdenden Trizols wurde außerdem im Abzug gearbeitet.

Das Medium der durch MACS-Sort isolierten Nkp46-positiven Zellen, welche sich in einer 6-Well Platte befanden, wurde vorsichtig abgesaugt. Um der Austrocknung der Zellen entgegenzuwirken, wurde anschließend pro Gruppe/Well 1 mL Trizol hinzugegeben und die Zellen so resuspendiert.

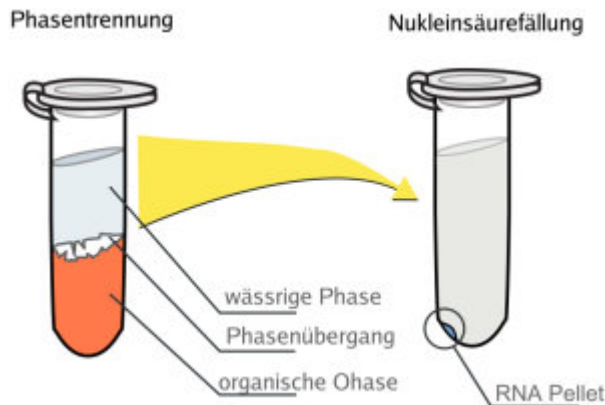
Anschließend wurden die Zellsuspensionen der einzelnen Wells in 2 mL Eppendorf Cups überführt. Durch die Zugabe von Trizol zu den Zellen wurden diese homogenisiert.

Nun wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde auf jedes Cup 200 μ L Chloroform gegeben, die Proben wurden per Hand 15 Sekunden „end-over“ leicht geschüttelt um dann für 5 Minuten bei 4°C inkubiert zu werden. Als nächstes wurden die Proben zentrifugiert (15 Min, 4°C, 12000 rpm), wobei man eine 3-Phasen Bildung beobachten konnte.

Am Boden der Cups entstand eine organische rote Phenol-Chloroform Phase in welcher sich die genomische DNA angesammelt hatte. In der Mitte, der sogenannten Interphase, sammelten sich Proteine an, während sich in der obersten farblosen wässrigen Schicht sich die Nukleinsäuren bzw. RNA anreicherte. Die obere der Cups wurde jeweils in ein frisches 1,5 mL Cup überführt und ca. 400 μ L Isopropanol hinzugegeben. Wiederum wurden die Proben per Hand „end-over“ leicht geschüttelt bis sich keine Schlieren mehr gebildet hatten, um anschließend einen Zentrifugierschritt (14 Min, 4°C, 12000 rpm) durchzuführen. Vorsichtig wurde mit einer 1000 μ L Pipette der Überstand abgesaugt und verworfen, ohne das entstandene Pellet zu zerstören. Zur Reinigung der RNA wurde nun in jedes Cup 800 μ L 75% Ethanol gegeben und anschließend im Vortexer gemischt, wobei ein sogenanntes Federpellet entstand. Wiederum wurde ein Zentrifugierschritt (5 Min, 4°C, 7500 rpm) durchgeführt, wobei der Überstand nach der Zentrifugation wieder abpipettiert wurde. Unter dem Abzug wurde die RNA in den Cups dann je nach Größe des Pellets 10- 30 Minuten lang getrocknet. Abschließend wurde die RNA in DEPC behandeltem Wasser gelöst und konnte nun entweder bei -20°C konserviert

Methoden

werden, oder wie in unserem Fall es wurde eine Messung des RNA-Gehaltes mittels Photometer durchgeführt.



11: Phasentrennung

Quelle: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/4/47/PhOH-CHCl3_extraction-de.svg

3.5.3 Messung des RNA-Gehaltes

Mittels des Photometers Eppendorf konnte der Nukleinsäuregehalt der jeweiligen Proben durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum, sodass eine OD₂₆₀ von 1,0 einem RNA-Gehalt von 40 µg/mL entspricht. Zur Beurteilung der Reinheit der RNA sollte der Quotient der OD bei 260 nm zu der bei 280 nm ins Verhältnis gesetzt werden, denn Eiweiße erreichen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient der beiden ermittelten Werte sollte mindestens 1,8 betragen. Es wurden jeweils 2 µL der RNA-haltigen Proben mit 58 µL DEPC behandeltem Wasser vermischt (entspricht einer Verdünnung 1:30), in eine Quarzküvette gegeben und der Nukleinsäuregehalt per Photometer vermessen. Der erhaltene Wert wurde in ng RNA/µL angegeben.

3.5.4 Reverse Transkriptase

Um die per mRNA-Isolation gewonnene Nukleinsäure mittels PCR untersuchen zu können, ist es notwendig die mRNA mittels des Enzymes „Reverse Transkriptase“ in complementary-DNA (cDNA) zu überführen. Hierfür wurde ausschließlich mRNA mit einem Reinheitsgrad von 1,65-1,85 verwendet. Bei dem Vorgang der reversen Transkription schreibt das Enzym ausgehend von Primern, welche zu einem RNA-Abschnitt komplementär sind, die als Matrize dienende RNA in c-DNA um. Die c-DNA wurde mittels des QPCR cDNA Synthesis Kits durchgeführt, umgeschrieben wurden aufgrund des niedrigen RNA Gehaltes der einzelnen Versuchsgruppen

Methoden

jeweils unterschiedliche Mengen an RNA. Zunächst wurde die entsprechende Menge mRNA, 10 µL first strand master mix, 3 µL eines Oligo(dT)Primers, 1 µL Affinity Script zusammengegeben nachdem die einzelnen Komponenten vor Gebrauch gevortext wurden. Das Gemisch wurde mit RNA-ase freiem Wasser auf ein Totalvolumen von 20 µL pro Probe aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben in einen Thermoblock bei 25°C für 5 Minuten inkubiert, was zur Anlagerung der Primer an die Matrize führte. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 42 °C für 15 Minuten inkubiert, in dieser Zeit wurde die c-DNA neu synthetisiert. Abgeschlossen wurde die Reaktion in einer letzten Temperatursteigerung, nun wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten inkubiert, was zum Abbruch der DNA-Synthese führte. Die entstandene c-DNA konnte bei -20°C bis auf Weiteres konserviert oder weiterverwendet werden.

3.5.5 Herstellung einer Standardkurve („slope“)

Um für die spätere rt-PCR eine quantitative Aussage über die Expression von IL-22 in den verschiedenen Versuchsgruppen treffen zu können, ist es wichtig, eine Standardkurve zu etablieren. Der Standard weist optimalerweise eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem Zielgen auf, zudem kann er mit den gleichen Primern amplifiziert werden. Hieraus resultiert, dass es sich um das gleiche Amplikon bei Standard und IL-22 hält. Als Standard diente in dieser Arbeit zuvor per Gelextraktion aufgereinigte c-DNA.

Für die Vorbereitung der Proben für die PCR ist es wichtig, diese an einem gesondert lokalisierten Arbeitsplatz durchzuführen, welcher ausschließlich für die PCR zur Verfügung steht um das Risiko der Kontamination der Proben so gering wie möglich zu halten. Weitere Vorsichtsmaßnahmen sind die Verwendung von für die PCR vorgesehenen Filterspitzen und der regelmäßige Wechsel der Handschuhe, zudem wird auf Eis gearbeitet. Nun wurden acht Standards unterschiedlicher Verdünnungen und eine Negativkontrolle in feine Glaskapillaren pipettiert. Ausgehend von Standard 1 mit einer Verdünnung von 1:100 (99 µL DEPC Wasser + 1 µL gelgereinigte IL22 c-DNA), wurde die Verdünnungsreihe jeweils um eine Zehnerpotenz gesteigert. Jeder Standard bestand aus 18 µL des MasterMix, beinhaltend die verschiedenen Komponenten des SYBR Green Kit von Roche plus den für IL22 spezifischen Primern. Hierzu wurden jeweils 2 µL der hergestellten Verdünnungen der IL 22 c-DNA in die Kapillaren gegeben und diese anschließend mit einem Pen verschlossen.

Methoden

Um eine Kontamination der Proben auszuschließen wurde bei jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle erstellt, in welche keine c-DNA gegeben wurde. Nach Deckelung mittels Pen wurden die Kapillaren bei 0,3 rct kurz zentrifugiert und anschließend in das Karusell des LightCyclers gestellt.

3.5.6 Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

Für die PCR wurden durch MACS-Sort und FACS-Sort isolierte Nkp46 positive Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten verwendet und diese im Hinblick auf die Expression von Interleukin 22 untersucht. Zuvor musste die RNA besagter Zellen isoliert werden und in c-DNA umgeschrieben werden, wie oben beschrieben. Um ein möglichst genaues Messergebnis zu erhalten, wurde eine Standardkurve etabliert. (siehe 2.5.5)

Bei der realtime-PCR handelt es sich um eine Methode, bei welcher schon während des PCR-Laufes, also in Echtzeit, die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz visualisiert wird und so eine quantitative Aussage über die neu synthetisierte DNA getroffen werden kann. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Reporterfarbstoffes SybrGreen I von Roche, einem asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, welcher mit der ds-DNA interkaliert, wird die DNA-Menge zyklusweise nach jeder Elongation indirekt ermittelt, wobei die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge ansteigt. Angeregt wird der Farbstoff bei einer Wellenlänge von 497 nm. Da es sich bei SYBR Green um einen unspezifischen Farbstoff handelt, der sich in die minor grooves von doppelsträngiger DNA einnistet, kann es auch zu falsch positiven Signalen kommen, nämlich dann, wenn die beiden verwendeten Primer Homologien aufweisen und es zu einer Hybridisierung untereinander kommt. In diesem ungünstigen Fall kann die Taq-Polymerase am freien 5' Ende eines der Primer ansetzen, sodass eine neue ds-DNA synthetisiert wird, welche im nächsten Zyklus weiter amplifiziert wird, so auch kompetitiv zur Zielsequenz wirkt und durch unspezifische Bindung des SYBR Greens zu falsch positiven Signalen führt. Dieser Problematik lässt sich durch eine Schmelzpunktanalyse entgegenwirken. Nach der eigentlichen PCR werden die Proben ausgehend von ca. 50°C in kleinen Temperaturschritten erhitzt und aufgrund der unterschiedlichen Schmelzpunkte von Zielsequenz und den hybridisierten Primern kann man anhand des Fluoreszenzabfalles dann Artefakte z.B. durch Primer detektieren und auf die Qualität des PCR-Laufes schließen.

Methoden

Real-time PCR Geräte vereinen einen Thermocycler, welcher die eigentliche PCR durchführt, und ein Modul, welches das fluoreszierende Licht detektiert und messen kann.

Im Laufe einer PCR gibt es eine gewisse Phase, in welcher man einen exponentiellen und daher gut quantifizierbaren Anstieg des Ausgangsproduktes verzeichnen kann, wohingegen sowohl in der Anfangsphase als auch in der Schlussphase suboptimale Bedingungen, z.B. aufgrund geringer Templatmenge oder später aufgrund vieler unspezifischer Bindungen herrschen, sodass hier nicht von einem exponentiellen Anstieg gesprochen werden kann. So wird oft der CT-Wert (Cycle Treshold für Schwellenwert Zyklus) verwendet, welcher den Zyklus beschreibt, bei welchem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt. Mittels der Computersoftware von Roche (Mannheim)-LightCycler® 480 SW 1.5 und LightCycler3 Version 3.5 wurde die Auswertung vorgenommen.

Zur Vorbereitung und Anfertigung der Probengemische wurde wie bereits in 2.5.5 beschrieben vorgegangen. Jeder PCR-Lauf bestand aus zwei Standards (St. 4 und 5), der Negativkontrolle und einem dreifachen Ansatz der zu untersuchenden Proben, die in dieser Arbeit Nkp46 positive Zellen verschiedener Mausgattungen (WTB6, Rag1, Rag2 γ C^{-/-}) ohne und mit DSS induzierter Kolitis darstellten. So wurde in jede der Glaskapillaren 18 μ l des Mastermixes mit 3 molarem Magnesiumchlorid (dient der TaqPolymerase als Substrat) plus 2 μ l der entsprechenden Proben, im Falle der Standards gelgereinigte IL 22 c-DNA pipettiert. Der mitgeführten Negativkontrolle wurden keine weiteren Bestandteile zugefügt. Nachdem die Kapillaren bei 0,3 rcf für 3 Sekunden zentrifugiert wurden konnten diese in das Karussell des LightCyclers gestellt werden und der Lauf wurde gestartet.

Mittels der PCR-Reaktion sollte in dieser Arbeit die unterschiedliche Expression von IL-22 in den verschiedenen Mauspopulationen mit und ohne DSS-Kolitis aufgezeigt werden. Die Software des LightCyclers erstellt eine Amplifikationsgraphik, in welcher die Anzahl der Zyklen auf der X-Achse gegen den Anstieg der Fluoreszenz auf der Y-Achse abgebildet wird. Der CT-Wert markiert den signifikanten Anstieg der Fluoreszenz und kann in der Graphik als der Schnittpunkt zwischen Treshold (dem Schwellenwert) und Fluoreszenz markiert werden. Der Bereich vor dem starken Fluoreszenzanstieg wird als Baseline bezeichnet. Dem CT-Wert kommt eine tragende Rolle bei der quantitativen PCR zuteil, denn er stellt ein relatives Maß für

Methoden

die Anzahl der Startkopien in der PCR-Reaktion: er verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglichen Menge an Nukleinsäure. Mittels der bereits etablierten Standardkurve war es nun möglich, den in den verschiedenen Proben ermittelten CT-Werten absolute Werte zuzuordnen. Die CT-Werte der einzelnen Proben wurden in einer Microsoft Excel Tabelle dargestellt und jeweils der Mittelwert aus dem Dreifachansatz der Proben ermittelt.

Durch die Verwendung eines sogenannten Referenzgenes oder auch „housekeeping gene“ als Kontrolle konnten mögliche Fehler, vor allem methodische, die vor der eigentlichen PCR Reaktion entstanden, eliminiert werden, da diese sowohl das Referenzgen als auch das Zielgen gleichermaßen betrafen. Diese Fehler konnten durch Quotientenbildung der CT-Werte der beiden Gene herausgerechnet werden. Als Referenzgen muss ein Gen verwendet werden, das in allen Zellen konstant und in gleicher Menge exprimiert wird. In dieser Versuchsreihe wurde hierzu beta-Aktin verwendet. Die gemittelten CT-Werte des Referenzgenes wurden ebenso in einer Excel-Tabelle dargestellt und anschließend zu den CT-Werten von IL-22 ins Verhältnis gesetzt, woraus ΔCT (Normalisierung) entstand, was dann für die graphische Auswertung verwendet wurde und als relative Quantifizierung bezeichnet wird.

3.5.6.1 Primeretablierung

Die Primer wurden mittels des Programmes „Primer3“ und über PubMed Nucleotide (<http://www.pubmed.com/nucleotide>) designt. Hierbei wurde beachtet, dass die Schmelztemperatur (TM) von Sense und Anti-Sense Strang sehr ähnliche Bedingungen aufweisen. Dem GC-Gehalt kommt zudem eine bedeutsame Rolle zuteil, da die Wasserstoffbrückenbindungen eines GC-Basenpaares zur Stabilität der Doppelhelix beitragen, während die Wasserstoffbrücken eines AT-Basenpaares sogar eher destabilisierend wirken. Der GC-Gehalt sollte optimalerweise zwischen 55% bis 60% betragen; Primer, die mit einer Guanin- oder Cytosinbase beginnen, wurden bevorzugt. Abhängig von der Annealing-Temperatur der PCR wird die Länge des Primers und somit seine Schmelztemperatur gewählt, meist beträgt die Länge zwischen 18 bis 30 Nukleotiden. Die Größe des Primerproduktes, also das Amplifikat, sollte 150-250 Basenpaare beinhalten.

Methoden

Zielgen	Sequenz (5' nach 3')	Länge (bp)	T_M (°C)	GC (%)	Produktgröße
<i>IL-22 (sense)</i>	GTCAACCGCACCTTTATGCT	20	60,01	60	106
<i>IL-22 (anti-sense)</i>	CATGTAGGGCTGGAACCTGT	20	59,99	55	
<i>Aktin (sense)</i>	AG AGG GAA ATC GTG CGT GAC	20	66,4	55	138 bp
<i>Aktin (anti-sense)</i>	CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT	21	66	52,4	

3.5.7 DNA-Gelelektrophorese und -extraktion

Mittels der Gelelektrophorese lässt sich die DNA anhand ihrer Größe aufgrund unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten aufteilen. Die Poren des Agarosegels fungieren bei diesem Vorgang als Sieb für die DNA-Elemente und verkleinern sich mit ansteigender Konzentration der Agarose.

Es wurde zunächst ein Agarosegel aus 0,75 g Agarose, 50 mL 1x TAE Puffer und 20 mL Millipore Wasser hergestellt. Das Gemisch aus den verschiedenen Komponenten wurde zunächst in der Mikrowelle für 1,5 Minuten aufgekocht, um anschließend nochmal für 30 Sekunden gekocht zu werden. Das Gemisch wurde nun in ein 50 mL Falcon überführt, nach kurzer Abkühlungszeit auf ca. 60°C wurde unter dem Abzug 1 µL Ethidiumbromid zugegeben und das Gemisch geschüttelt. Das Gel wurde in eine kleine Gelkammer gegeben und mit einem Kamm wurden die parallelen Laufaschen „geprägt“. Als Laufpuffer diente 1x TAE Puffer, die verschiedenen Proben wurden in einem Verhältnis von 1:20 mit Ladepuffer versehen. Nachdem die Proben aufgetragen wurden, folgte der Lauf über ca. 30 Minuten bei 50-55V. Aufgrund der negativen Ladung der DNA konnte man eine Wanderung zur Kathode verzeichnen, wobei die Laufstrecke von der Größe des DNA-Stückes abhängt.

Nach vollendetem Lauf konnten die verschiedenen DNA-Abschnitte mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten werden. Die DNA wurde dann nach dem „MinElute DNA Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und in DEPC Wasser gelöst.

Der DNA-Gehalt wurde anschließend wie in Kapitel 2.5.3 bestimmt und die Proben auf ihre Reinheit untersucht. Die erhaltene DNA diente nun der Herstellung einer

Methoden

Standardkurve, wobei zuvor durch Gensequenzierung die Richtigkeit des Amplifikats festgestellt werden musste.

3.5.8 **Gen-Sequenzierung IL-22**

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem durch die PCR erhaltenen DNA-Kopien auch um das richtige Gen handelt, wurde das PCR-Produkt in einer Konzentration von 300 ng/ μ L nach Aufreinigung durch Gelextraktion (siehe Kapitel 2.5.7) zur Sequenzierung zu der Regensburger Firma GeneArt geschickt, welche die Sequenzdaten ein paar Tage später unserer Arbeitsgruppe per eMail zustellte.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit galt besonderes Interesse der Ausprägung von intestinalen Entzündungen in immunologisch unterschiedlich ausgestatteten Maustypen. Im Speziellen sollte diese Versuchsreihe mehr Aufschluss über die Rolle von NK-Zellen in entzündlichen Darmerkrankungen geben. Hierzu wurden neben den C57/B6-WT-Mäusen sowohl B- und T-Zell defiziente Rag1^{-/-}-Mäuse sowie B-, T- und NK-Zell defiziente Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse verwendet. Zur Entzündungsinduktion wurde sowohl ein akutes als auch ein chronisches DSS-Modell gewählt. Als „Basisversuch“ diente eine akute DSS-induzierte WT-Kolitis. Neben der Erfassung des Gewichtsverlaufes wurden Hämatoxylin/Eosin-Färbungen jeweils von proximalem und distalem Kolon der Mäuse angefertigt. Zusätzlich wurden Milz und mesenteriale Lymphknoten der verschiedenen Versuchsgruppen auf NK-Zellen untersucht. Im Folgeversuch, einer DSS-induzierten akuten Kolitis wurden alle drei Maustypen eingeschlossen. Neben dem Gewichtsverlauf wurden HE- sowie PAS-Färbungen, eine immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67 sowie durchflusszytometrische Analysen bezüglich dem Vorkommen verschiedener immunologischer Zellen in der Lamina propria und deren Zytokinexpressionsprofil durchgeführt. Außerdem wurde bei aus Milz und Lymphknoten gewonnenen NK-Zellen von WT- und Rag1^{-/-}-Mäusen das Expressionsverhalten bezüglich IL-22 untersucht. Abschließend wurde ein murines Modell der chronischen DSS-Kolitis durchgeführt.

4.1 Akute DSS-induzierte Wildtyp-Kolitis

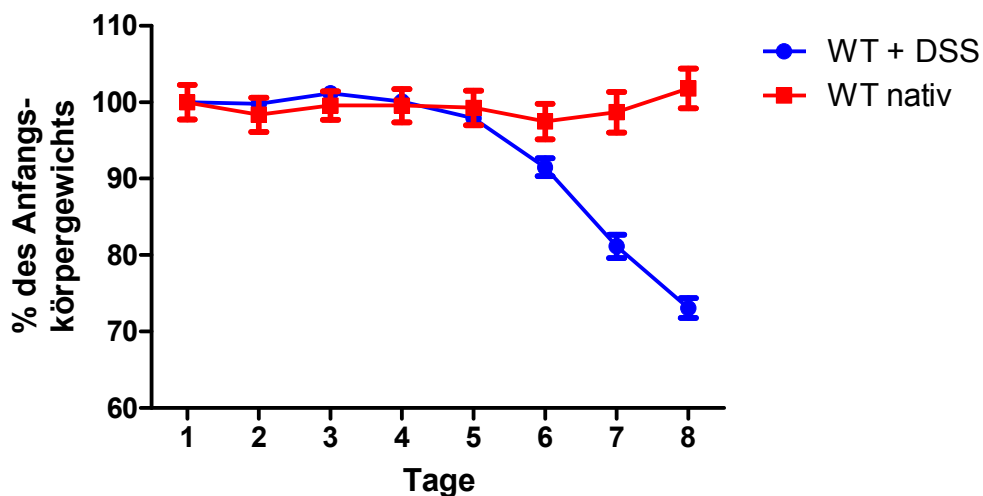
Zur Induktion einer akuten DSS-Kolitis wurden WT-Tieren (C57BL/6) über 5 Tage 5% DSS Lösung verabreicht. Anschließend erhielten sie über 2 Tage normales Leitungswasser zu Trinken. Eine weitere, als Negativkontrolle dienende Versuchsgruppe erhielt über 7 Tage lediglich Leitungswasser. Bei Versuchsbeginn betrug das Körpergewicht aller Mäuse > 21 g. Da erfahrungsgemäß bei dem akuten Modell der DSS-Kolitis nach 7-10 Tagen deutliche Gewebeschäden festzustellen sind und epitheliale Reparaturmechanismen einsetzen, wurden die Versuchsreihen mit induzierter akuter Kolitis jeweils an Tag 7 beendet.

Ergebnisse

4.1.1 Gewichtsverlauf

Da es sich bei entzündlichen Darmerkrankungen um stark konsumierende Erkrankungen handelt, wurde das Körpergewicht der Tiere täglich bestimmt um einen Eindruck über den Schweregrad der Entzündung zu bekommen. Die unterschiedlichen Gewichtskurven bei Versuchen mit mehreren Mausstämmen können wichtige Hinweise bezüglich der Entwicklung und Ausprägung der Kolitis bei Tieren mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund liefern.

In diesem ersten Versuch fielen die mit 5% DSS behandelten Tiere durch einen starken Gewichtsverlust beginnend an Tag 5 auf. Sie verloren insgesamt nahezu 30% ihres Anfangskörpergewichtes und fielen auch durch weitere klinische Symptome wie blutige Diarrhöe, Rektumprolaps, struppiges Fell und starke Bewegungsarmut auf. Die negative Kontrollgruppe zeigte keinerlei Pathologien und präsentierte über die 7 Tage einen konstanten Gewichtsverlauf.



12: Körpergewichtskurve von WT-Mäusen mit akuter DSS Kolitis gegenübergestellt zu unbehandelten Mäusen. C57BL/6-Tiere bekamen über 5 Tage eine 5% DSS Lösung als Trinkwasser, für die letzten zwei Tage des Experiments wurde auf normales Leitungswasser gewechselt. Die Mäuse wurden täglich gewogen. Das Körpergewicht wird angegeben als prozentualer Anteil des Startgewichts und wird dargestellt als Mittelwert \pm SEM ($n = 5$ Mäuse)

4.1.2 Histologie und histologischer Score

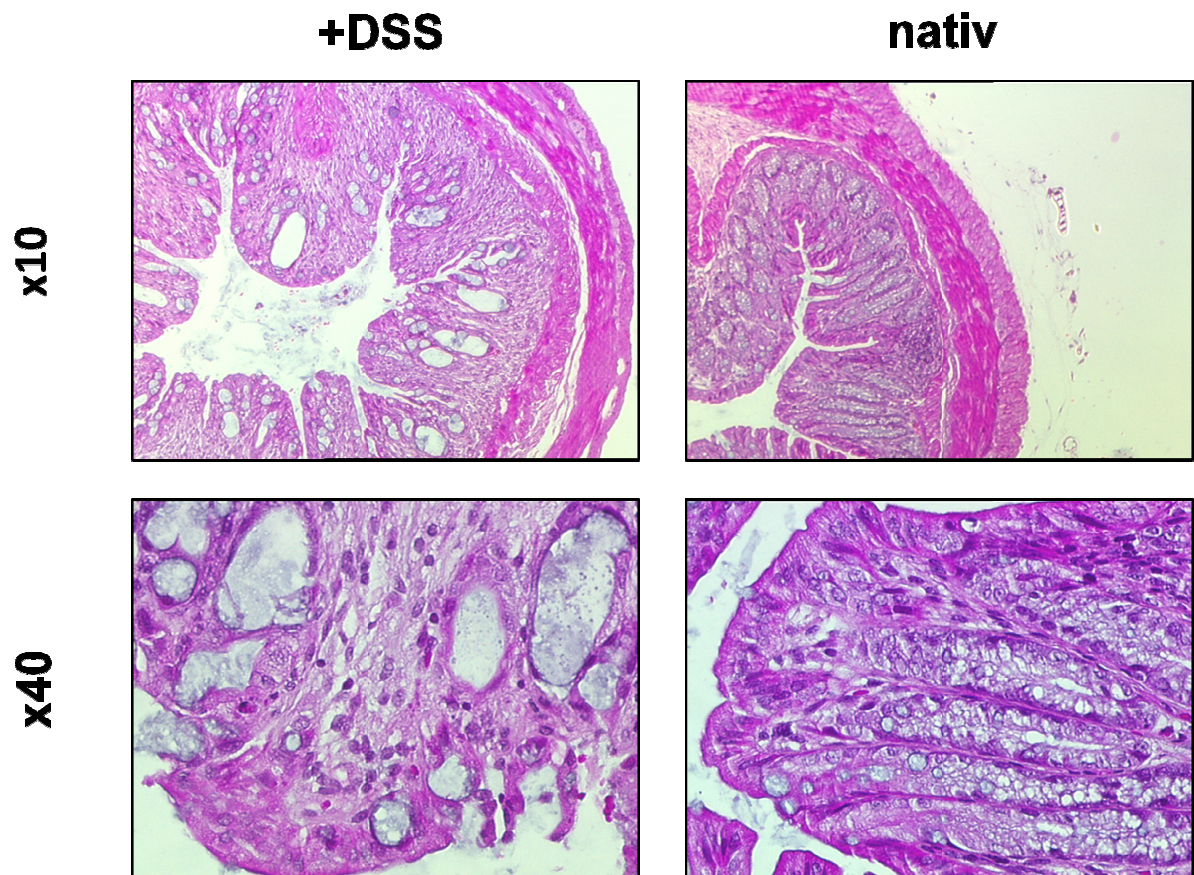
Zusätzlich zur Beurteilung von klinischen Parametern wurden nach Beendigung des Versuches proximales und distales Kolon bezüglich entzündlichen Veränderungen

Ergebnisse

histologisch analysiert. Die Histologie stellt ein sehr wichtiges Kriterium dar zu Beurteilung des entzündlichen Geschehens. Es wurden Hämatoxylin/Eosin-Färbungen der beiden Kolonabschnitte eines jeden Versuchstieres angefertigt und anhand von diesen mittels eines histologischen Scoring Systems die jeweilige Kolitisaktivität erhoben. Klassische histologische Entzündungszeichen sind beispielsweise Infiltrationen bestehend v.a. aus neutrophilen Granulozyten, außerdem Becherzellverlust und Zerstörung der Kryptenarchitektur.

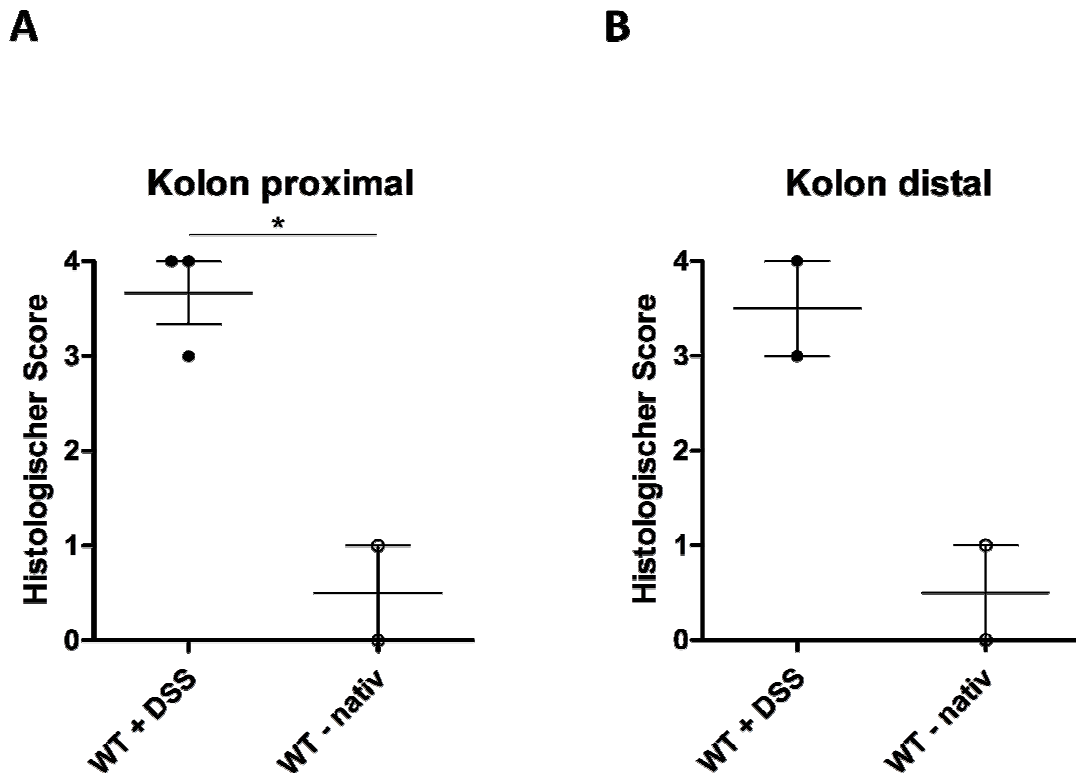
Bei allen Tieren der mit DSS behandelten Versuchsgruppe konnten nach 7 Tagen histologisch starke Entzündungszeichen sowohl in proximalem als auch in distalem Kolon ausgemacht werden. Neben einem flächenhaften Verlust von Becherzellen und gänzlich gestörter Kryptenarchitektur war die Darmwand verdickt und zersetzt mit bis in die Submukosa reichenden entzündlichen Infiltraten. Die histologische Analyse der Kontrolltiere fiel unauffällig aus: hier war eine normale Architektur der Darmwand auszumachen ohne Anhalt für entzündliche Aktivität.

Die histologische Beurteilung aller Kolonschnittbilder anhand verschiedener Kriterien für entzündliche Aktivität (siehe 3.2.3) wird in dem unten aufgeführten histologischen Score wiedergespiegelt. An Tag 7 konnte in der Kolitisgruppe, verglichen mit der negativen Kontrollgruppe, eine signifikant erhöhte entzündliche Aktivität in Form von Infiltrationen ausgemacht werden.



WT

13: Histologische Merkmale von WT-Mäusen mit akuter DSS Kolitis. WT-Mäuse bekamen über 5 Tage eine 5% DSS-Lösung als Trinkwasser, für die letzten zwei Tage des Experiments wurde auf normales Leitungswasser ohne DSS gewechselt. Nach dem 7. Tag wurden Proben vom distalen und proximalen Kolon genommen. Repräsentative Hämatoxylin/Eosin des distalen Kolons von WT-Mäusen mit akuter DSS Kolitis (Vergrößerungen: obere Reihe x10, untere Reihe x40)



14: Histologischer Score von WT-Mäusen mit akuter DSS-Kolitis versus unbehandelte Mäuse. WT-Mäuse bekamen über 5 Tage eine 5% DSS-Lösung als Trinkwasser, für die letzten zwei Tage des Experiments wurde auf normales Trinkwasser ohne DSS gewechselt, nach dem 7. Tag wurden Proben vom distalen und proximalen Kolon genommen und mittels einer Hämatoxylin/Eosin Färbung der histologische Score bestimmt. **(A)** Histologischer Score des proximalen Kolons von Mäusen mit akuter DSS Kolitis versus unbehandelte Mäuse, **(B)** Histologischer Score des distalen Kolons von Mäusen mit akuter DSS Kolitis versus unbehandelte Mäuse. Statistische Signifikanz wurde mit dem T-Test ermittelt. Die horizontalen Striche repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. * steht für $p < 0,05$

4.1.3 Quantifizierung Nkp46-positiver Zellen

Neben dem Kolon wurden nach Versuchsbeendigung auch die Milz und mesenteriale Lymphknoten der Tiere beider Versuchsgruppen zur weiteren Untersuchung entnommen. Milz und Lymphknoten gehören zu den sekundär lymphatischen Organen, durch Aufeinandertreffen von immunkompetenten Lymphozyten mit Antigenen stellen sie vor allem Orte der spezifischen Immunantwort dar.

Ziel dieses Versuches war es, per durchflusszytometrischer Analyse herauszufinden inwiefern sich die Anzahl der NK-Zellen in WT-Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis in Milz und mesenterialen Lymphknoten von den gesunden Tieren/der negativen Kontrollgruppe unterscheidet.

Für die Darstellung der NK-Zellen wurden die Oberflächenproteine Nkp46 und CD 27 gewählt:

Ergebnisse

Das Rezeptorprotein Nkp46 wird fast ausschließlich auf NK-Zellen exprimiert. Es handelt sich hierbei um einen die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen fördernden Rezeptor, d.h. bei Aufeinandertreffen der NK-Zelle beispielsweise mit infizierten Zellen triggert er die NK-Zelle und induziert deren lytische Aktivität. Die Markierung Nkp46-positiver Zellen mit passenden Antikörpern ermöglicht die Identifikation sowohl von ruhenden als auch von aktivierten NK-Zellen.[117]

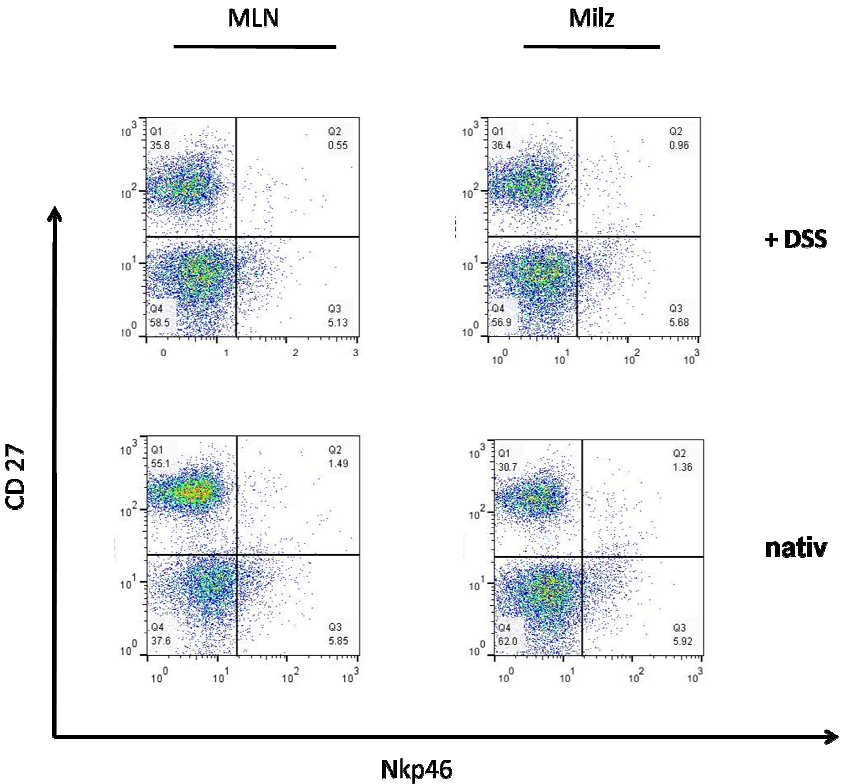
CD27 ist ebenfalls ein Oberflächenmolekül, welches vor allem bei der Reifung der NK-Zellen eine Rolle spielt, abhängig vom jeweiligen Stadium wird es in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Interessanterweise können NK-Zellen je nach CD27-Expressionsmuster in zwei funktionell unterschiedliche Untergruppen unterteilt werden: Während NK Zellen mit niedriger CD27 Expression eine hohe Stimulationsschwelle aufweisen und vor allem durch die Expression des inhibitorischen NK-Zell Rezeptors reguliert sind, weisen NK-Zellen mit starker CD27 Expression eine stärkere Effektorfunktion auf. Sie interagieren stark mit dendritischen Zellen und reagieren sehr sensibel auf Chemokine. Zusätzlich stellt CD27 ebenso wie Nkp46 einen stimulierenden Rezeptor dar, welcher zur Aktivierung der NK-Zelle führt. Zumal CD27 nicht NK-Zell-spezifisch ist, wird hier das Augenmerk vorrangig auf Nkp46 positive Zellen gelegt.[118]

Wie bereits in Methodenteil 3.4.1 beschrieben, wurden die Zellen der Milz und der Lymphknoten in mehreren Arbeitsschritten aufgereinigt und in eine Zellsuspension überführt. Um anschließend eine durchflusszytometrische Untersuchung bezüglich der Oberflächenproteine Nkp46 und CD27 durchzuführen, wurden die Zellsuspensionen mit passenden FACS-Antikörpern wie in 3.4.3.1. beschrieben gefärbt.

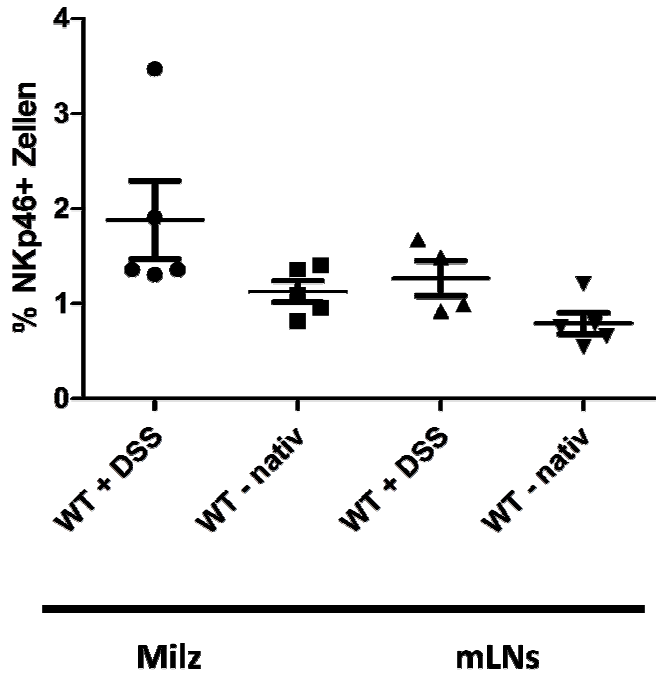
Sowohl in den Milzzellen als auch den Zellen der mesenterialen Lymphknoten konnte bei den Tieren mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 7 ein deutlich größerer prozentualer Anteil an Nkp46 positiven Zellen ausgemacht werden als in der negativen Kontrollgruppe.

Ergebnisse

A



B



15: FACS-Analyse auf die Oberflächenmarker CD 27 und Nkp46 bei WT-Mäusen mit DSS-Kolitis. FACS-Färbung (**A**) für FITC-labeled Nkp46, APC-labeled CD27 in Milzzellen und Zellen der mesenterialen Lymphknoten von WT-Mäusen mit DSS induzierter Kolitis und deren negativen Kontrollgruppe. Als Isotypenkontrollen wurden ein APC-labeled Armenian Hamster anti-mouse IgG sowie ein FITC-labeled Rat anti-mouse IgG2a,k verwendet. Die Milzen und Lymphknoten der Tiere wurden hierzu wie im Methodenteil beschrieben in wenigen Arbeitsschritten verarbeitet, sodass am Ende eine Zellsuspension entstand. In **B** wird der prozentuale Anteil an Nkp46 positiven Zellen sowohl in der Milz wie auch der mesenterialen Lymphknoten in WT Mäusen mit DSS-Kolitis und deren negativen Kontrollgruppe dargestellt. Keine Signifikanz messbar

4.2 Akute DSS-induzierte Kolitis WT/ Rag1^{-/-}/ Rag2 γ C^{-/-}

In einem zweiten Versuch wurde wie auch schon im vorangehenden Versuch mittels 5% DSS eine akute Kolitis induziert. Während im Vorversuch lediglich WT-Mäuse verwendet wurden, wurde in diesem Versuch zusätzlich zu diesen nun noch die Knockoutmäuse Rag1^{-/-} und Rag2 γ C^{-/-} eingegliedert. Während Rag1^{-/-} Tiere defizitär an funktionstüchtigen B- und T-Zellen sind, weisen Rag2 γ C^{-/-} Mäuse weder B- und T-Zellen noch NK-Zellen auf. Bei Versuchsbeginn betrug das Körpergewicht der Tiere >20 g. Die Tiere bekamen über 5 Tage 5% DSS zu Trinken, für die darauffolgenden 2 Tage lediglich Leitungswasser. Zu jedem der 3 Mausstämme wurde eine negative Kontrollgruppe mitgeführt, welche über den gesamten Zeitraum von 7 Tagen lediglich Leitungswasser zu Trinken bekam. An Tag 7 wurde der Versuch beendet, es wurden Proben von proximalem und distalem Kolon sowie die Milzen zur weiteren Analyse entnommen.

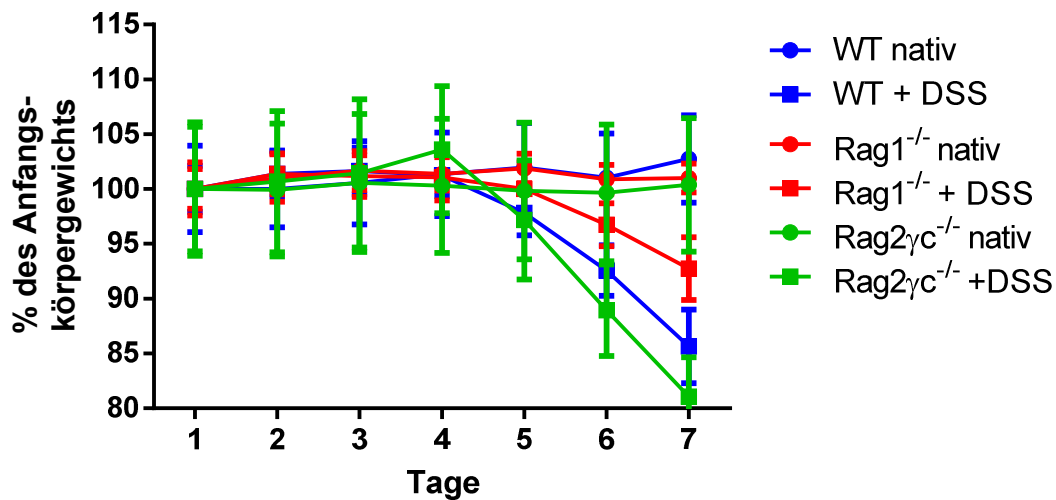
4.2.1 Gewichtsverlauf

Über die ersten 4 Tage des Versuches hielten alle 4 Versuchsgruppen ein konstantes Gewicht. Während die 3 negativen Kontrollgruppen an Gewicht zunahmen, konnte bei den DSS-behandelten Tieren ein unterschiedlich stark ausgeprägter Gewichtsverlust festgestellt werden: Die Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse verloren fast 20% ihres Anfangskörpergewichtes, sie erlitten durchschnittlich die stärkste Gewichtsabnahme. Etwas weniger ausgeprägt fiel der Gewichtsverlust bei den WT-Mäusen auf, sie verloren durchschnittlich ca. 15% ihres ursprünglichen Körpergewichtes. Am wenigsten beeinträchtigt erschien die Gruppe der Rag1^{-/-}-Mäuse, diese büßten ca. 7,5% ihres Anfangsgewichtes ein.

Aufgrund des unterschiedlichen Verlaufes der Gewichtskurven bei den verschiedenen Versuchsgruppen ließ sich folgern, dass bei den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren die

Ergebnisse

Schwere der Kolitis am stärksten ausgeprägt war, gefolgt von der WT-Gruppe. Klinisch schienen die Rag1^{-/-}-Mäuse am wenigsten beeinträchtigt.



16: Körpergewichtskurve von Mäusen mit akuter DSS-Kolitis gegenübergestellt zu unbehandelten Mäusen. WT, Rag1^{-/-} und Rag2γC^{-/-} Mäuse bekamen über 5 Tage eine 5%-DSS Lösung als Trinkwasser, für die letzten zwei Tage des Experiments wurde auf normales Leitungswasser gewechselt und jeden Tag gewogen. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. Das Körpergewicht wird angegeben als prozentualer Anteil des Startgewichts und wird dargestellt als Mittelwert ± SEM (n =5Mäuse).

4.2.2 Histologie und histologischer Score

Wie erwähnt wurde an Tag 7 der akuten Kolitis der Versuch beendet und zur histologischen Analyse sowohl von proximalem als auch von distalem Kolon Proben entnommen. Ebenso wurde auf Grundlage der Hämatoxylin/Eosin-Färbung anhand eines histologischen Scores die Entzündungsaktivität der einzelnen Versuchsgruppen bestimmt. Außerdem wurde eine PAS-Färbung durchgeführt: diese dient besonders der Anfärbung von Glykogen, neutralen Mukopolysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden. So können mit dieser Färbetechnik besonders gut im Darm vorhandene Becherzellen dargestellt werden.

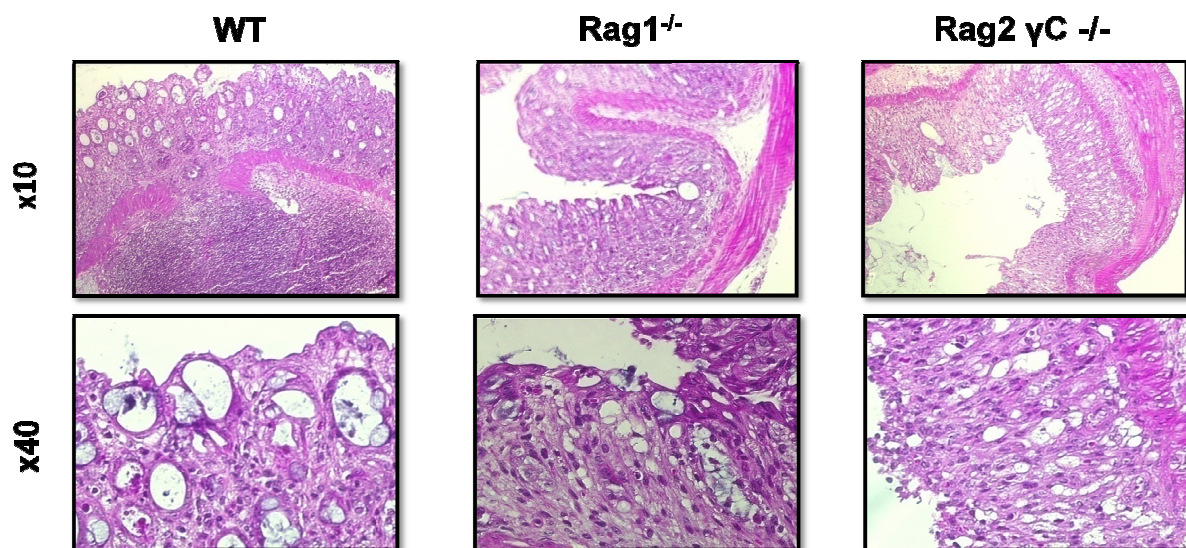
Korrelierend zum Verlauf der Gewichtskurven, konnte man auch in den verschieden gefärbten histologischen Schnittbildern unterschiedliche Schweregrade einer intestinalen Entzündung bei den jeweiligen Versuchsgruppen feststellen: In der Gruppe der Rag2γC^{-/-}-Mäuse waren die histologischen Entzündungszeichen am stärksten ausgeprägt. Es zeigten sich massive transmurale Gewebeschäden mit vollständiger Durchsetzung der Darmwand durch Entzündungszellen und

Ergebnisse

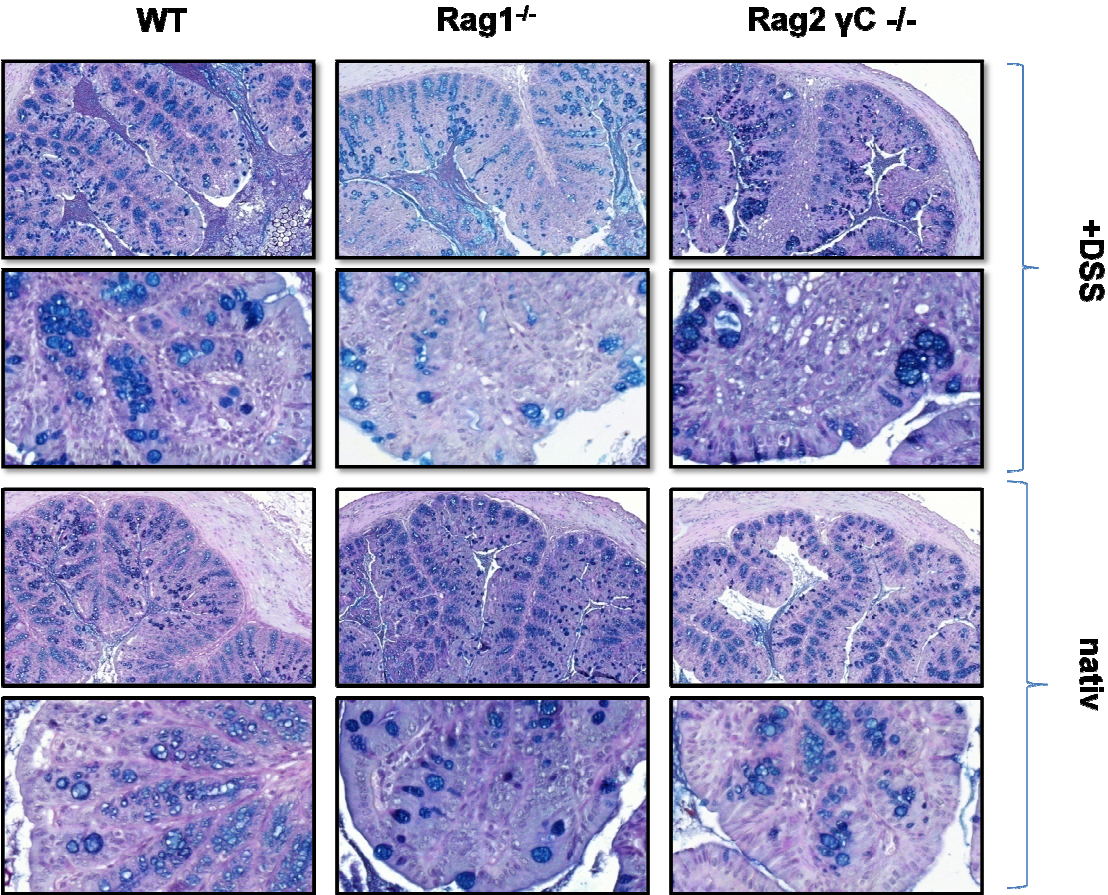
ausgeprägte Immunzellinfiltrate, außerdem war ein flächenhafter Verlust von Becherzellen zu verzeichnen. Die Gruppe der WT-Mäuse zeigte auch eine ausgeprägte intestinale Entzündung, allerdings im Vergleich zu den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren in etwas abgeschwächter Form. Auch hier waren in den histologischen Schnitten ein Verlust an Becherzellen sowie zahlreiche leukozytäre Infiltrationen sichtbar. Die mit DSS behandelte Rag1^{-/-}-Gruppe zeigte histologisch die am geringsten ausgeprägte Entzündung. Die drei negativen Kontrollgruppen zeigten keinerlei entzündliche Aktivität. Allgemein lässt sich zudem hinzufügen, dass die Entzündung im distalen Kolon deutlich stärker ausgeprägt war als die im proximalen Kolon.

Genanntes spiegelt auch der histologische Score wider. An Tag 7 der akuten Kolitis konnte zudem eine signifikant erhöhte entzündliche Aktivität der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere verglichen mit den Rag1^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

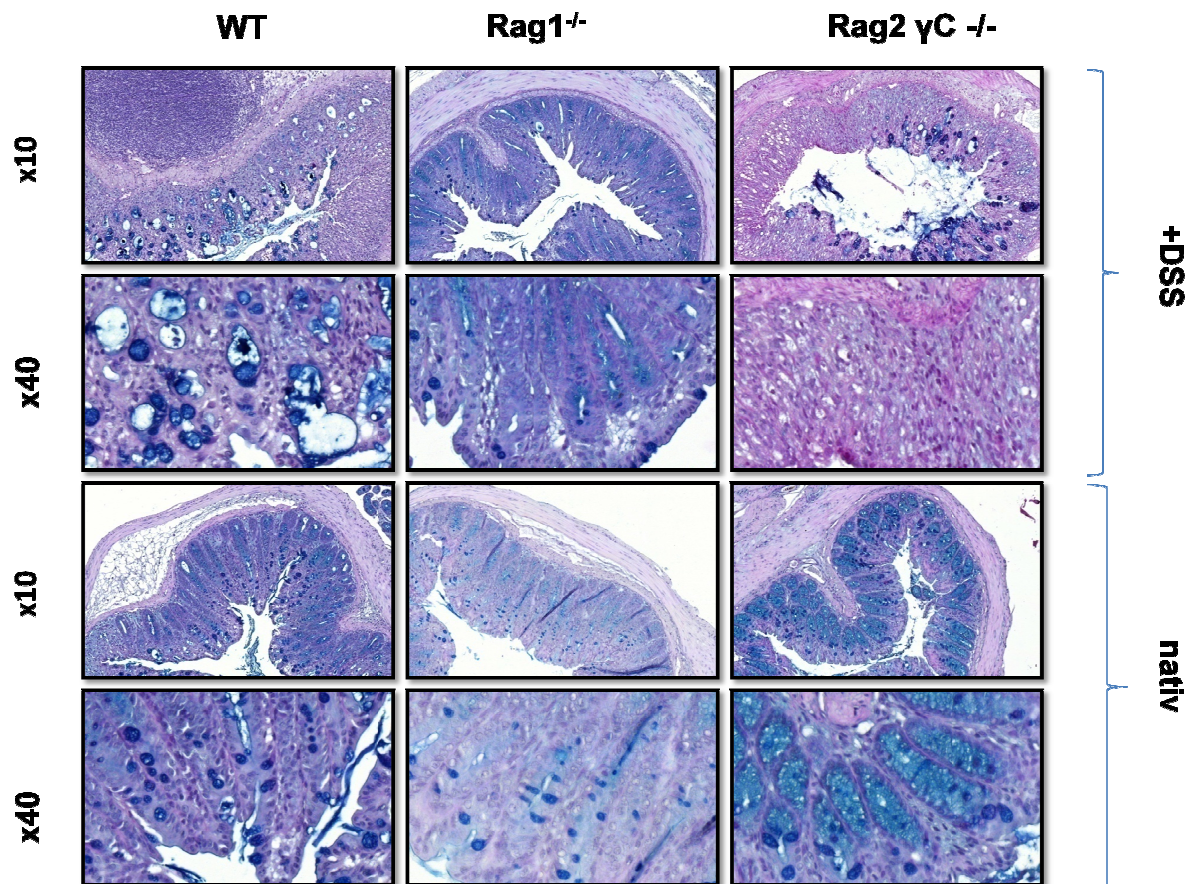
A



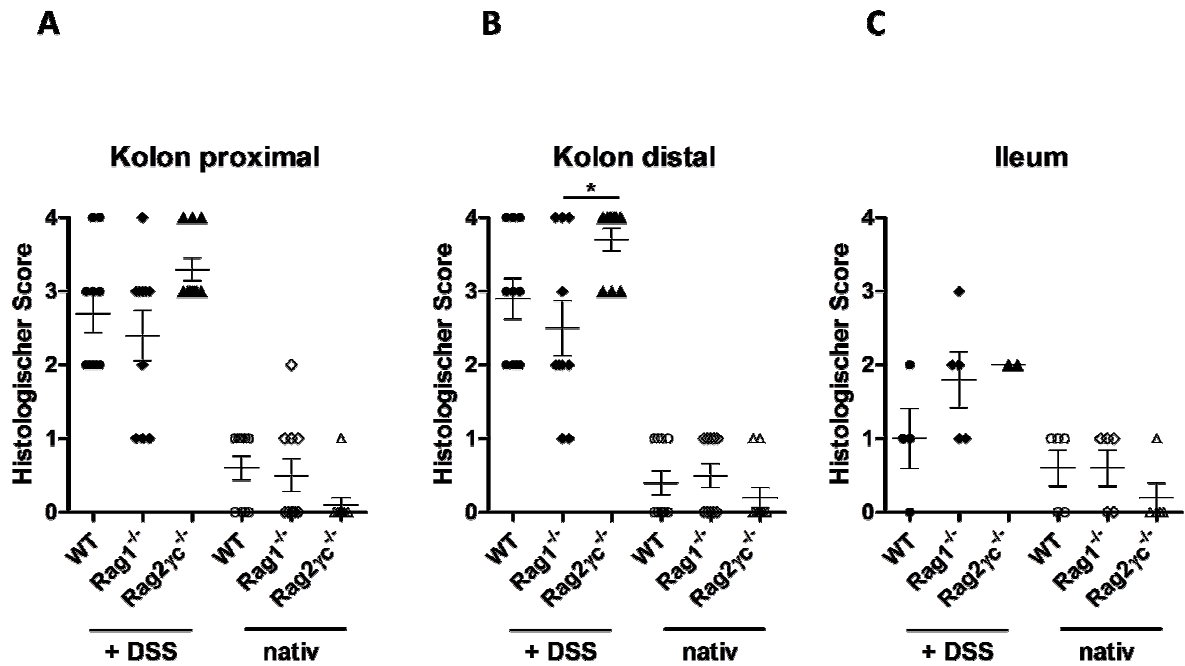
B



C



17: Histologische Merkmale von Mäusen mit akuter DSS-Kolitis. WT, Rag1^{-/-} und Rag2_{γC}^{-/-} Mäuse bekamen über 5 Tage eine 5%-DSS Lösung als Trinkwasser, für die letzten zwei Tage des Experiments wurde auf normales Trinkwasser ohne DSS umgestellt. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. Nach dem 7. Tag wurden Proben vom distalen und proximalen Kolon genommen. Repräsentative Hämatoxylin/Eosin-Färbung des distalen Kolons(A) und PAS -Färbung des proximalen(B) und distalen(C) Kolons von WT, Rag1^{-/-}, Rag_{γC}^{-/-} Mäusen mit akuter DSS Kolitis sowie jeweils den negativen Kontrollgruppen.(Vergrößerungen: obere Reihe x10, untere Reihe x40)



18: Histologischer Score von Mäusen mit akuter DSS-Kolitis versus unbehandelte Mäuse. WT, Rag1^{-/-} und Rag2_vC^{-/-} Mäuse bekamen über 5 Tage eine 5% DSS-Lösung als Trinkwasser, für die letzten zwei Tage des Experiments wurde auf normales Trinkwasser ohne DSS gewechselt. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. Nach dem 7. Tag wurden Proben vom distalen und proximalen Kolon sowie Ileum genommen und mithilfe einer Hämatoxylin/Eosin Färbung der histologische Score bestimmt. **(A)** Histologischer Score des proximalen Kolons von Mäusen mit akuter DSS Kolitis versus unbehandelten Mäusen **(B)** Histologischer Score des distalen Kolons von Mäusen mit akuter DSS Kolitis versus unbehandelten Mäusen **(C)** Histologischer Score des Ileums von Mäusen mit akuter DSS Kolitis versus unbehandelten Mäusen: Die entzündliche Aktivität der Rag2_vC^{-/-}-Tiere ist gegenüber der der Rag1^{-/-}-Tiere signifikant erhöht. Die Signifikanz wurde mit dem T-Test errechnet. * für p<0,05

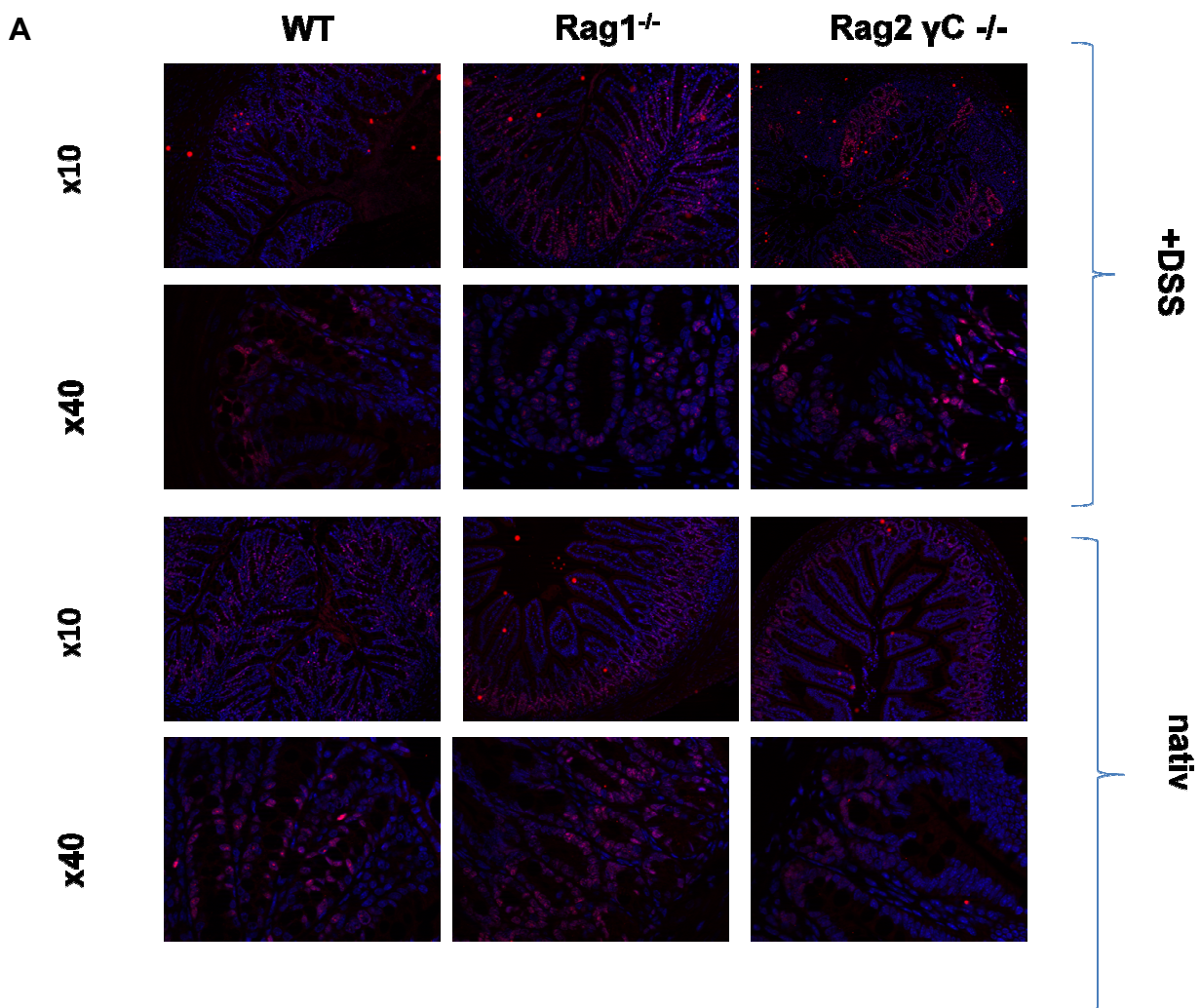
4.2.3 Immunhistochemie Ki-67

Zusätzlich wurde bei diesem Versuch eine immunhistochemische Färbung von proximalem und distalem Kolon (einmal als Fluoreszenzvariante) auf den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt.

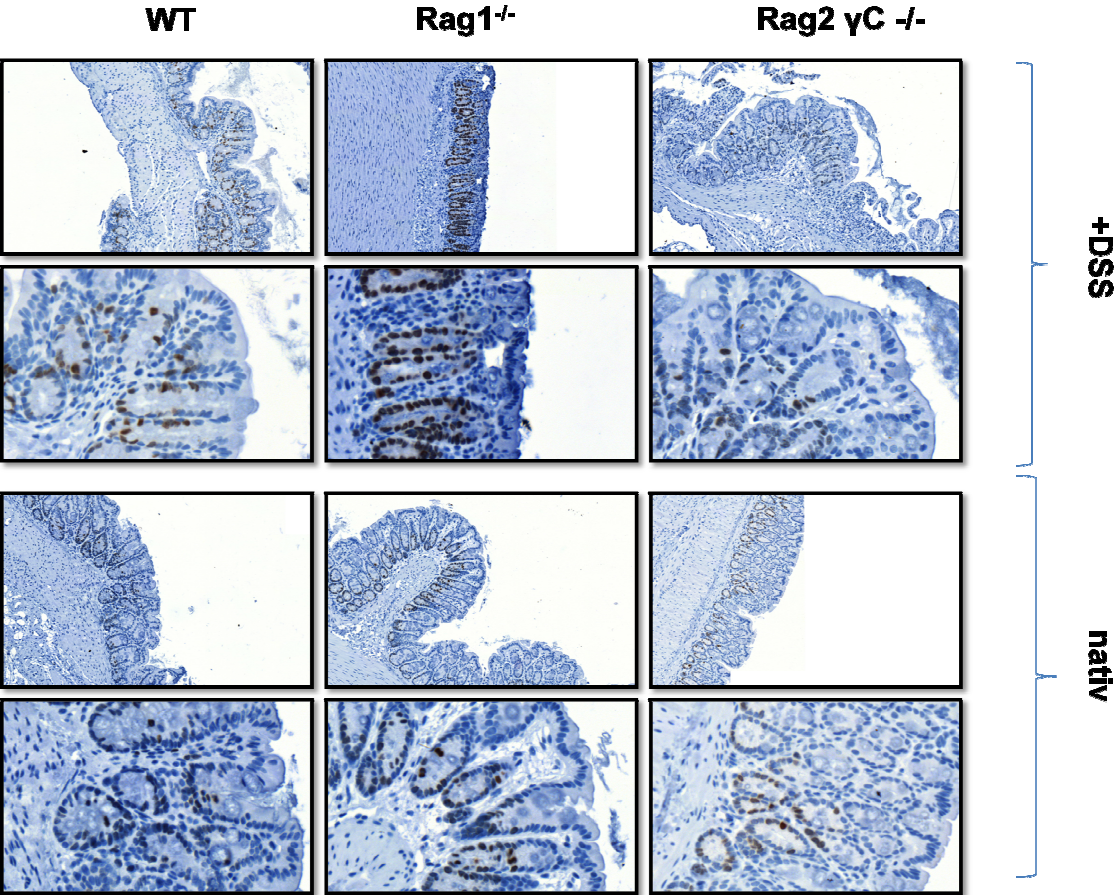
Anschließend wurde ein Ki-67-Index erstellt. Dieser stellt den prozentualen Anteil an Ki-67 positiven Zellen in einem bestimmten Bildausschnitt, hier einer Darmkrypte dar. Hierzu wurden wie auch bei der Erstellung des Histoscores jeweils 4 Schnitte zu proximalem und distalem Kolon in jeder Versuchsgruppe begutachtet. Pro Bild wurden die Ki-67 positiven und negativen Zellen innerhalb von fünf Gesichtsfeldern gezählt und anschließend der prozentuale Durchschnittswert gebildet und in einem Diagramm grafisch dargestellt.

Ergebnisse

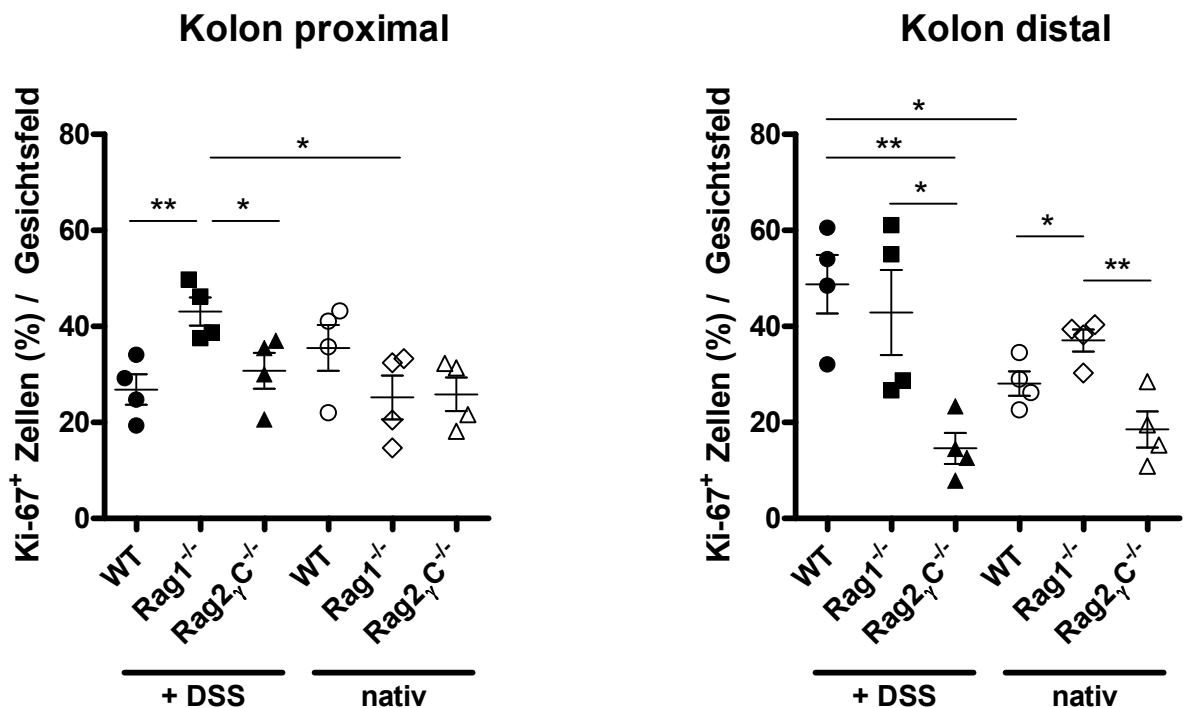
Der Ki-67 Index lieferte an dieser Stelle ein uneinheitliches Bild: Im proximalen Kolon fielen in den Kolitisgruppen die Rag1^{-/-}-Tiere durch eine signifikant erhöhte Anzahl an Ki-67 positiven Zellen gegenüber Rag2 γ C^{-/-}- und WT-Mäusen auf. Bei den nativen Gruppen enthielt die Gruppe der WT-Mäuse am meisten proliferierende Zellen vor der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}- und Rag1^{-/-}-Tiere. Im distalen Kolon war festzustellen, dass wie auch schon beim proximalen Kolon die Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse am wenigsten Ki-67 positive Zellen, nämlich deutlich signifikant weniger als die beiden anderen Gruppen verzeichneten. Bei den nativen Versuchsgruppen wiesen die Rag1^{-/-}-Tiere signifikant mehr Ki-67 positive Zellen auf als die beiden anderen nativen Versuchsgruppen.



B



C



19: Immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67 von Mäusen mit akuter DSS-Kolitis im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die Mäuse erhielten über 5 Tage eine 5% DSS-Lösung, anschließend für 2 Tage Leitungswasser. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. Es handelt sich um Schnitte des proximalen Kolons am Tag 7 der akuten DSS-Kolitis sowie den Tiergruppen jeweils zugehörigen negativen Kontrollgruppen. Die Schnitte der Bildreihe **A** sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 588 behandelt worden, wohingegen es sich in Bildreihe **B** um eine herkömmliche immunhistochemische Färbung handelt mit dem Rat anti-mouse Antikörper gegen Ki-67 von DakoCytomation. (Vergrößerungen obere Reihe x10, untere Reihe x40. In **C** ist der Prozentuale Anteil an Ki67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei akuter Kolitis dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem T-Test ermittelt, die horizontalen Balken stellen den Mittelwert \pm SEM dar. * steht für $p < 0,05$, ** steht für $p < 0,01$

4.2.4 Durchflusszytometrische Analyse zur Quantifizierung der einzelnen Zellpopulationen

Neben einer Reihe von histologischen Untersuchungen von proximalem und distalem Kolon sollten in diesem Versuch auch die Zellen der Lamina propria mucosae (LPMC) genauer betrachtet werden. Die Lamina propria bildet einen Teil der Schleimhaut, also der innersten Schicht der Darmwand. Sie liegt eingebettet zwischen Lamina epithelialis mucosae und Lamina muscularis mucosae. Neben retikulärem Bindegewebe, terminalen Blutgefäßen und Lymphgefäßen befinden sich auch zahlreiche freie Abwehrzellen in dieser Schicht. Mittels Durchflusszytometrie

Ergebnisse

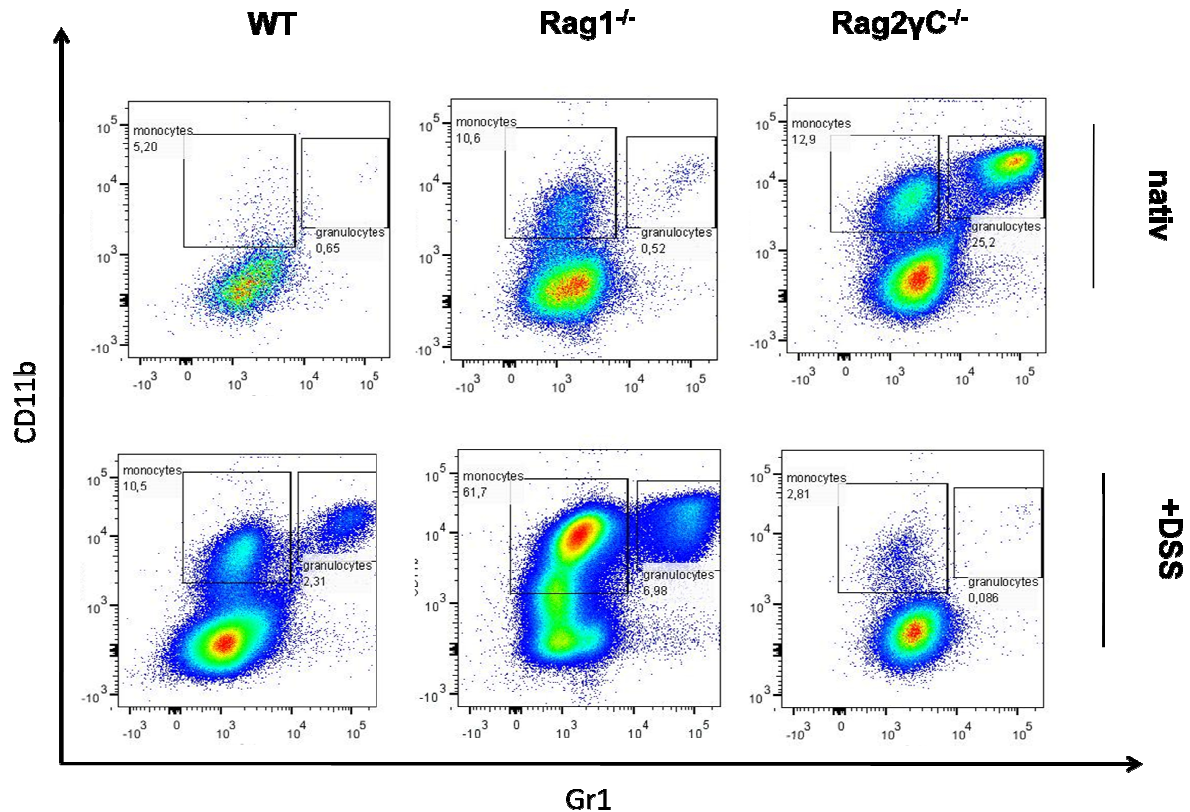
sollte zunächst untersucht werden, welche Zellpopulationen bei welchen Mausstämmen im Zustand der akuten DSS-Kolitis bzw. in gesundem Zustand vorherrschen. Hierzu wurde wie im Methodenteil unter 3.4.2 beschrieben eine Isolation der Zellen der LPMC durchgeführt. Für die Detektierung der verschiedenen Zellpopulationen wurden jeweils verschiedene Antikörper verwendet, welche an für die Zelltypen spezifische Oberflächenstrukturen binden.

4.2.4.1 Monozyten/Granulozyten

Die Populationen der Monozyten und Granulozyten, zwei dem angeborenen Immunsystem zugehörige Zellpopulationen wurden mittels FACS-Antikörpern gegen CD11b und Gr1 dargestellt. Bei CD11b handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das vor allem auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Granulozyten aber auch aktivierten Lymphozyten vorkommt. Gr1 stellt einen spezifischen Marker für neutrophile Granulozyten dar. Bei den Tieren mit akuter DSS-induzierter Kolitis konnte Folgendes festgestellt werden:

Bei WT-, Rag1^{-/-}- und Rag2γC^{-/-}-Tieren machten die Monozyten mit jeweils 10,6%, 61,7% und 2,81% gegenüber der Granulozytenpopulation mit 2,31%, 6,99% und 0,096% den größeren Anteil an Zellen der LPMC aus. Vergleichend dazu zeigte die Analyse der Monozyten der LPMC der gesunden Tiere bei WT- und Rag1^{-/-}- Mäusen mit 5,2% und 10,6 % eine deutliche Zellreduktion jedoch immer noch größeren Anteil an LPMC-Zellen gegenüber den Granulozyten mit 0,65% und 0,52%. Interessanterweise zeigte die Gruppe der gesunden Rag2γC^{-/-}-Tiere hier ein gegensätzliches Bild: während die Granulozyten 25,2% ausmachten, lag der Anteil an Monozyten lediglich bei 12,9%.

Ergebnisse



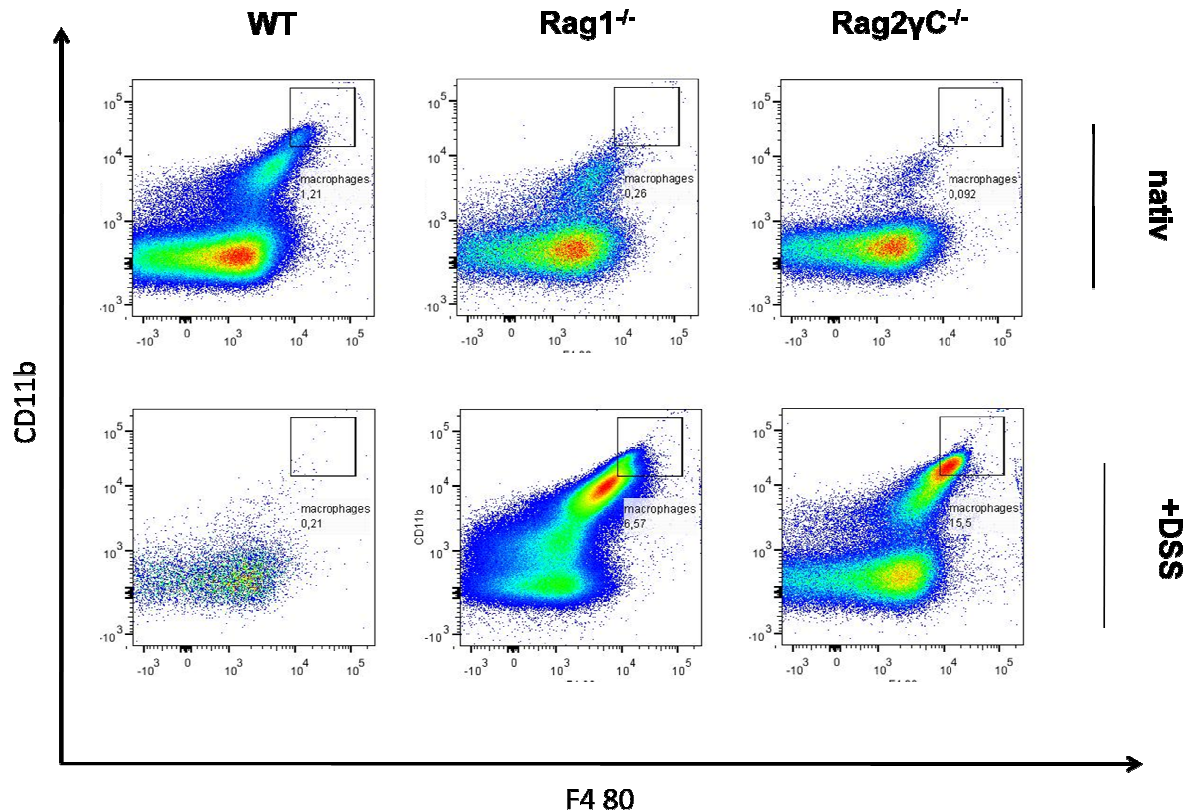
20: Anteil der Monozyten und Granulozyten in Zellen der LPMC bei DSS-induzierter Kolitis und nativen Kontrolltieren. WT, Rag1^{-/-} und Rag2γC^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. An Tag 7 wurden die Zellen der LPMC wie im Methodenteil beschrieben isoliert, wobei jeweils die 5 Tiere der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit VioBlue-labeled anti-mouse Gr1 Antikörper und PE-Cy 7-labeled anti-mouse CD11b Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Gate, welches die zu untersuchenden Zellen zusammenfasst wurde nach Markierung der vitalen Zellen auf CD45 positive Zellen gelegt. Als Isotypenkontrolle wurde ein VioBlue-labeled Rat anti-mouse IgG2b sowie ein PE-Cy7-labeled Ratte anti-mouse IgG2b, κ mitgeführt.

4.2.4.2 Makrophagen

Zur Darstellung der Makrophagen, welche einen wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems und hier des Phagozytensystems ausmachen, wurde zum einen wieder ein FACS-Antikörper gegen CD11b sowie ein FACS-Antikörper gegen F4 80 verwendet. F4 80 ist ein Oberflächenmolekül, welches auf der Mehrheit der reifen Makrophagen exprimiert wird und für diese sehr spezifisch ist.

Es zeigte sich bei dieser Untersuchung, dass im Zustand einer akuten DSS-Kolitis bei Rag2γC^{-/-}-Tieren mit 15,5% deutlich mehr Makrophagen in der LPMC residieren als bei Rag1^{-/-}- (6,57%) und WT-Tieren (0,21%). Im gesunden Zustand wurden in dieser Versuchsgruppe mit 0,092% anteilig am wenigsten Makrophagen gefunden.

Ergebnisse



21: Anteil der Makrophagen in Zellen der LPMC bei DSS-induzierter Kolitis und nativen Kontrolltieren, WT, Rag1^{-/-} und Rag2γC^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. An Tag 7 wurden die Zellen der LPMC wie im Methodenteil beschrieben isoliert, wobei jeweils die 5 Tiere der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit APC Cy-7-labeled anti-mouse F4 80 Antikörper und PE-Cy 7-labeled anti-mouse Antikörper CD11b gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Gate, welches die zu untersuchenden Zellen zusammenfasst, wurde nach Markierung der vitalen Zellen auf CD45 positive Zellen gelegt. Als Isotyopenkontrolle wurde ein PE-Cy7 -labeled Rat anti-mouse IgG2a, κ sowie ein PE-Cy7-labeled Rat anti-mouse IgG2b, κ mitgeführt.

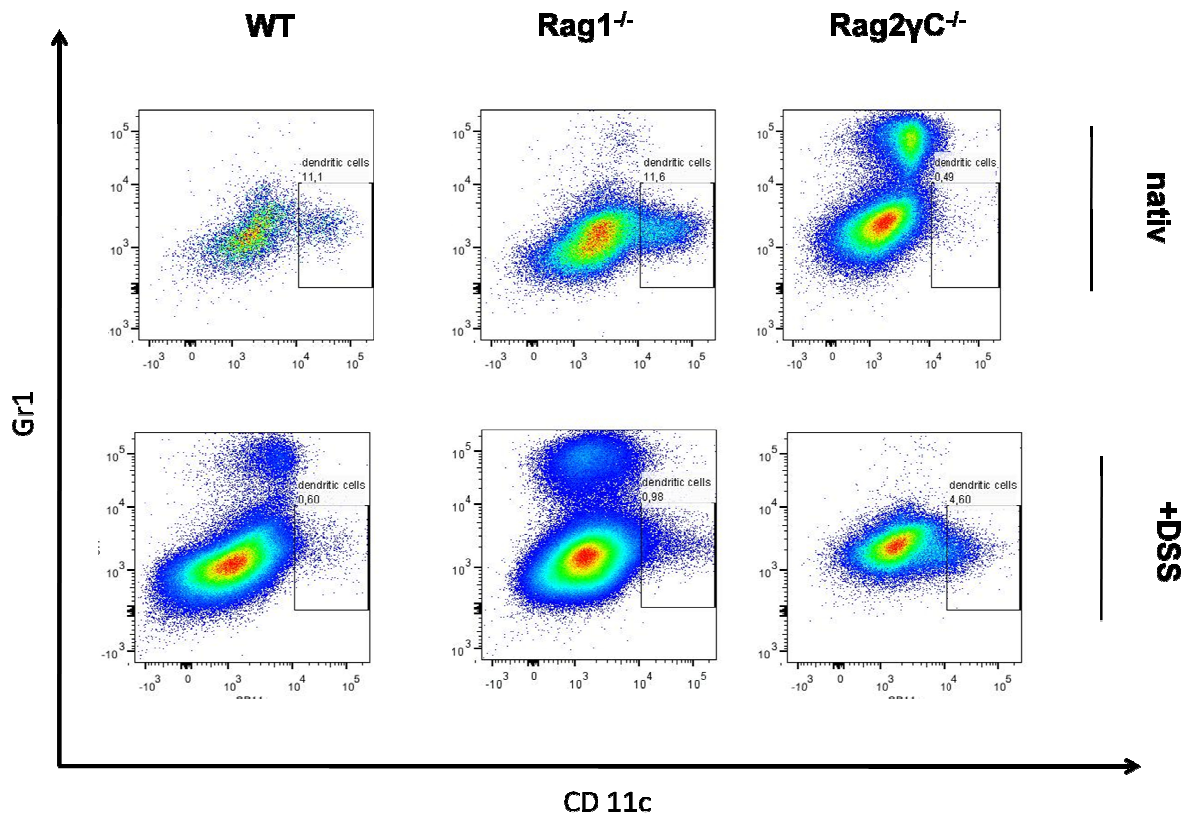
4.2.4.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen gehören zu der Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen und spielen sowohl für das angeborene als auch das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle. Mittels der FACS Antikörper Gr1 und CD11c, einem Phagozytenmarker, konnten ihre Populationen detektiert werden.

In den drei Versuchsgruppen mit DSS-induzierter Kolitis konnten ähnlich der Verteilung der Makrophagen auch hier bei den Rag2γC^{-/-}-Tieren mit 4,6% gegenüber der WT-Gruppe mit 0,6% und den Rag1^{-/-}-Mäusen mit 0,98% anteilig am meisten dendritische Zellen gefunden werden. In den drei Negativkontrollen wiederum machten die dendritischen Zellen bei den Rag2γC^{-/-}-Mäusen mit 0,49% gegenüber der WT-Gruppe (11,1%) und der Rag1^{-/-}-Gruppe (11,6%) den kleinsten Anteil aus.

Ergebnisse

Auch hier lässt sich vermuten, dass die größere Anzahl der dendritischen Zellen bei den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren auf das Fehlen von B-, T-, und NK-Zellen zurückzuführen ist.



22: Anteil der dendritischen Zellen in Zellen der LPMC bei DSS-induzierter Kolitis und nativen Kontrolltieren, WT, Rag1^{-/-} und Rag2 γ C^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. Am Tag 7 wurden die Zellen der LPMC wie im Methodenteil beschrieben isoliert, wobei jeweils die 5 Tiere der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit VioBlue-labeled anti-mouse Gr1 Antikörper und PerCP-Cy5.5-labeled anti-mouse CD11c Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Gate, welches die zu untersuchenden Zellen zusammenfasst, wurde nach Markierung der vitalen Zellen auf CD45 positive Zellen gelegt. Als Isotypenkontrolle wurde ein VioBlue-labeled rat anti-mouse IgG2b sowie ein PerCP-Cy5.5-labeled Armenian Hamster anti-mouse IgG mitgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein reziprokes Verhalten von den verschiedenen Populationen unter nativen und entzündlichen Situationen bei der durchflusszytometrischen Analyse vorgefunden wurde: Wenn wir in einem Maustyp eine hohe Zellzahl einer bestimmten Zellpopulationen in entzündlicher Situation auffanden, zeigte sich ein gegensätzliches Bild unter nativen Bedingungen und umgekehrt.

Ergebnisse

4.2.5 Zytokinexpression in der akuten Kolitis

Wie in der Einleitung unter 1.1.3 schon erwähnt, spielen verschiedene, von den Zellen des Immunsystems synthetisierte Zytokine eine relevante Rolle in der Entstehung und der Aufrechterhaltung einer entzündlichen Darmerkrankung. In diesem Teil des Versuches wurde mittels verschiedener Methoden die Zytokinexpression bei akuter DSS-induzierter Kolitis im Vergleich zu gesunden Tieren in den verschiedenen Maustypen untersucht.

4.2.5.1 IL-6

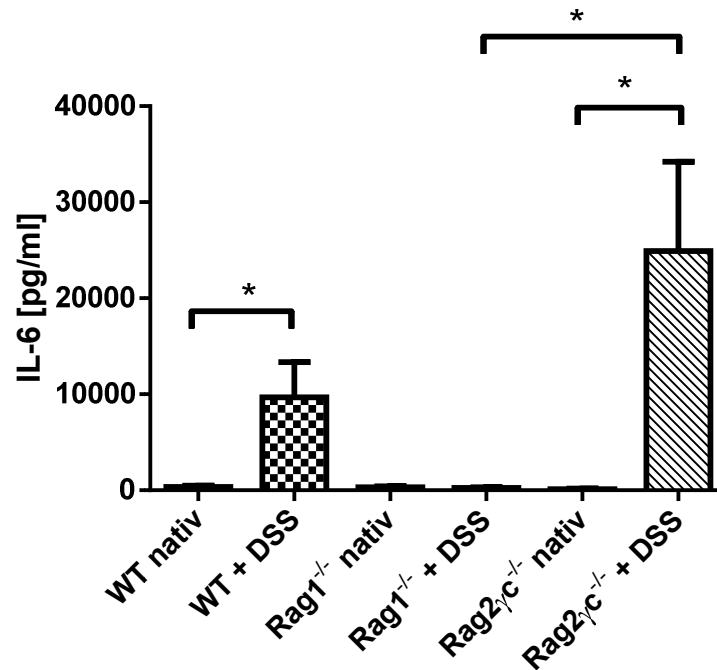
Der Botenstoff Interleukin-6 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen im Organismus. Klassischerweise wird er als einer der Induktoren der Akut-Phase-Reaktion sowie als Lymphozyten stimulierender Faktor betrachtet.[119]

Ziel dieses Versuchsteiles war es, herauszufinden, ob und inwiefern es Unterschiede bezüglich der Zytokinproduktion der verschiedenen Maustypen gibt und ob diese mit klinischem und histologischem Bild übereinstimmen.

Die Zytokinproduktion im akut entzündeten Darm bei den unterschiedlichen Maustypen wurde zunächst per Ex-vivo-Kolon-Kultur bestimmt. Wie im Methodenteil unter 3.3.1 beschrieben wurden nach Beendigung der Mäuse bei der Organentnahme Kolonstücke der verschiedenen Versuchsgruppen in Nährmedium über 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde per ELISA (siehe 3.3.2) aus dem Überstand dann die Zytokinkonzentration bestimmt. Des Weiteren wurde das Zytokinprofil der unterschiedlichen Versuchsgruppen per Durchflusszytometrie betrachtet. Hierzu wurden die in 4.2.1 bereits beschriebenen Zellen der Lamina propria durch intrazelluläres Staining auf die zu untersuchenden Botenstoffe gefärbt und anteilig prozentual bestimmt.

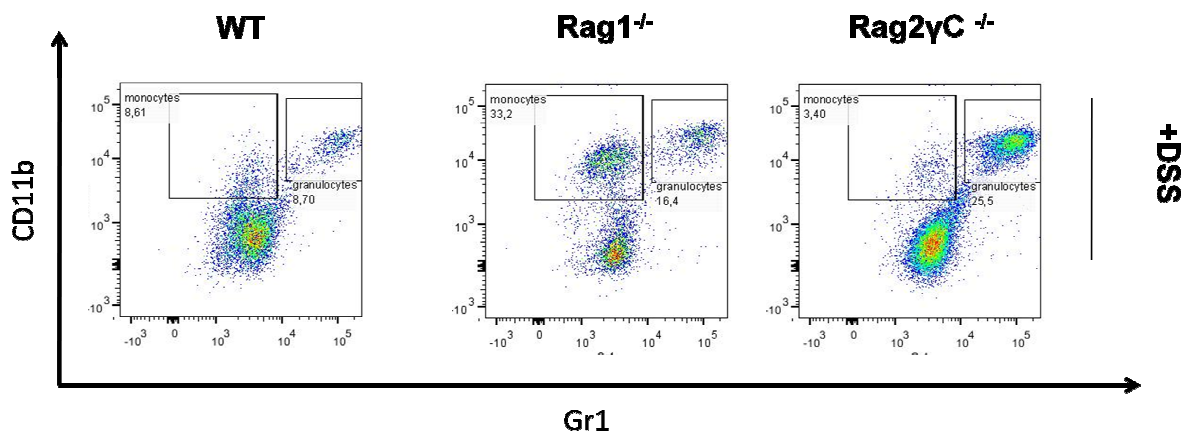
Wie aus dem unten aufgeführten Diagramm und den FACS-Graphiken ersichtlich ist, produzierten die Zellen der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse deutlich mehr IL-6 als die anderen beiden mit DSS-behandelten Versuchsgruppen. Während die WT-Mäuse am zweitmeisten IL-6 produzierten, bildete die Gruppe der Rag1^{-/-}-Mäuse hier das Schlusslicht. Die negativen Kontrollgruppen zeigten im ELISA kaum eine Produktion von IL-6.

Ergebnisse



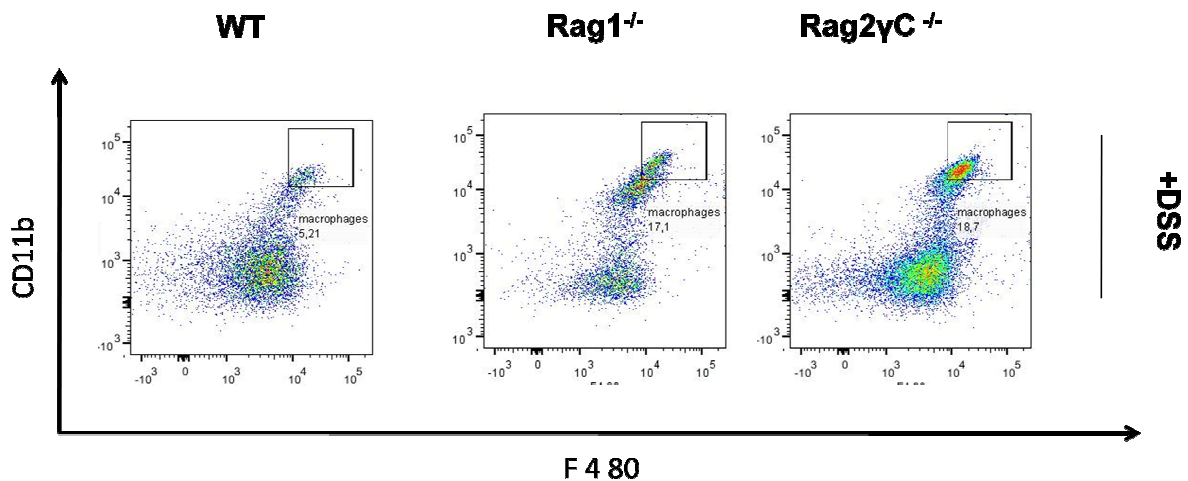
23: Darstellung der Expression von IL-6 nach Ex-vivo-Colon-Culture bei Mäusen mit DSS-Kolitis Im Vergleich zu gesunden Tieren. WT, Rag1^{-/-} und Rag2 γ C^{-/-} Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. An Tag 7 wurden bei der Organentnahme 1 cm lange Kolonstücke der verschiedenen Versuchsgruppen jeweils gepoolt und für 48 Stunden in Nährmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde unter Verwendung von 96-well Zellkulturplatten die Produktion von IL-6, IL-2, IL-22 und TNF mittels dem OptEIA™ mouse IL-2 Set, OptEIA™ IL-22 Set und dem OptEIA™ TNF Set von BD Biosciences sowie dem Mouse IL-6 ELISA Set von e-Biosciences per ELISA die stattgefunden Zytokinexpression der jeweiligen Gruppe quantitativ ermittelt. Jede Gruppe enthielt 5 Mäuse, wobei in den Diagrammen die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM dargestellt werden. * für $p < 0,05$

A Monozyten/Granulozyten

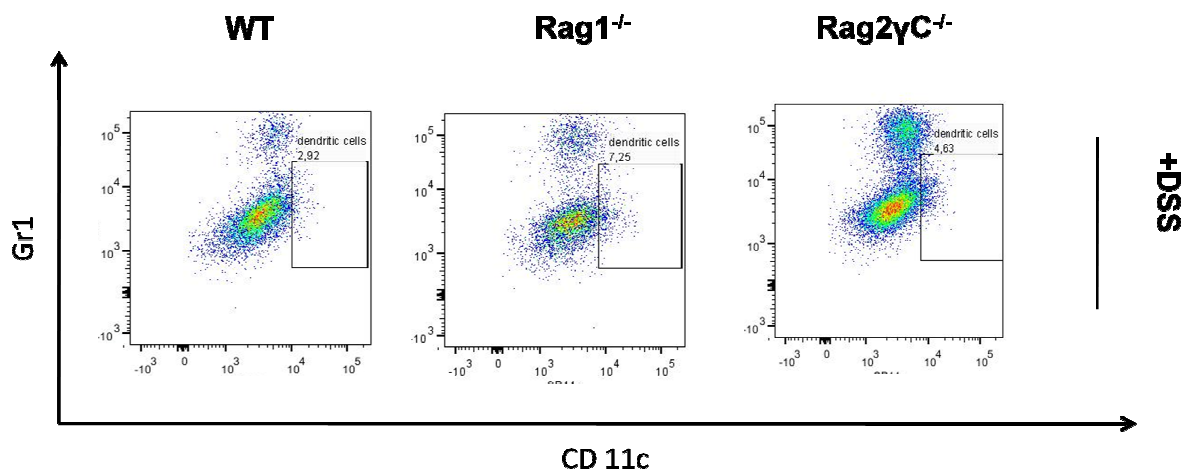


Ergebnisse

B Makrophagen



C dendritische Zellen



24: Charakterisierung der unterschiedlichen Zellpopulationen (A-C) der LPMC's, die IL-6 produzieren bei DSS-induzierter Kolitis und nativen Kontrolltieren. WT-, Rag1^{-/-}- und Rag2γC^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. An Tag 7 wurden die Zellen der LPMC wie im Methodenteil beschrieben isoliert, wobei jeweils die 5 Tiere der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit VioBlue-labeled anti-mouse Gr1 Antikörper und PE-Cy 7-labeled anti-mouse CD11b Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Gate, welches die zu untersuchenden Zellen zusammenfasst wurde nach Markierung der vitalen Zellen auf CD45 positive Zellen sowie darauffolgend auf IL-6 positive Zellen gelegt. Als Isotypenkontrolle wurde ein VioBlue-labeled Rat anti-mouse IgG2b sowie ein PE-Cy7-labeled Rat anti-mouse IgG2b, κ mitgeführt.

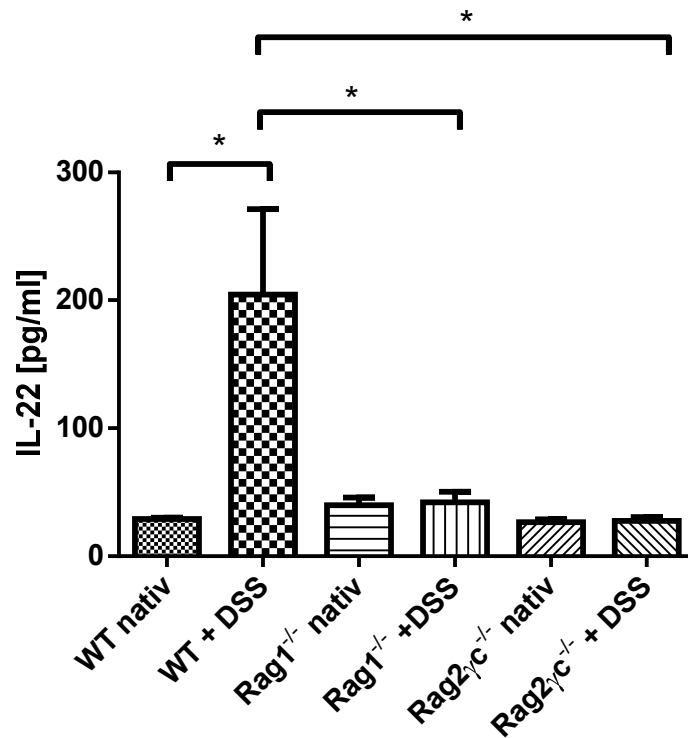
Ergebnisse

4.2.5.2 IL-22

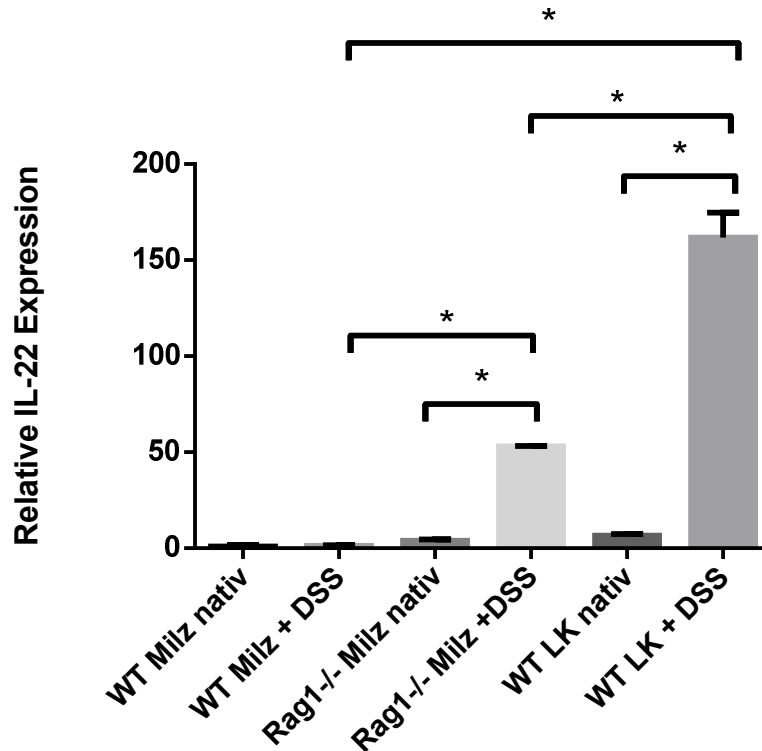
Das Zytokin IL-22 gehört zu der Interleukin-10-Familie. Es wird von verschiedenen Leukozyten produziert. Zunächst glaubte man, dass es überwiegend von T-Zellen, v.a. den Th17 und Th1 Zellen exprimiert wurde.[120, 121] Neben diesen wird IL-22 auch bekannterweise von NK-Zellen produziert.[122] Zielzellen des Botenstoffes sind keine Immunzellen sondern vor allem epitheliale Zellen, die zur Differenzierung und Proliferation und infolgedessen z.B. zur Wundheilung angeregt werden.[123] Zusätzlich ist IL-22 involviert in die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Psoriasis, wobei dem Zytokin sowohl eine protektive als auch eine pathogene Rolle nachgesagt wird.[124]

Nach Durchführung einer Ex-vivo-Kolon-Culture wurde mittels ELISA zunächst die Zytokinproduktion der einzelnen Versuchsgruppen bestimmt. Die Gruppen mit DSS-induzierter Kolitis produzierten mehr IL-22 als ihre negativen Kontrollgruppen. Die Gruppe der WT-Mäuse zeigte mit deutlichem Abstand die stärkste Produktion während B- und T- (und NK-) Zell defiziente Rag1^{-/-} und Rag2γC^{-/-}-Tiere nur sehr wenig IL-22 produzierten.

In einem weiteren Experiment im Rahmen der akuten DSS-induzierten Kolitis wurden nach Beendigung der Tiere und Organentnahme zunächst bei Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten von WT- und Rag1^{-/-}-Mäusen, sowohl der nativen als auch der mit DSS-behandelten, mittels MACS-Sort Nkp46 positive Zellen isoliert. Da Rag2γC^{-/-}-Tiere per se keine NK-Zellen enthalten, wurden diese hier nicht mit eingeschlossen. Die Nkp46 positiven Zellen von Milz und Lymphknoten der zwei Versuchsgruppen wurden anschließend mittels einer PCR-Reaktion auf ihr IL-22 Expressionsverhalten untersucht. Nkp46-positive Zellen der mit DSS-behandelten Rag1^{-/-}-Tiere zeigten eine stärkere Expression als die WT-Gruppe, bei welcher der Wert gegen 0 ging. Auch die negativen Kontrolltiere zeigten keine Expression von IL-22. Ein Vergleich der IL-22-Produktion von nativen und DSS-behandelten WT-Mäusen zeigte eine starke Expressionsdominanz der Tiere mit Kolitis gegenüber den gesunden Tieren. Da aus den mesenterialen Lymphknoten der Rag1^{-/-}-Tiere nicht genug Nkp46-positive Zellen gewonnen werden konnten, konnte keine Aussage zu deren IL-22 Expressionsverhalten getroffen werden.



25: Darstellung der Expression von IL-22 nach Ex-vivo-Kolon-Kultur bei Mäusen mit DSS-Kolitis im Vergleich zu gesunden Tieren. WT-, Rag1^{-/-}- und Rag2^{γc}^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. An Tag 7 wurden bei der Organentnahme 1 cm lange Kolonstücke der verschiedenen Versuchsgruppen jeweils gepoolt und für 48 Stunden in Nährmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde unter Verwendung von 96-well Zellkulturplatten die Produktion von IL-6, IL-2, IL-22 und TNF mittels dem OptEIA™ mouse IL-2 Set, OptEIA™ IL-22 Set und dem OptEIA™ TNF Set von BD Biosciences sowie dem Mouse IL-6 ELISA Set von e-Biosciences per ELISA die stattgefundenen Zytokinexpression der jeweiligen Gruppe quantitativ ermittelt. Jede Gruppe enthielt 5 Mäuse, wobei in den Diagrammen die jeweiligen Mittelwerte ± SEM dargestellt werden, * für p<0,05



26: Expression von IL-22 in Nkp46 positiven Zellen von WT- und Rag1^{-/-}- Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis versus derer von gesunden Tieren. Mittels MACS-Sort wurden Nkp46 positive Zellen der Milz von WT-Mäusen und Rag1^{-/-}-Mäusen mit induzierter DSS-Kolitis sowie mesenteriale Lymphknoten von WT-Mäusen mit DSS-Kolitis und Nkp46 positive Zellen der Organe der jeweiligen negativen Kontrollgruppen isoliert. In einem anschließenden Arbeitsschritt wurde die RNA aus den Zellen extrahiert. Mittels des SuperScript III FirstStrandSynthesis Supermix von Invitrogen wurde nun die RNA in complementary-DNA umgeschrieben. Unter Verwendung des IL22-Primers von Sigma, München konnte mittels des PCR-Versuches quantitativ die Expression von IL-22 der verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt werden. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte bei dreifachem Probenansatz. * für p<0,05

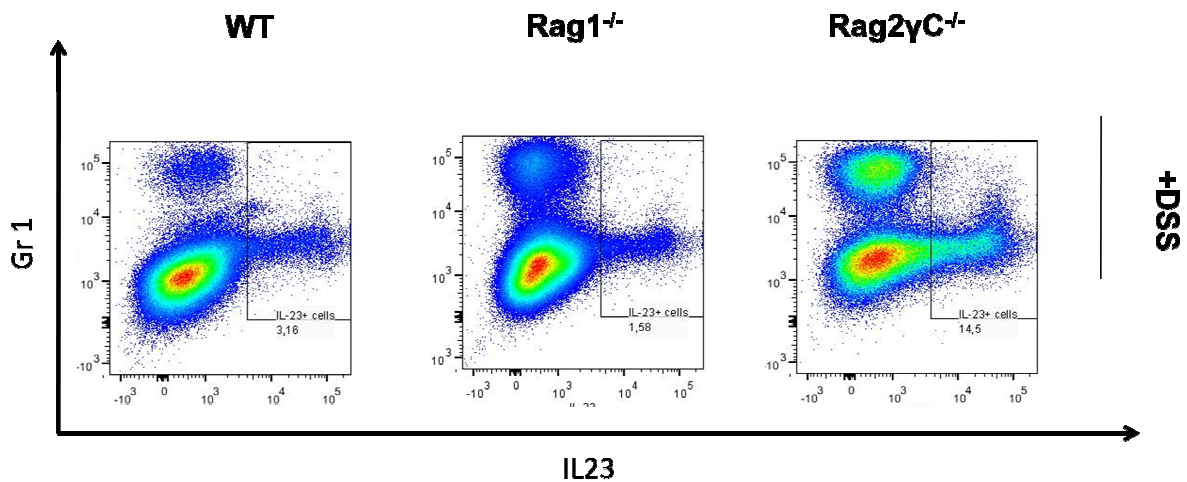
4.2.5.3 IL-23

Ergänzend zu IL-6 und IL-22 sollte nun auch die Expression von IL-23 in den Zellen der Lamina propria der verschiedenen Versuchsgruppen untersucht werden. Dieser Botenstoff wird vor allem von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert. Es spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von autoimmunen und chronisch entzündlichen Erkrankungen. Während IL-23 induzierte Entzündungen zunächst immer in Verbindung mit der Aktivität von Th17-Zellen gebracht wurden,[125] hat das Zytokin auch Einfluss auf das angeborene Immunsystem und kann zu T-Zell unabhängigen Kolitis führen.[126]

Die B-, T- und NK-Zell defizienten Rag2 γ C^{-/-}-Tiere mit DSS-induzierter Kolitis zeigten mit anteilig 14,5% der Lymphozyten eine stärkere Expression an IL-23 positiven

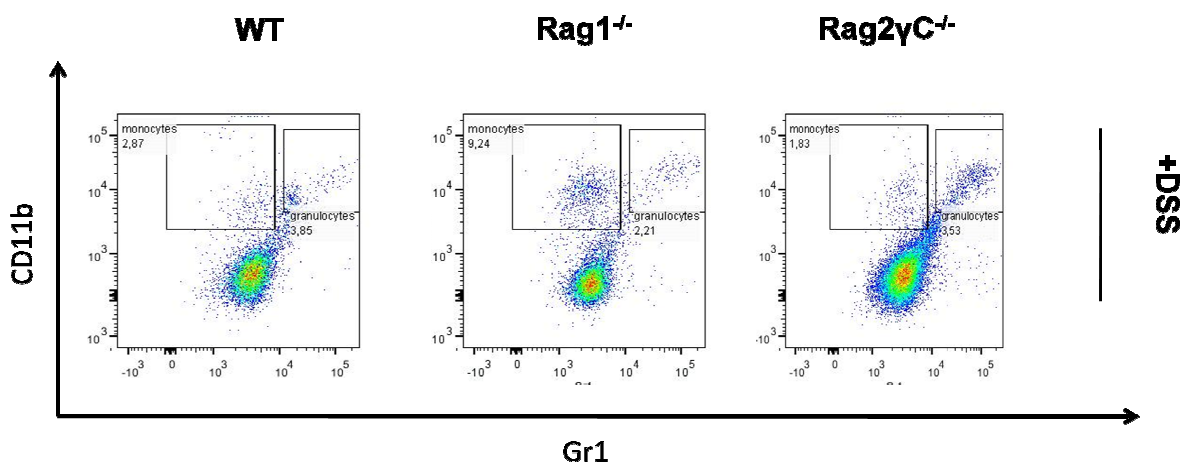
Ergebnisse

Zellen als die beiden anderen Versuchsgruppen, die jeweils nur 1,58% und 3,16% IL-23 positive Zellen aufwiesen. Die Zytokinproduktion an IL-23 der unterschiedlichen Zellpopulationen bei den verschiedenen Maustypen fiel unterschiedlich aus. Grundsätzlich zeigten die verschiedenen Abbildungen jedoch eine erhöhte Anzahl an IL-23 positiven Zellen bei der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse verglichen mit den anderen beiden Versuchsgruppen.

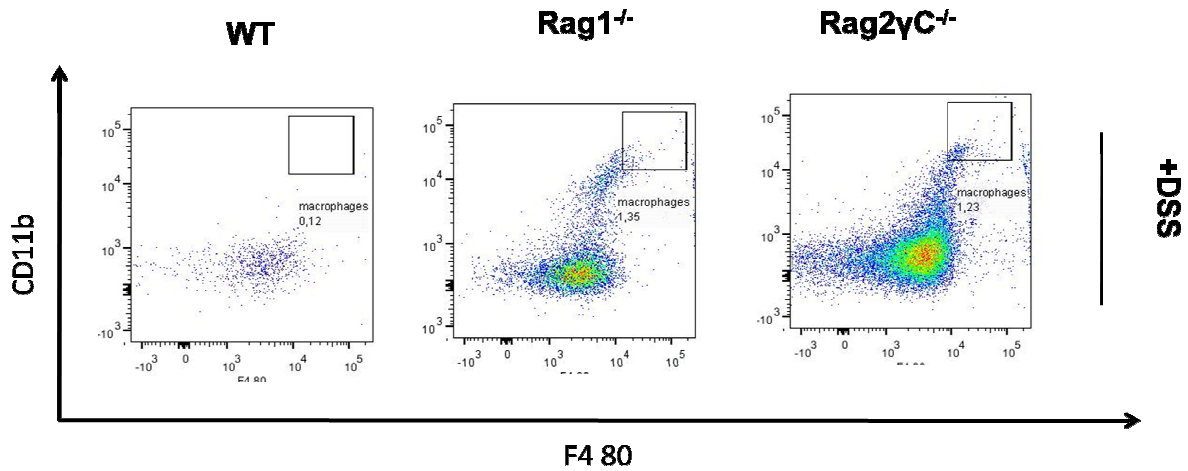


27: Expression von IL-23 in Lymphozyten der LPMC bei DSS-induzierter Kolitis und nativen Kontrolltieren. WT-, Rag1^{-/-}- und Rag2 γ C^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu trinken. An Tag 7 wurden die Zellen der LPMC wie im Methodenteil beschrieben isoliert, wobei jeweils die 5 Tiere der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit VioBlue-labeled anti-mouse Gr1 Antikörper sowie intrazellulär mit APC-labeled anti-mouse IL-23 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Gate, welches die zu untersuchenden Zellen zusammenfasst wurde nach Markierung der vitalen Zellen um die Lymphozytenpopulation gelegt. Als Isotypenkontrolle wurde ein VioBlue-labeled Rat anti-mouse IgG2b sowie ein APC-labeled Rat anti-mouse IgG2a mitgeführt.

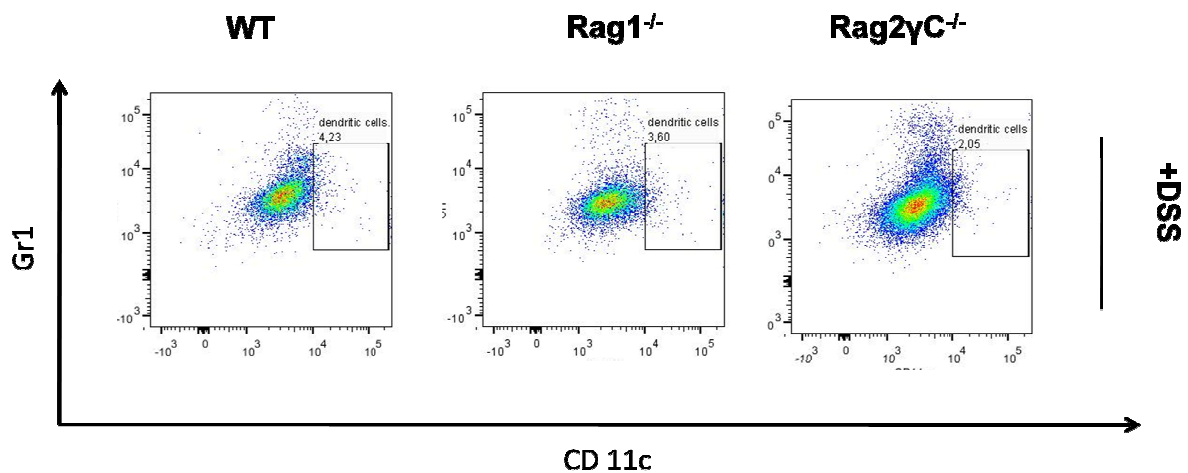
A Monozyten/Granulozyten



B Makrophagen



C dendritische Zellen



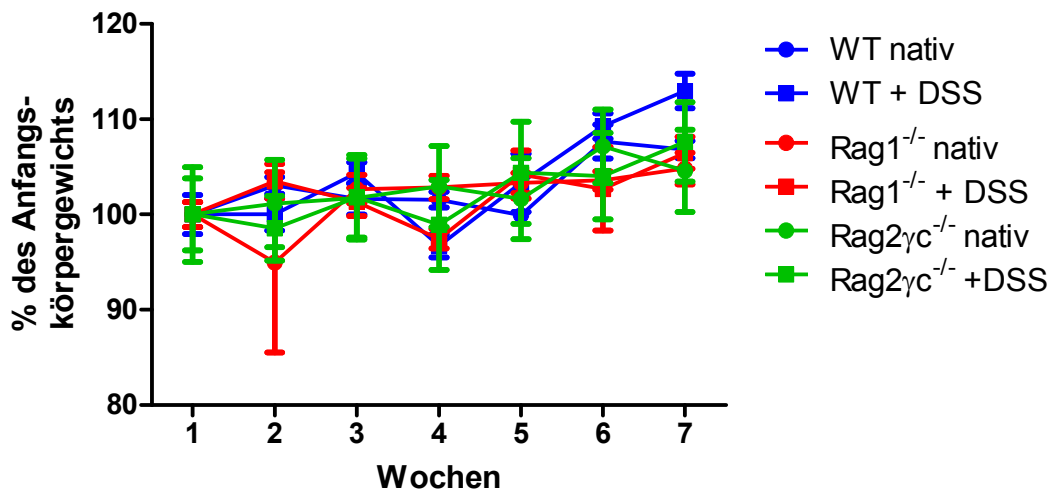
28: Charakterisierung der unterschiedlichen Zellpopulationen (A-C) der LPMC's, die IL-23 produzieren bei DSS-induzierter Kolitis und nativen Kontrolltieren. WT-, Rag1^{-/-}- und Rag2γC^{-/-}-Mäusen wurde durch die Gabe von 5% DSS-Lösung für 5 Tage und anschließend Leitungswasser über 2 Tage eine Kolitis induziert. Die Kontrollgruppen erhielten über den gesamten Zeitraum lediglich normales Leitungswasser zu Trinken. An Tag 7 wurden die Zellen der LPMC wie im Methodenteil beschrieben isoliert, wobei jeweils die 5 Tiere der einzelnen Versuchsgruppen gepoolt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit VioBlue-labeled anti-mouse Gr1 Antikörper und PerCP-Cy5.5-labeled anti-mouse CD11cAntikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Das Gate, welches die zu untersuchenden Zellen zusammenfasst wurde nach Markierung der vitalen Zellen um die CD45 positiven Zellen sowie darauffolgend auf IL-23 positive Zellen gelegt. Als Isotypenkontrolle wurde ein VioBlue-labeled Rat anti-mouse IgG2b sowie ein PerCP-Cy5.5-labeled Armenian Hamster anti-mouse IgG mitgeführt.

4.3 Chronische DSS-induzierte Kolitis WT/ Rag1^{-/-}/ Rag2γC^{-/-}

In einem dritten Versuch wurde mit den gleichen Versuchsgruppen WT, Rag1^{-/-} und Rag2γC^{-/-} mittels DSS eine chronische Kolitis induziert. Hierzu wurde den Tieren über 6 Wochen im Wechsel wochenweise 1,5% DSS und normales Leitungswasser zu Trinken verabreicht. Lediglich in der ersten Woche wurde nur 1% DSS gegeben um einen schleichenden Entzündungsbeginn zu erzielen. Wie auch bei der akuten DSS-Kolitis wurden drei negative Kontrollgruppen mitgeführt. An Tag 57 wurde der Versuch beendet, die Tiere wurden per Genickbruch getötet und proximales und distales Kolon zur histologischen Analyse entnommen.

4.3.1 Gewichtsverlauf

Gegensätzlich zu dem Versuch der akuten DSS-Kolitis nahmen hier alle Versuchsgruppen über die Dauer von 6 Wochen an Gewicht zu. Nach einer Dauer von 4 Wochen kam es bei den Tieren mit induzierter Kolitis zunächst zu einem Gewichtsverlust von ca. 3%, hier gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Maustypen. Bei Versuchsende zeigten von den mit DSS behandelten Tieren die WT-Mäuse mit ca. 13% die stärkste Gewichtszunahme gefolgt von den Rag1^{-/-}-Mäusen mit 7% bzw. den Rag2γC^{-/-}-Mäusen mit knapp 5%.



29: Körpergewichtskurve von Mäusen mit chronischer DSS Kolitis gegenübergestellt zu unbehandelten Mäusen. WT-Mäuse bekamen über 6 Wochen im Wechsel eine 1,5% (in der ersten Woche 1%) DSS-Lösung und normales Leitungswasser zum Trinken und wurden jeden Tag gewogen. Das Körpergewicht wird angegeben als prozentualer Anteil des Startgewichts und wird dargestellt als Mittelwert ± SEM (*n* =5 Mäuse).

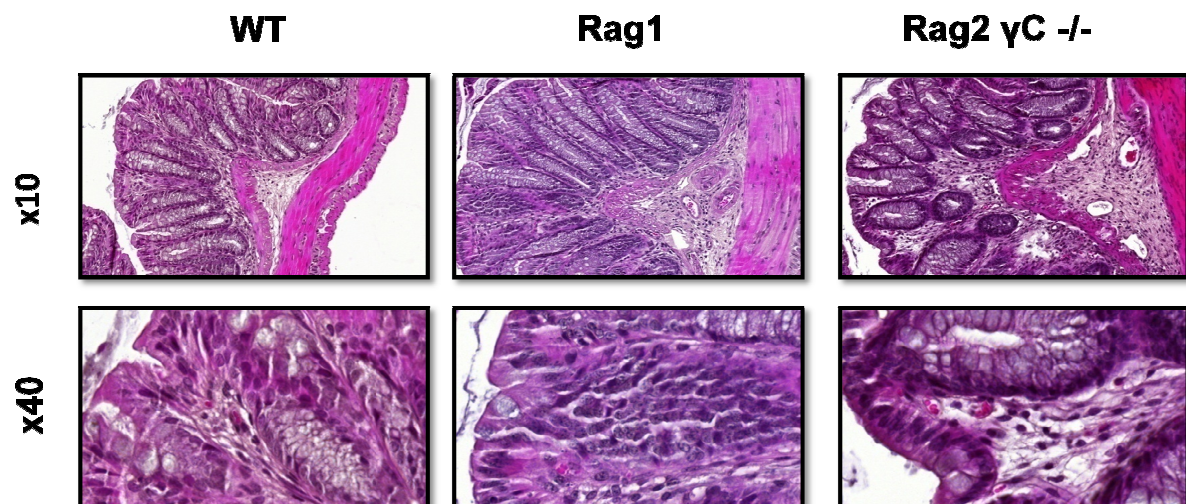
Ergebnisse

4.3.2 Histologie und histologischer Score

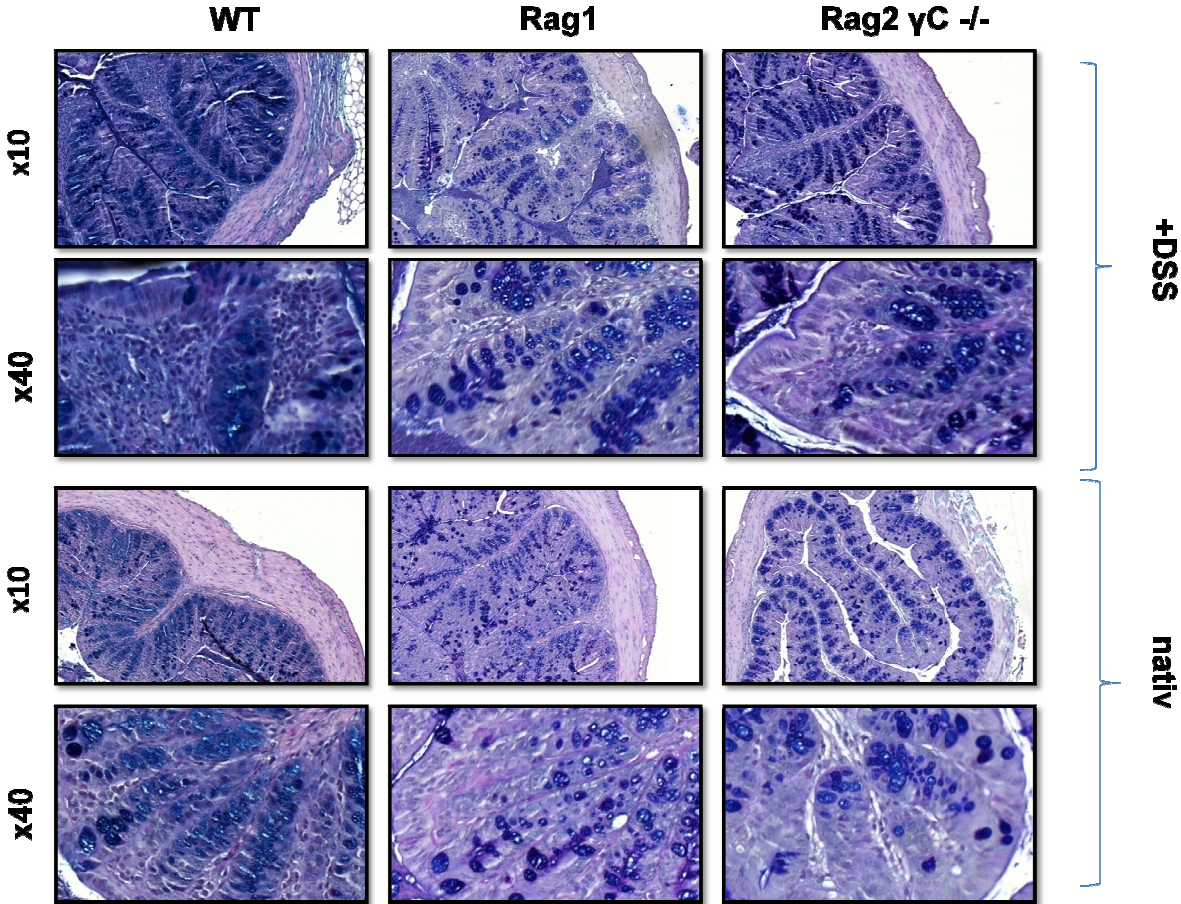
An Tag 57 wurde der Versuch beendet, die Tiere wurden per Genickbruch getötet und sowohl proximales als auch distales Kolon zur histologischen Analyse entnommen. Auf Basis einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurde wie auch in vorangehenden Versuchen die entzündliche Aktivität der verschiedenen Versuchsgruppen bewertet. Ebenso wurde eine PAS Färbung der beiden Kolonabschnitte angefertigt.

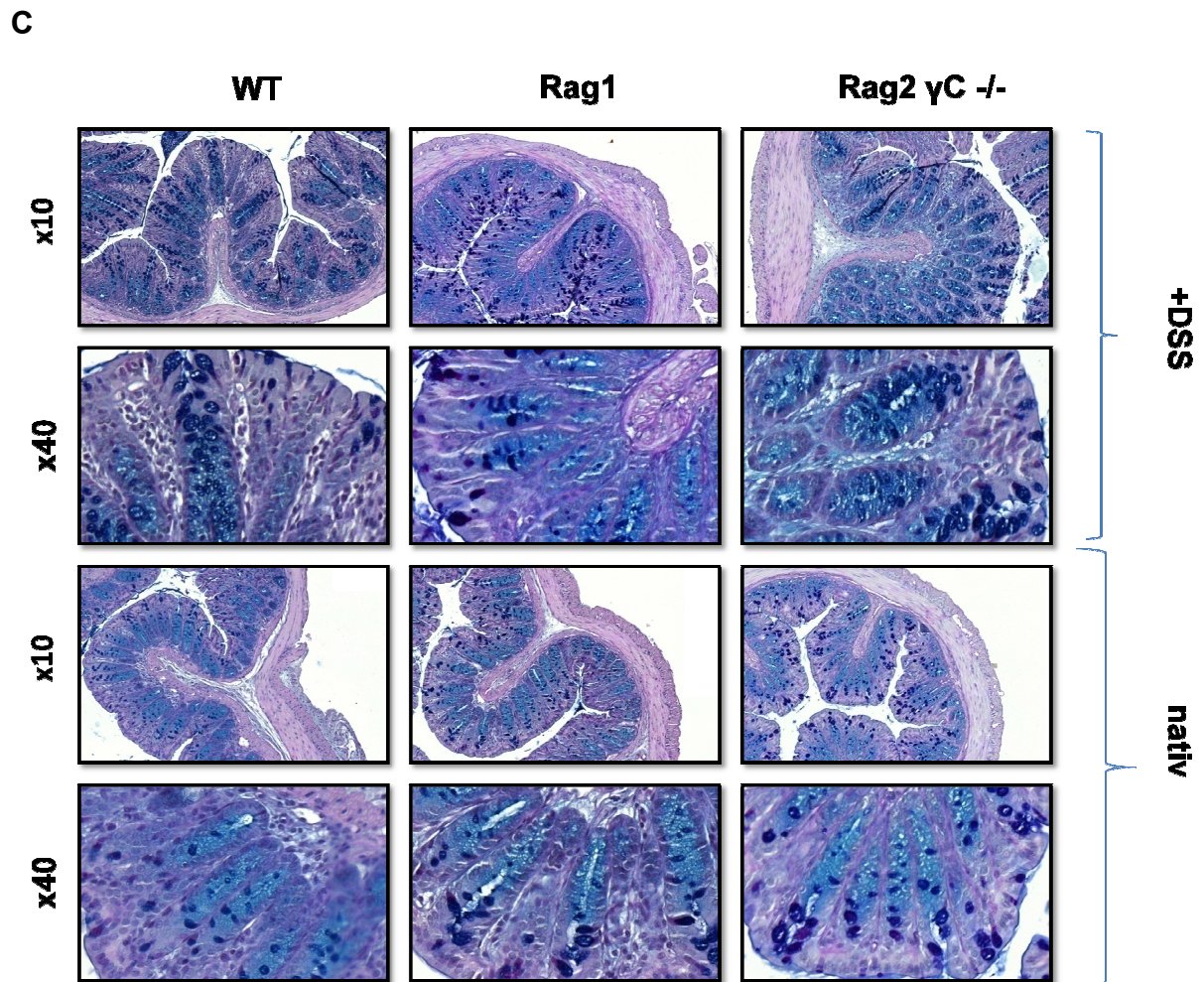
Generell lässt sich sagen, dass bei allen drei Maustypen die entzündlichen Veränderungen bei der chronischen DSS-induzierten Kolitis in der Darmschleimhaut deutlich weniger ausgeprägt waren als bei der akuten DSS-induzierten Kolitis. Korrelierend mit dem vorangehenden Versuch zeigten die Rag1^{-/-}-Tiere die am wenigsten ausgeprägten Veränderungen. Auch bei den WT- und Rag2γC^{-/-}-Tieren blieb die Kryptenarchitektur weitestgehend erhalten. Es fanden sich jedoch regenerative Verdickungen der Darmwand und lymphozytäre Infiltrationen bei beiden Gruppen. Ebenso war ein geringer Becherzellverlust zu verzeichnen.

A

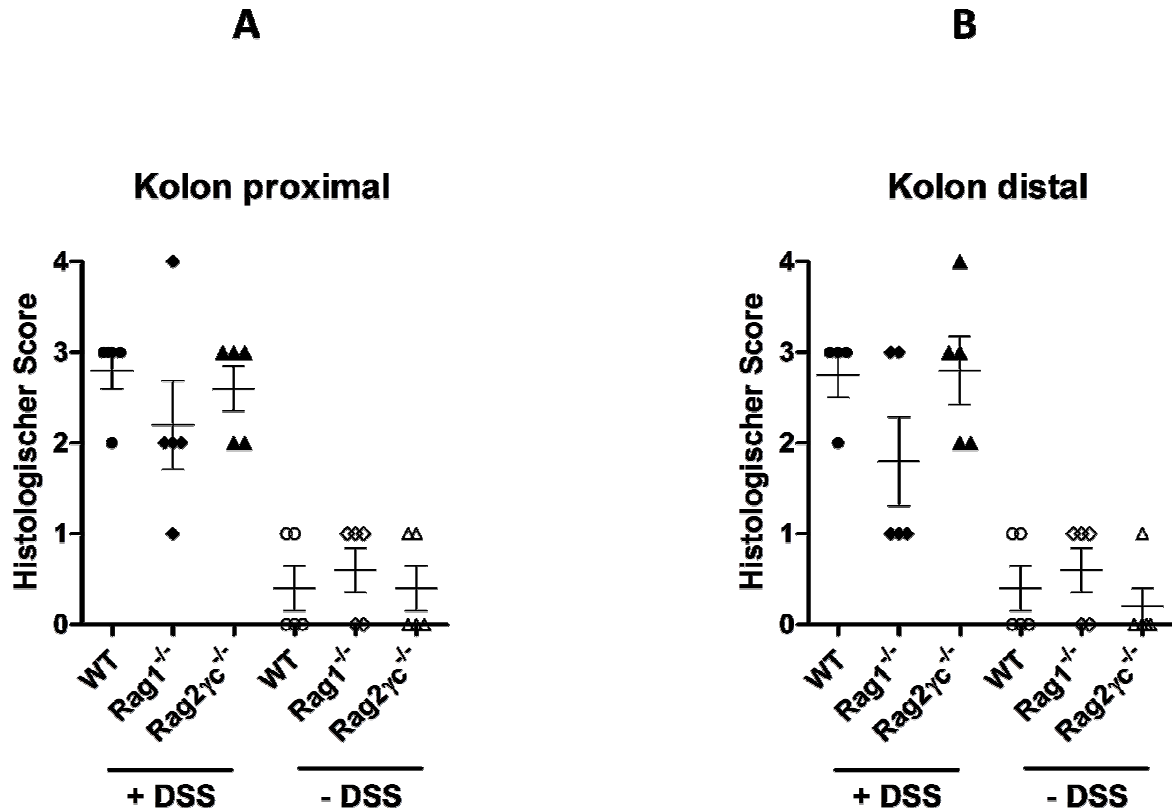


B





30: Histologische Merkmale von Mäusen mit chronischer DSS-Kolitis. WT-, Rag1^{-/-}- und Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse bekamen über 6 Wochen im Wechsel eine 1,5 bzw. 1% DSS Lösung und normales Leitungswasser zum Trinken. An Tag 57 wurde der Versuch beendet, es wurden Proben vom distalen und proximalen Kolon genommen. Repräsentative Hämatoxylin/Eosin-Färbung des distalen Kolons (**A**) und PAS-Färbung des proximalen (**B**) und distalen (**C**) Kolons von WT-, Rag1^{-/-}-, Rag2 γ C^{-/-}-Mäusen mit akuter DSS-Kolitis sowie jeweils den negativen Kontrollgruppen. (Vergrößerungen: obere Reihe x10, untere Reihe x 40)



31: Histologischer Score von Mäusen mit chronischer DSS-Kolitis versus unbehandelte Mäuse. WT-, Rag1^{-/-} und Rag2^{γC^{-/-}}-Mäuse bekamen über 6 Wochen im Wechsel eine 1,5 bzw. 1 % DSS-Lösung und normales Leitungswasser zum Trinken. Am Ende der 7. Woche wurden Proben vom distalen und proximalen Kolon genommen und mithilfe einer Hämatoxylin/Eosin Färbung ein histologischer Score bestimmt. **(A)** Histologischer Score des proximalen Kolons von Mäusen mit chronischer DSS Kolitis versus unbehandelte Mäuse **(B)** Histologischer Score des distalen Kolons von Mäusen mit chronischer DSS Kolitis versus unbehandelte Mäuse. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± SEM. Keine Signifikanz messbar. (n= min 4)

4.3.3 Immunhistochemie Ki-67

Auch bei der chronischen Kolitis wurde zusätzlich zu den herkömmlichen histologischen Färbungen eine immunhistochemische Färbung von proximalem und distalem Kolon auf den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt.

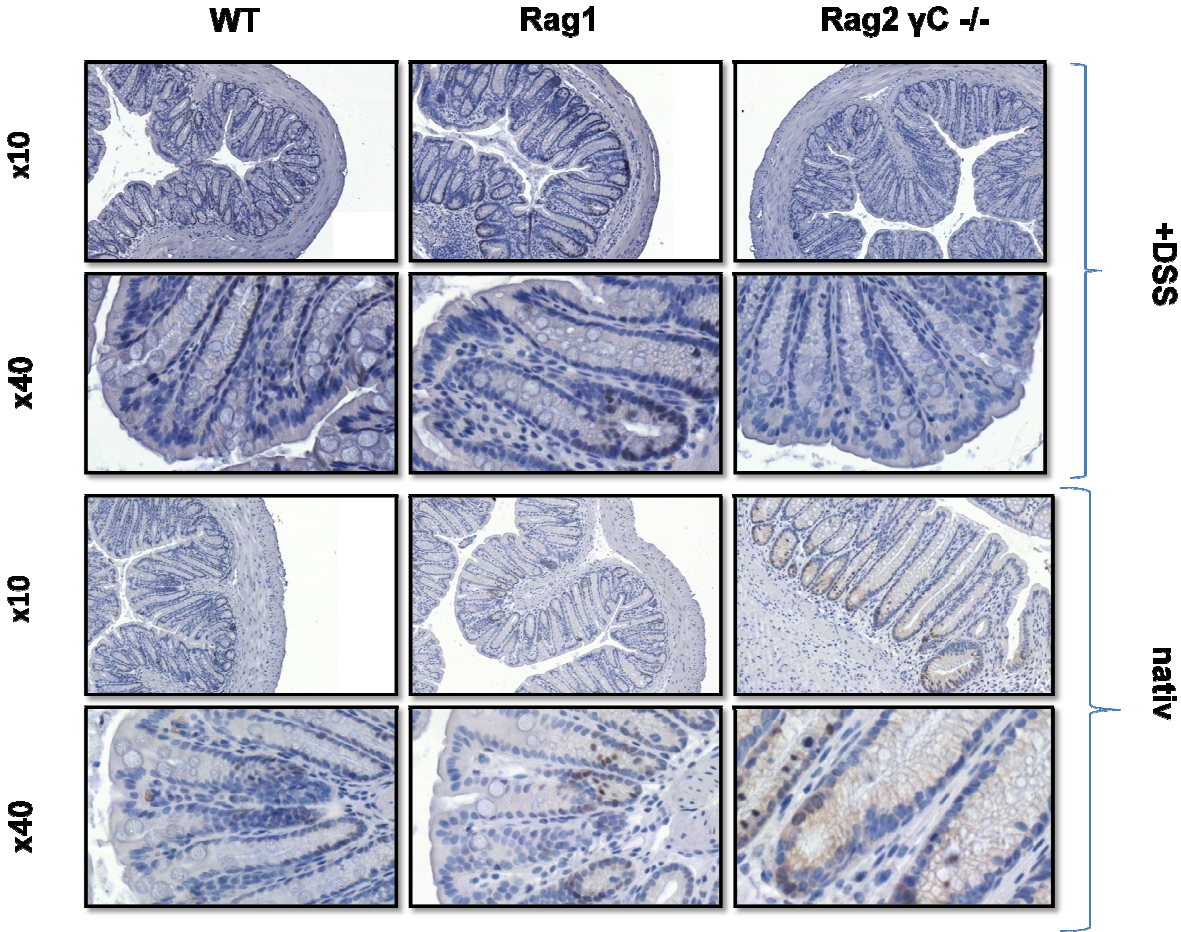
Anschließend wurde auch hier nach gleicher Vorgehensweise wie bei der akuten Kolitis ein Ki-67-Index erstellt:

Im proximalen Kolon konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils an Ki-67 positiven Zellen weder innerhalb der Kolitisgruppen noch zwischen Kolitisgruppen und nativen Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Im distalen Kolon wiesen die mit DSS behandelten WT-Tiere einen höheren Anteil an Ki-67 positiven Zellen gegenüber den beiden anderen Kolitisgruppen und einen signifikant höheren

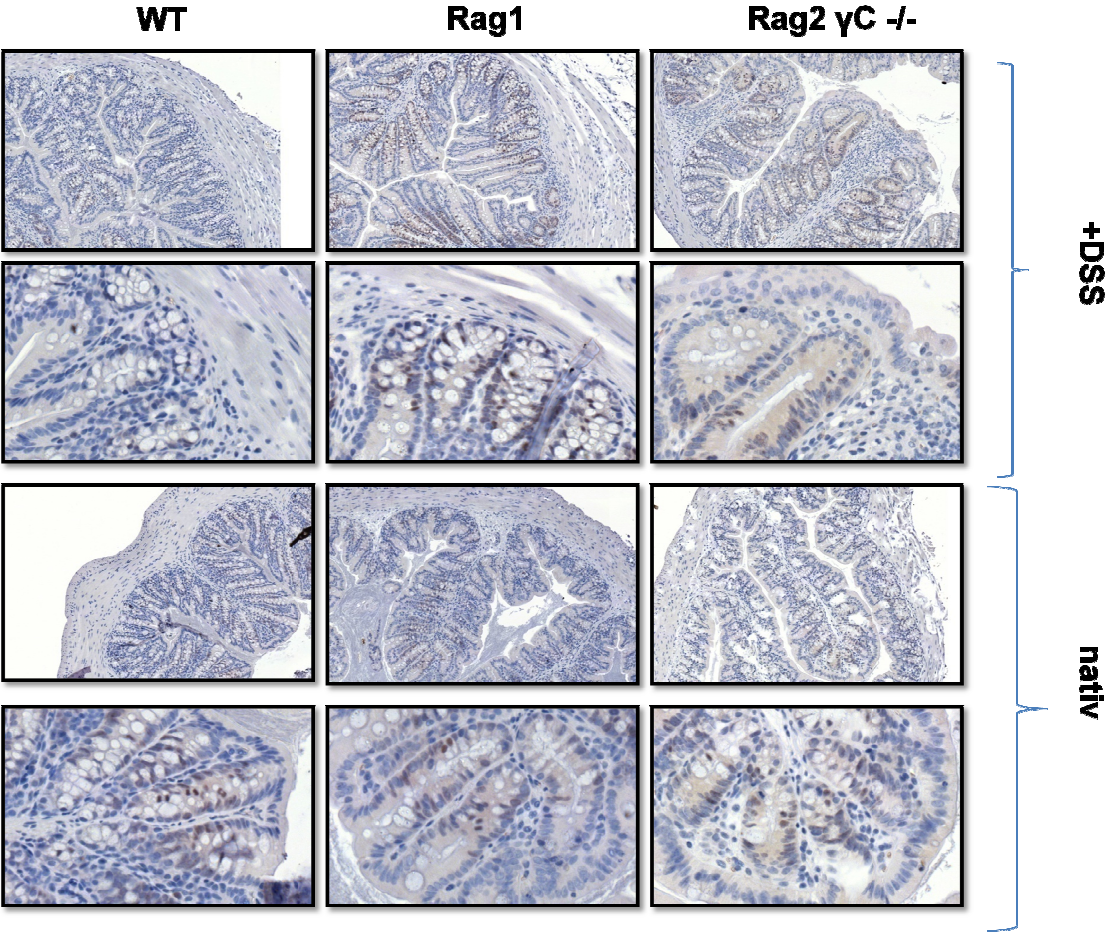
Ergebnisse

Anteil gegenüber den nativen WT-Tieren. Bei den nativen Versuchsgruppen konnte überdies ein signifikant höherer Anteil an Ki-67 positiven Zellen der Rag1^{-/-}-Mäuse gegenüber den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren ausgemacht werden.

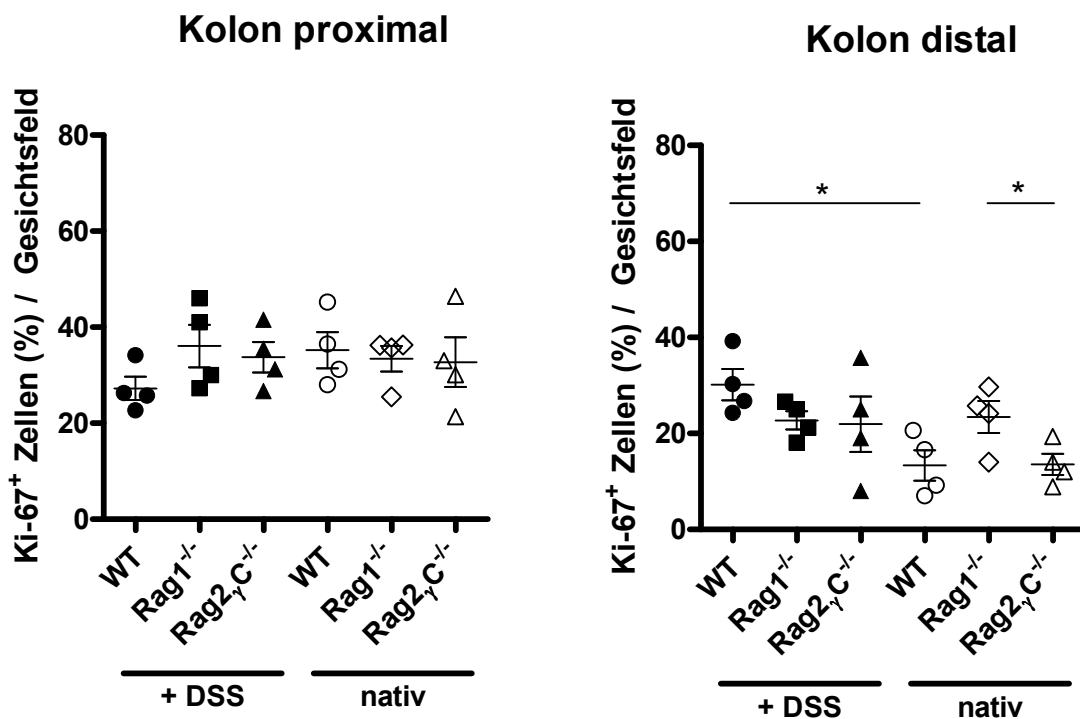
A



B



C



32: Immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67 von Mäusen mit chronischer DSS-Kolitis im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die Mäuse erhielten über 6 Wochen im Wechsel eine 1,5 bzw. 1% DSS-Lösung und normales Leitungswasser, wobei die Kontrollgruppen lediglich Leitungswasser erhielten.

Es handelt sich um Schnitte des proximalen (A) und distalen (B) Kolons nach Ende der 6. Woche bei chronischer DSS-Kolitis sowie den entsprechenden Kontrollgruppen. In der Bildreihe handelt es sich um eine herkömmliche immunhistochemische Färbung mit einem Ki-67 Rat anti-mouse Antikörper von DakoCytomation. (Vergrößerungen obere Reihe x10, untere Reihe x40) In (C) ist der prozentuale Anteil an Ki67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei chronischer Kolitis dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem T-Test ermittelt, * steht für $p < 0,05$, die horizontalen Balken stellen den Mittelwert \pm SEM dar.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung/Relevanz der Studie

Der Formenkreis der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erfährt weltweit steigende Inzidenz- und Prävalenzzahlen und ist auf dem besten Weg in die Gruppe der sogenannten globalen Krankheiten aufgenommen zu werden.[127] Während in Europa und Nordamerika, den Kontinenten, die mit ca. 1,4 und 2,2 Millionen Erkrankten die Hauptgebiete der CED bilden, die Zahlen sich mittlerweile stabilisieren, sind vor allem die Schwellenländer und die sich rasch entwickelnden „Dritte-Welt-Länder“ zunehmend von jenen Erkrankungen betroffen.[6, 7, 10, 11, 128] Auch ist an dieser Stelle die nicht ganz unerhebliche Belastung der Gesundheitssysteme zu nennen: Trotz der verglichen mit herkömmlichen Magen-Darmerkrankungen geringen Prävalenz werden beispielsweise in den USA jährlich über zwei Billion Dollar für die Therapie von CED ausgegeben, wobei die Ausgaben aufgrund neuerer kostspieligeren Therapien weiter ansteigen.[129-131]

Seit der Erstbeschreibung der CED vor ca. 86 Jahren konnten Gastroenterologen und Immunologen weltweit, vor allem in den letzten 10 Jahren, große Fortschritte in der Entschlüsselung der Entstehungsmechanismen dieser Erkrankungen erzielen; dennoch ist die Pathophysiologie leider bisher nur lückenhaft verstanden und birgt noch immenses Forschungspotenzial. [2, 3]

Im therapeutischen Bereich wurden bisher vor allem klassische antiinflammatorische, immunsupprimierende Substanzen wie z.B. Kortikosteroide und Azathioprin eingesetzt.[132-134] In den letzten Jahren wurden auch neue Substanzen, sogenannte Biologicals eingeführt. Dies sind Antikörper, welche an das allgemein proinflammatorisch wirkende Zytokin TNF- α binden und so die Entzündungsreaktion mildern. Allerdings ist deren Wirkungsfähigkeit wie auch bei oben genannten Wirkstoffgruppen durch Toleranzentwicklung und Toxizität stark limitiert. [70] Zudem konnten in laufenden Forschungsprojekten in naher Vergangenheit mit der Identifikation von gewissen Effektorzytokinen (IL-12, IL23), die eine bedeutende Rolle in der Entzündungsinduktion und –aufrechterhaltung spielen, neue Angriffspunkte für eine antiinflammatorische Therapie gewonnen werden.[135-137]

Mit dieser Arbeit erhofften wir uns, auf basisimmunologischer Ebene ein besseres Verständnis für die Rolle der NK-Zelle in entzündlichen Darmerkrankungen zu

erlangen um in ferner Zukunft einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt für die Therapie der CED zu etablieren.

5.2 Was für eine Rolle spielen NK-Zellen bei CED?

Vor 30 Jahren rückten NK-Zellen erstmals in den Fokus von Immunologen. Bald bildeten sie mit ihrer Fähigkeit, gewisse Zielzellen ohne vorherige Sensibilisierung zerstören zu können, sowie weiteren Eigenschaften, die sich von denen der B- und T-Zellen deutlich unterscheiden, eine eigene lymphozytäre Untergruppe [107].

Daher werden die in der Einleitung unter 1.3 vorgestellten NK-Zellen gerne auch als (atypische) Lymphozyten des angeborenen Immunsystems bezeichnet. Die Aktivität der NK-Zellen wird vor allem durch Zell-Zell Interaktionen und lösliche Faktoren reguliert.[98] Neben ihrer zytolytischen Funktion können NK-Zellen erstaunlicherweise auch Zytokine und Chemokine produzieren, die wiederum andere hämatopoietische Zellen rekrutieren und aktivieren können. Sie werden von Di Santo daher gerne als Dirigenten von entzündlichen Abläufen/Reaktionen bezeichnet.[107] Eben aufgrund genannter Eigenschaften sind NK-Zellen nicht nur dem angeborenen Immunsystem zuzurechnen sondern modifizieren auch die Antwort des adaptiven Immunsystems [138]. Während früher vermutet wurde, dass diese Zellpopulation eine homogene uniforme Gruppe darstellt, weiß man heute, dass es verschiedene Untergruppen gibt, die unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben und verschiedene Oberflächenmarker exprimieren [139]. Wie sich die Aktivität der NK-Zelle äußert ist abhängig von auslösendem Reiz sowie der NK-Zell Untergruppe, die sich bezüglich Zytotoxizität und Zytokinproduktion unterscheiden [118, 140] Aktuell wird immer wieder die Bedeutung von NK-Zellen als regulatorischen Zellen in entzündetem Gewebe diskutiert. Es wird spekuliert, ob die Zellgruppe entweder limitierend oder exazerbierend auf entzündliche Prozesse einwirkt.[107] Wir legen in dieser Arbeit den Schwerpunkt auf die Funktion der NK-Zellen in entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes:

Bereits 1986 befasste man sich mit diesem Thema: In einer Studie untersuchten Ergava et al. die Aktivität von NK-Zellen bei Patienten mit CED. Es konnte festgestellt werden, dass bei Patienten mit CU sowohl in remissiver als auch in aktiv entzündlicher Situation keine signifikanten Unterschiede zu gesunden Probanden bestanden. Bei Patienten mit MC konnte jedoch eine signifikant niedrigere Aktivität der NK-Zellen gegenüber Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Des Weiteren war bei MC die NK-Zell-Aktivität in akut entzündlicher Situation noch einmal signifikant

Diskussion

niedriger als in remissivem Zustand. Erstaunlicherweise ist eine herabgesetzte Anzahl oder ein Reifungsdefekt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht Ursache für eine herabgesetzte Aktivität, denn mittels eines anti-Leu.11a Antikörpers wurden zirkulierende NK-Zellen bei Patienten mit MC quantitativ nachgewiesen und erschienen zahlenmäßig nicht herabgesetzt.[141].

Außerdem konnte in einer Studie von Fort et al. des Jahres 1998 anhand eines Transferkolitis-Modells gezeigt werden, dass NK-Zellen einen mildernden Effekt auf die Th1-vermittelte Kolitis ausüben [51], sodass unserer Zellpopulation zunächst eine protektive Wirkung auf entzündliche Darmerkrankungen zugesprochen wurde.

Einige Forschungsgruppen beschäftigten sich überdies mit intestinalen intraepithelialen Lymphozyten (IEL), die eine große lymphozytäre Population innerhalb des Organismus bilden und sich um die mukosalen Epithelzellen im Darm anordnen. Eiras et al. konnten im Jahr 2000 innerhalb dieser IEL eine $CD3^-CD7^+$ Untergruppe phänotypisch genauer charakterisieren, wobei sich herausstellte, dass genannte Gruppe einige NK-Zell Oberflächenmoleküle exprimiert und zudem über zytolytische Aktivität verfügte. So wurde die Hypothese gestellt, dass neben den Peyer Patches, der Lamina propria und solitären intestinalen Lymphfollikeln, die Darmschleimhaut an sich ein Kompartiment für NK-Zellen auch in nichtentzündlicher Situation darstellt.[142] Drei Jahre später konnte dann eine Forschergruppe um Leon mittels durchflusszytometrischer Analyse und Zytotoxizitätsassessments von menschlichem Darmgewebe erstmals funktionelle NK-Zellen in der menschlichen Darmschleimhaut nachweisen und so die durch Eiras et. al. gestellte Hypothese belegen [143].

Im Blut zirkulierende NK-Zellen kann man grob in zwei Gruppen unterteilen: Einerseits gibt es die $CD56^+CD16^+$ Zellen, welche einen hohen Perforingehalt aufweisen und so über eine hohe Zytotoxizität verfügen. Andererseits gibt es die $CD56^+CD16^-$ Zellen, welche quantitativ den andern Zellen unterlegen sind, nur über ein sehr niedriges zytolytisches Potenzial verfügen und vor allem die Zytokine IFN_γ , TNF, IL-10 und IL-13 produzieren.[140, 144]

Interessanterweise ist bei Patienten mit CED der Anteil an $CD56^+CD16^+$ NK-Zellen, welche über eine stark zytolytische Aktivität verfügen, gegenüber gesunden Probanden in der Lamina propria deutlich erhöht gewesen.[144]Gegensätzlich dazu wurde festgestellt, dass der Anteil an $CD161^+$ -NK-Zellen in der Lamina propria bei Menschen mit MC und CU im Vergleich zu gesunden Personen signifikant vermindert

Diskussion

war, weswegen dieser Untergruppe eine potenziell anti-inflammatorische Funktion zugesprochen wurde.[145]

Die mukosalen NK-Zellen unterscheiden sich phänotypisch deutlich von ihrem im Blut vorkommenden Pendant und können treffender als „Helfer“ NK-Zelle bezeichnet werden. Ihre Erscheinung ist charakterisiert durch die Expression eines Transkriptionsfaktors, RORC bzw. ROR γ T in Mäusen, CD127 und Nkp44 bzw. Nkp46 in Mäusen. Abhängig von der Expression des Oberflächenproteins CD56 können NK-Zellen in funktionell unterschiedliche Untergruppen unterteilt werden. Dieser Marker entspricht bei Mäusen dem in der Arbeit verwendeten CD27. Mukosale CD56⁺ NK-Zellen produzieren große Mengen an TNF und INF- γ . Möglicherweise kann durch eine zahlenmäßige Reduktion dieser Zellen ein positiver Einfluss auf epitheliale Reparaturmechanismen gewonnen werden. [146, 147] Erst neulich konnte eine weitere NK-Zell Unterart in der Lamina propria von Mäusen detektiert werden. Es handelt sich um eine Nkp46⁺CD56⁺CD3⁻ Zelle, die in der Lamina propria um die Kolonkrypten angesiedelt ist. Diese NK-Zelle exprimiert den Marker ROR γ T, produziert viel IL-22 aber weder IFN- γ noch IL-17 nach in-vitro Stimulation. Außerdem verfügt sie über kein zytolytisches Potenzial! Vermutlich handelt es sich hier um einen protektiven Vertreter der NK-Zellen, welcher positiven Einfluss auf epitheliale Homöostase und Prävention intestinaler Entzündungen nimmt.[148-150]

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit MC die Anzahl der IL-12 und IL-6 produzierenden dendritischen Zellen im Vergleich zu gesunden Menschen deutlich erhöht ist, und möglicherweise eine verstärkte Stimulation der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen bewirkt.[151]

Welche Rolle IL-22 produzierende Nkp44⁺ und Nkp46⁺ NK-Zellen in der Mukosa einnehmen, stellt eine weitere noch unzureichend beantwortete Frage dar. Anhand von diversen Studien an Patienten konnte gezeigt werden, dass NKp46⁺ IFN γ produzierende Zellen in entzündetem Darm stark vermehrt vorkommen, während die Zahl IL-22 produzierender Nkp44⁺ Zellen verglichen mit Patienten mit CU bzw. gesunden Menschen stark herabgesetzt war. An dieser Stelle wurde überdies die Vermutung geäußert, dass die starke Produktion von IFN γ womöglich durch den Botenstoff IL-23 getriggert wird. Genannte Fakten suggerieren, dass ein Missverhältnis der beiden NK-Zell Unterarten vielleicht die Entstehung von MC begünstigt und speziell das Einwirken der Nkp46⁺ Zellen mitverantwortlich ist für die Entstehung von CED.[152]

So überrascht es nicht, dass durch mehrere Studien anhand von Mausmodellen in der Tat belegt wurde, dass NK-Zellen in Autoimmunerkrankungen entweder eine die Krankheit fördernde oder aber auch gegensätzlich eine abmildernde Funktion einnehmen können.[153] Die genaue Rolle der NK-Zellen bei entzündlichen Darmerkrankungen ist nach wie vor weitestgehend ungeklärt, es gibt jedoch immer mehr Belege dafür, dass gewisse Untergruppen sich bezüglich Aktivität und Zytotoxizität unterschiedliche bzw. gegensätzlich verhalten und so entweder die Pathogenese von CED begünstigen oder auf diese inhibierend einwirken.[144, 145, 147]

5.3 DSS-Kolitismodell

Tiermodelle intestinaler Entzündungen sind unabdingbar für die Erweiterung unseres Verständnisses der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Je mehr klinische Aspekte und pathophysiologische Mechanismen einer im Tiermodell induzierten Erkrankung sich mit denen beim Menschen decken, desto größer der Benefit. Seit 1993 wurden mehr als 20 neue Tiermodelle zur Erforschung der Pathophysiologie der CED entwickelt. Die unterschiedlichen Modelle kann man in vier Kategorien unterteilen: Spontane Modelle, bei immunkompetenten Tieren induzierte Modelle, Modelle mit adoptivem Transfer und Modelle mit Verwendung von transgenen und knockout Tieren.[81]

Für diese Arbeit wurde das in unserer Arbeitsgruppe bereits häufig verwendete und erprobte Modell der DSS-induzierten Kolitis mit Verwendung von Knockoutmäusen gewählt.

Es handelt sich hierbei um ein, durch einen Zucker induziertes Kolitismodell. Aufgrund der guten Verfügbarkeit und Reproduktivität sowie starker Homologie mit den humanen CED stellt es in der Forschung eines der meist verwendeten Kolitismodelle dar[82]. Neben den genannten Vorzügen hat dieses Modell sich in unserem Fall besonders angeboten, da wir mit den Knockoutmäusen Rag1^{-/-} und Rag2 γ C^{-/-} gearbeitet haben, welche beide defizitär an B- und T- bzw. NK-Zellen sind. Denn auch bei diesen immundefizienten Tieren kann mit diesem Modell im Gegensatz zu anderen Modellen, unabhängig von T-, B- und NK-Zellen, vermutlich gesteuert durch das angeborene Immunsystem, eine schwere intestinale Entzündung induziert werden[86]. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass verschiedene Mausstämme sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber DSS unterscheiden. In dieser Studie wurden ausschließlich Tiere mit einem C57BL/6

Diskussion

Hintergrund verwendet, die eine mittlere bis hohe Empfindlichkeit gegenüber DSS aufweisen. Dieser Stamm eignet sich hier zudem sehr gut, da die Tiere bei Gabe von 5%DSS über 5 Tage bei einer sehr niedrigen Todesrate eine starke Kolitis entwickelten.[154]

Durch orale Verabreichung des Polymers Dextran Sulfat Natrium(DSS) im Trinkwasser der Tiere, kann je nach Verabreichungsdosis und –dauer eine akute oder chronische Kolitis induziert werden.[85] Der Entstehungsmechanismus ist noch nicht vollends geklärt, basiert aber vermutlich auf einem direkt toxischen Effekt des DSS auf das Darmepithel, sodass es zu einer Störung der Integrität der epithelialen Barriere kommt.[82] Es konnte nämlich nachgewiesen werden, dass es zunächst noch vor Einsetzen der eigentlichen Entzündung zu einer erhöhten mukosalen Permeabilität kommt. Durch die defekte intestinale Barriere kommt es durch Penetration von luminalen Bakterien dann zur Aktivierung des mukosalen Immunsystems.[81, 155] Bei Tieren, die in einer keimfreien Umgebung gezüchtet wurden, kann durch DSS keine Kolitis induziert werden [84].Klinisch äußert sich diese Art der Kolitis durch blutige Diarrhöe, Bewegungsarmut, Gewichtsverlust und struppiges Fell während sich histologisch vor allem Ulzerationen und granulozytäre Infiltrationen sowie Ansammlungen von Makrophagen finden lassen [85].

Kritisch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass induzierte Kolutismodelle den Krankheitshergang nicht ganz realitätsgetreu wiedergeben. Die Verwendung eines spontanen Modells würde die Krankheitsentstehung besser darstellen: Man geht davon aus, dass es bei Menschen mit einer gewissen genetischen Prädisposition durch den Einfluss gewisser Umweltfaktoren zum „Ausbruch“ von CED kommt. Anhand von spontanen Kolutismodellen lassen sich v.a. Aussagen über die Anfälligkeit, bei bestimmten genetischen Profilen an einer entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken, treffen. Das in unserem Fall verwendete induzierte DSS-Modell mit Knockoutmäusen, diente hingegen dem Vergleich der Ausprägung der intestinalen Inflammation in immunologisch unterschiedlichen ausgestatteten Mäusen und lässt keine Hypothese bezüglich der Entstehungsursache der Erkrankung zu.

Abschließend ist anzumerken, dass keines der bisher verwendeten Tiermodelle die CED beim Menschen in allen ihren Aspekten widerspiegelt. So konnte bisher

beispielsweise weder ein Modell etabliert werden, welches den häufig chronisch rezidivierenden Verlauf der CED nachmimt, noch eines, das sich auch durch extraintestinale Manifestationen äußert.

5.4 Kritische Zusammenfassung eigener Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Studien

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand eines murinen Tiermodells gezeigt werden, dass NK-Zellen in Abwesenheit von B- und T-Zellen eine entzündungsregulierende Funktion im Zustand der akuten DSS-induzierten Kolitis ausüben.

5.4.1 Akute DSS-induzierte Wildtyp-Kolitis

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei welchem immunkompetenten WT-Mäusen mittels Gabe von 5% DSS über 5 Tage und anschließend über 2 Tage Leitungswasser eine akute Kolitis induziert wurde. Erwartungsgemäß nahmen die erkrankten Tiere gegensätzlich zu einer mitgeführten gesunden Kontrollgruppe fast 30% vom Anfangskörpergewicht ab und zeigten auch in den histologischen Analysen des Darmes eine hohe entzündliche Aktivität, die in einem histologischen Score wiedergegeben wurde. Des Weiteren konnte durchflusszytometrisch eine gegenüber der nativen Kontrollgruppe deutlich erhöhte Anzahl an NK-Zellen in Milz und mesenterialen Lymphknoten der Tiere gefunden werden. Folglich lässt sich sagen, dass es bei WT-Mäusen im Falle einer akuten Kolitis zu verstärkter Migration von im Blut zirkulierenden oder im Knochenmark residierenden NK-Zellen sowohl in die Milz als auch in die mesenterialen Lymphknoten kommt. Wir gingen davon aus, dass diese verstärkte Rekrutierung von NK-Zellen im Sinne einer Gegenregulation zur induzierten Kolitis zu verstehen ist, doch könnte es sich auch um eine die Kolitis unterstützende NK-Zell Untergruppe handeln.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass aufgrund von belegter unterschiedlicher Verteilung der NK-Zellen im Organismus von Mäusen und Menschen nicht automatisch angenommen werden darf, dass es auch beim Menschen mit entzündlichen Darmerkrankungen zu verstärkter Rekrutierung der NK-Zellen in Milz und Lymphknoten kommt: Während bei gesunden Mäusen sich der größte Anteil an NK-Zellen sich in der Milz befindet, sind menschliche NK-Zellen auch häufig in nicht-lymphatischen Organen zu finden [101, 156]. Auch das Verhältnis von im Blut zirkulierenden NK-Zellen zu Zellen im Lymphknoten ist unterschiedlich. Es beträgt im menschlichen Organismus 10:1, bei Mäusen hingegen

Diskussion

nur 1:1, wohlmöglich bedingt durch die Expression von CCR7 speziell auf einer Untergruppe menschlicher NK-Zellen.[157]

Um der Frage, was für eine Funktion die splenale und nodulären NK-Zellen in diesem Experiment einnahmen weiter nachzugehen, hätte man die Zellen auf weitere Oberflächenmoleküle sowie vor allem auf deren Zytokinexpressionsprofil untersuchen können.

5.4.2 Akute DSS-induzierte WT/ Rag1^{-/-}/ Rag2 γ C^{-/-}-Kolitis

In einem weiteren Versuch, der den eigentlichen Kern dieser Arbeit darstellt, wurde nach gleichem Schema wie im obigen Versuch mittels DSS eine akute Kolitis induziert. Neben den WT-Mäusen wurden hier zudem B- und T-Zell defiziente Rag1^{-/-} - sowie B-, T- und NK-Zell defiziente Rag2 γ C^{-/-}-Tiere verwendet. Wie auch in den anderen Versuchen wurde zu jeder Versuchsgruppe jeweils eine negative Kontrollgruppe mitgeführt. Erstaunlicherweise nahm die Kolitis den schwersten Verlauf bei der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere gefolgt von den mit DSS behandelten WT-Mäusen. Die Tiere der erstgenannten Gruppe verzeichneten den stärksten Gewichtsverlust und fielen außerdem durch eine ausgeprägte klinische Symptomatik wie blutige Diarrhöe, struppiges Fell und Bewegungsarmut auf. Korrelierend dazu zeigte die histologische Analyse der drei Maustypen von proximalem und distalen Kolon bei den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren am stärksten ausgeprägte Entzündungszeichen mit massivem Gewebeschaden, transmuralen entzündlichen Infiltrationen sowie flächenhaftem Becherzellverlust. Auch die erkrankten WT-Tiere zeigten, wenn auch etwas abgeschwächt, verglichen mit den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren, sowohl klinisch als auch histologisch noch eine ausgeprägte Entzündung. Bei der Gruppe der Rag1^{-/-}-Tiere waren genannte Aspekte deutlich weniger ausgeprägt. Wir stellten so die Hypothese auf, dass sich NK-Zellen in Abwesenheit von Lymphozyten protektiv auf die Darmschleimhaut auswirken.

In einer Studie von Kim et al., welche die Rolle von Lymphozyten in DSS-induzierten Kolitiden untersuchen sollte, konnte festgestellt werden, dass bei der Verabreichung von niedrig dosierten DSS-Lösungen (1,5%) über 15 Tage Rag1^{-/-}-Mäuse gegenüber WT-Mäusen ähnlich unserem Ergebnis eine signifikant verzögerte und abgeschwächte Form der Kolitis aufwiesen.[158]

Während jedoch diese Studie besagt, dass bei Verabreichung von 5% DSS über 15 Tage keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ausgemacht wurden, konnten wir in unserer Arbeit, vermutlich bedingt durch eine kürzere

Diskussion

Verabreichungsdauer, sowohl klinisch als auch histologisch eine deutlich abgeschwächte intestinale Entzündung bei den Rag1^{-/-}-Tieren feststellen, was wiederum auf Lymphozyten als kolitisaggravierenden Faktor hindeutete. Neben PAS- und HE-Färbungen wurde zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens des Darmepithels eine immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Wir erwarteten ein stark proliferatives Verhalten bei der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere, die die stärksten entzündlichen Veränderungen zeigten. Evident aus dem Ki-67-Index im Ergebnisteil konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Da Ki-67 nicht nur Zellen in der S-Phase des Zellzyklus anfärbt, sondern auch in der Mitose sowie der G1- und G2-Phase, könnte eine Fehlerquelle liegen. Alternativ könnte zur spezifischen Darstellung von proliferierenden Zellen an dieser Stelle eine Färbung mit BrdU, einem Thymidinanalogon durchgeführt werden.

Neben klinischer und histologischer Analysen untersuchten wir durchflusszytometrisch in den verschiedenen Versuchsgruppen die einzelnen Zellpopulationen der LPMC unter entzündlicher und nativer Situation. In dieser Untersuchung erschien auffallend, dass bei den erkrankten Rag2 γ C^{-/-}-Tieren deutlich mehr Makrophagen und dendritische Zellen in der Lamina propria detektiert wurden als in den beiden anderen Versuchsgruppen. Dies kann aufgrund des Fehlens von B-, T- und NK-Zellen kompensatorisch bedingt sein bzw. auf den Ablauf einer „innate colitis“ hinweisen. An dieser Stelle hätte man die LPMC von WT- und Rag1^{-/-}-Tieren auch durchflusszytometrisch auf NK-Zellen untersuchen können um weitere Informationen bezüglich deren Vorkommen in den unterschiedlichen Maustypen in entzündlicher Situation herauszufinden.

Um mehr über die die Entzündung steuernden Mediatoren zu erfahren, bestimmten wir mittels verschiedener Techniken die Zytokinexpression in den verschiedenen Versuchsgruppen unter nativer und entzündlicher Situation. Passend zu den bisher gewonnenen Erkenntnissen konnte bei der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere verglichen mit den beiden anderen mit DSS behandelten Gruppen sowohl mittels ELISA nach ex-vivo-Kolon-Kultur als auch per FACS-Analyse eine besonders hohe Expression des proinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-6 ausgemacht werden. Auch diese Tatsache spricht für den Ablauf einer durch das angeborene Immunsystem getriggerten intestinalen Entzündung bei dieser Versuchsgruppe.

Neben IL-6 führten wir eine quantitative Bestimmung des entzündungsprotektiv wirkenden IL-22 durch. IL-22 wird vor allem von T- und NK-Zellen produziert[120,

Diskussion

121]. Das Zytokin vermittelt vor allem eine Interaktion zwischen Leukozyten und Gewebsepithelien und wirkt so beispielsweise durch Förderung der Integrität der intestinalen Barriere und des epithelialen angeborenen Immunsystems protektiv auf CED.[159] Da die IL-22 produzierenden Leukozyten bei Mäusen und Menschen sehr ähnlich sind, lassen sich hier Rückschlüsse auf den menschlichen Organismus ziehen[159]. Der ELISA nach ex-vivo-Kolon-Kultur ergab eine deutliche Expressionsdominanz der mit DSS behandelten WT-Mäuse gegenüber den beiden anderen Versuchsgruppen $Rag1^{-/-}$ und $Rag2\gamma C^{-/-}$. An dieser Stelle ist kritisch anzumerken, dass die Methode der ex-vivo-Kolon-Kultur etwas fehleranfällig und ein wenig ungenau ist, da keine genau identischen Darmabschnitte der drei Versuchsgruppen verwendet wurden und diese auch längenmäßig leicht variierten. Allerdings können unerwartete Messergebnisse durchaus auch immunologisch bedingt sein.

Wir untersuchten außerdem aus Milz und Lymphknoten isolierte Nkp46 positive Zellen, also NK-Zellen auf deren IL-22 Expressionsverhalten: grundsätzlich war eine erhöhte IL-22 Expression in entzündlicher Situation gegenüber der nativen Situation zu verzeichnen, was der protektiven Funktion des Zytokins in entzündlichen Situationen entspricht. Bei CED ist IL-22 bekannterweise hochreguliert [159]. Die Gruppe der $Rag1^{-/-}$ -Tiere produzierte bei diesem Versuch mehr IL-22 als die WT-Gruppe, was sich auch gut vereinbaren ließ mit dem klinischen und histologischen Bild. Aufgrund der Defizienz an B- und T-Zellen dieses Mausstammes gingen wir davon aus, dass IL-22 der $Rag1^{-/-}$ -Tiere von NK-Zellen produziert wurde oder zumindest von NK-Zell ähnlichen Zellen. Diese Vermutung wird unterstützt von der Tatsache, dass v.a. im Darmtrakt bzw. mukosalen Immunsystem Nkp46-positive Zellen die „Hauptproduzenten“ von IL-22 darstellen [148].

Aufgrund von Materialmangel konnten wir leider keinen derartigen Vergleich bei den mesenterialen Lymphknoten durchführen, hier ließ sich lediglich feststellen, dass NK-Zellen der erkrankten Tiere deutlich mehr IL-22 produzieren als die der gesunden Tiere. Da $Rag2\gamma C^{-/-}$ -Mäuse per se keine NK-Zellen besitzen, haben wir an dieser Stelle darauf verzichtet diese Gruppe in den Versuch mit ein zu beziehen.

Ergänzend zu den beiden anderen Botenstoffen IL-6 und IL-22 untersuchten wir bei allen Versuchsgruppen die Zellen der LPMC auch noch durchflusszytometrisch auf die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-23. IL-23 wird von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert, hier vor allem von Makrophagen und

dendritischen Zellen. Bei CED ist IL-23 dafür bekannt, dass es NK-Zell aktivierend wirkt.[160]Wir konnten in der Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere eine starke Produktion des genannten Zytokins feststellen. Aufgrund dessen, dass IL-23 gerne in Zusammenhang mit einer durch das angeborene Immunsystem getriggerten Entzündung, einer sogenannten innate Kolitis gebracht wird [126], und besagtem Zytokinexpressionsprofil, könnte eine derartige Entzündungsreaktion bei den Rag2 γ C^{-/-} Tieren unter DSS-Einfluss abgelaufen sein. Generell lassen sich erhöhte IL-23 Spiegel bei CED, vor allem beim MC finden.[160]

5.4.3 Chronische DSS-induzierte WT/ Rag1^{-/-}/ Rag2 γ C^{-/-}-Kolitis

Abschließend führten wir mit den gleichen Maustypen eine chronische DSS-induzierte Kolitis durch, um einen ersten Vergleich bezüglich klinischer und histologischer Parameter zwischen den zwei entzündlichen Verlaufsformen ziehen zu können. Gegensätzlich zum Gewichtsverlauf bei der akuten Kolitis nahmen hier durchschnittlich alle Tiere an Gewicht zu. Histologisch waren die charakteristischen Entzündungszeichen bei der chronischen Kolitis deutlich geringer ausgeprägt als bei der akuten Darmentzündung. Wie auch bei der akuten Verlaufsform ließ sich auch hier feststellen, wenn auch weniger ausgeprägt, dass die Rag2 γ C^{-/-}-Tiere gefolgt von der Gruppe der WT-Mäuse histologisch die stärkste entzündliche Aktivität aufwiesen.

Es gilt an dieser Stelle auch zu sagen, dass Versuche mit Knockout-Mäusen, bei welchen also bestimmte Genregionen ausgeschaltet wurden uns zwar den Weg eröffnen zu einem besseren Verständnis zellulärer und molekularer Mechanismen der intestinalen Homöostase, doch widerspiegeln sie nicht das Krankheitsgeschehen beim Menschen. Normalerweise weisen diese nämlich nicht derartige Mutationen auf. Es handelt sich vielmehr um komplexere und nuanciertere Defekte von angeborenem und adaptivem Immunsystem sowie hinzukommend weiteren Faktoren, die schließlich zu CED führen können.[84]

6 Konklusion

Die Pathophysiologie des Formenkreises der entzündlichen Darmerkrankungen ist nach wie vor nur bruchstückhaft verstanden. Bekanntermaßen handelt es sich um ein multifaktorielles Entstehungsgeschehen, bei welchem genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren eine tragende Rolle zukommt.

Wir beschäftigten uns in dieser Arbeit auf basisimmunologischer Ebene mit der Frage, was für eine Rolle die Natürliche Killerzelle in CED spielt. Um dem nachzugehen führten wir sowohl eine akute als auch eine chronische DSS-induzierte Kolitis durch. Neben den C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verwendeten wir die B- und T-Zell defizienten Rag1^{-/-}-Mäuse sowie die B-, T-, und NK-Zell defizienten Rag2 γ C^{-/-}-Tiere. In einem Vorversuch, einer DSS-induzierten WT-Kolitis konnten wir zunächst feststellen, dass es in entzündlicher Situation zu einer verstärkten Rekrutierung zirkulatorischer NK-Zellen in Milz und Lymphknoten kommt. Um was für eine Untergruppe es sich hierbei handelte und wie deren Funktion aussah haben wir an dieser Stelle nicht genauer eruiert. Bei der akuten DSS-induzierten Kolitis mit allen drei genannten Maustypen, zeigte die Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere sowohl klinisch als auch histologisch die stärksten entzündlichen Veränderungen gefolgt von der Gruppe der WT-Mäuse, während die Rag1^{-/-}-Mäuse die abgeschwächteste Form einer Inflammation zeigten. In einer durchflusszytometrischen Analyse der Zellen der Lamina propria konnten bei den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren mehr Makrophagen und dendritische Zellen als bei den beiden anderen Versuchsgruppen in entzündlicher Situation nachgewiesen werden. Korrelierend zu klinischem und histologischem Bild exprimierten die immunologischen Zellen der Lamina propria der mit DSS behandelten Gruppe der Rag2 γ C^{-/-}-Mäuse zudem stärker den proinflammatorischen Botenstoff IL-6 als die beiden anderen Maustypen. Bei den drei mitgeführten negativen Kontrollgruppen war erwartungsgemäß keine IL-6 Expression zu verzeichnen. Neben IL-6 konnten wir auch eine verstärkte Expression des Zytokins IL-23 durch die LPMC-Zellen der Rag2 γ C^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen verzeichnen. Mittels einer PCR-Reaktion nach Isolation von Nkp46-positiven Zellen aus Milz und Lymphknoten konnte zudem gezeigt werden, dass die Produktion des darmprotektiv wirkenden Zytokins IL-22 bei den DSS-behandelten Rag1^{-/-}-Tieren höher ist als bei der WT-Gruppe, während die Rag2 γ C^{-/-}-

Konklusion

Mäuse aufgrund fehlender NK-Zellen hier nicht miteinbezogen wurden. IL-22 wurde hier vermutlich durch die NK-Zellen sezerniert, das Zytokinexpressionsprofil der Rag1^{-/-}-Tiere ist gut vereinbar mit deren niedriger Entzündungsaktivität. Sowohl die FACS-Analyse bezüglich der Zellpopulationen wie auch das Zytokinexpressionsprofil deuten bei den Rag2 γ C^{-/-}-Tieren auf eine durch das angeborene Immunsystem initiierte Kolitis hin. Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass NK-Zellen in Abwesenheit von B- und T-Zellen eine protektive Funktion auf das Darmepithel ausüben, während sich bei Abwesenheit von B-, T-, und NK-Zellen unter DSS-Induktion intestinal eine stark entzündliche Reaktion abspielt. In zukünftigen Forschungsarbeiten wäre es sinnvoll, die an intestinalen Entzündungen beteiligten NK-Zellen phänotypisch genauer zu charakterisieren, sodass man gewissen Untergruppen genaue Funktionen zuordnen kann. In ferner Zukunft könnte so beispielsweise die darmprotektive NK-Zellen therapeutisch genutzt werden bzw. einen therapeutischen Angriffspunkt für eine supportive Therapie darstellen.

7 Summary

The understanding of the pathophysiology of IBD (inflammatory bowel disease) is still not fully understood. It is known that the pathogenesis of IBD including ulcerative colitis and Morbus Crohn is a multifactorial process with genetic, immunologic and environmental factors.

The aim of this work is to analyze the role of NK cells in IBD on a basic immunological level. Therefore we induced acute and chronic DSS colitis in mice. Apart from C57BL/6 wildtype mice as controls we used the B- and T- cell deficient Rag1^{-/-} mice and the B- T- and NK- cell deficient Rag2 γ C^{-/-}-mice. In a preliminary experiment we induced acute DSS colitis in wildtype mice. We could state that there is a major recruitment of circulatory NK-cells to the spleen and to the mesenteric lymph nodes in inflammatory situations. At this point we did not determine specific NK- subpopulations and their physiological function. In the main experiment we induced acute DSS colitis in WT mice, Rag1^{-/-} and Rag2 γ C^{-/-}, the Rag2 γ C^{-/-}-mice presented both clinically and histologically the strongest inflammatory changes. The Rag1^{-/-} mice showed the mildest form of inflammation whereas the wildtype mice were settled inbetween the two other groups. In a flow cytometric analysis of the lamina propria, more dendritic cells and macrophages could be found in Rag2 γ C^{-/-}-mice compared to wildtype- and Rag1^{-/-} mice in inflammatory situation. Correlating to the clinical and histological picture the immunological lamina propria cells of the Rag2 γ C^{-/-}-mice produced more proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-23 than the other experimental groups. As expected there was no IL-6 expression in untreated controls. Furthermore we isolated Nkp46⁺ cells from spleen and mesenteric lymph nodes in Rag1^{-/-} and wildtype mice. There is a higher expression of the mucosa-protective IL-22 in Rag1^{-/-}-mice than in the C57BL/6-group as shown by RT-PCR. This result agrees very well with the low inflammatory activity shown in the colitis experiments with Rag1^{-/-}-mice. Since there are per definition no NK-cells in Rag2 γ C^{-/-}-mice we excluded that group from this part of the experiment.

The FACS analysis regarding the different cell populations as well as the profile of the cytokine expression in Rag2 γ C^{-/-}-mice suggest that there is an innate colitis going on.

In summary we could state that in DSS-induced colitis NK cells execute a protective function on intestinal mucosa when only B- and T-cells are absent. However there

Summary

can be observed a severe inflammatory process in absence of B- T- and NK-cells. In future experimental works, NK- cell phenotypes, which are involved in intestinal inflammation should be characterized more specifically in order to assign different functions to the different subtypes of NK- cells. For instance in future mucosa protective NK- cells could be used therapeutically or could form a target for a new supportive therapy.

8 Abkürzungsverzeichnis

CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CT	Cycle Threshold
CU	Colitis ulzerosa
DAB	Diaminobenzidin
DSS	Dextran Sodium Sulfat
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
GIT	Gastrointestinaltrakt
HBS	Hank's buffered saline
HE	Hämatoxylin/Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
IH	Immunhistochemie
MACS	magnetic activated cell sorting
MC	Morbus Crohn
MHC	Major Histocompatibility Complex
NOD	nucleotide binding oligomerization domain
OD	Odd's ratio
PAS	Periodic acid-Schiff
PBS	phosphate buffer solution
Rag	recombination activating gene
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline
TLR	toll-like-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

1: Befallsmuster CU 2: Befallsmuster MC	2
3: Molekulare Struktur von DSS	12
4: Blutausstrich mit NK-Zelle	14
5: Erkennung einer Zielzelle durch die NK-Zelle.....	16
6: Modell der akuten DSS-Kolitis	25
7: Modell der chronischen DSS-Kolitis.....	25
8: Magnetische Zellsortierung.....	33
9: Prinzip der Durchflusszytometrie	35
10: Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	38
11: Phasentrennung	41
12: Körpergewichtskurve von WT-Mäusen mit akuter DSS Kolitis	49
13: Histologische Merkmale von WT-Mäusen mit akuter DSS Kolitis.....	51
14: Histologischer Score von WT-Mäusen mit akuter DSS Kolitis	52
15: FACS-Analyse auf die Oberflächenmarker CD 27 und Nkp46	55
16: Körpergewichtskurve von Mäusen mit akuter DSS Kolitis	56
17: Histologische Merkmale von Mäusen mit akuter DSS Kolitis.....	59
18: Histologischer Score von Mäusen mit akuter DSS Kolitis.....	60
19: Immunhistochemische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67.....	63
20: Anteil der Monozyten und Granulozyten in Zellen der LPMC	65
21: Anteil der Makrophagen in Zellen der LPMC.....	66
22: Anteil der dendritischen Zellen in Zellen der LPMC.....	67
23: Darstellung der Expression von IL-6 nach Ex-vivo-Colon-Culture	69
24: Charakterisierung der unterschiedlichen Zellpopulationen (A-C) der LPMC's, die IL-6 produzieren	70
25: Darstellung der Expression von IL-22 nach Ex-vivo-Kolon-Kultur	72
26: Expression von IL-22 in Nkp46 positiven Zellen	73
27: Expression von IL-23 in Lymphozyten der LPMC.....	74
28: Charakterisierung der unterschiedlichen Zellpopulationen (A-C) der LPMC's, die IL-23 produzieren	75
29: Körpergewichtskurve von Mäusen mit chronischer DSS Kolitis.....	76
30: Histologische Merkmale von Mäusen mit chronischer DSS Kolitis.....	79
31: Histologischer Score von Mäusen mit chronischer DSS Kolitis	80

10 Literaturverzeichnis

1. Herold und Mitarbeiter, Innere Medizin(2012)
2. Podolsky, D.K., *The current future understanding of inflammatory bowel disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(6): p. 933-43.
3. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, *The fundamental basis of inflammatory bowel disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 514-21.
4. Baumgart, D.C. and W.J. Sandborn, *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1641-57.
5. <http://www.kompetenznetz-ced.de>
6. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
7. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. Gut, 1996. **39**(5): p. 690-7.
8. Russel, M.G. and R.W. Stockbrugger, *[Epidemiological developments and insights in chronic inflammatory bowel diseases]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2001. **145**(30): p. 1448-52.
9. Matsumoto, T. and M. Fujishima, *[Epidemiologic aspects of ulcerative colitis in Japan--comparison with other countries]*. Nihon Rinsho, 1999. **57**(11): p. 2443-8.
10. Yang, S.K., et al., *Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong District, Seoul, Korea, 1986-1997*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(9): p. 1037-42.
11. Sood, A., et al., *Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India*. Gut, 2003. **52**(11): p. 1587-90.
12. Karlinger, K., et al., *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Eur J Radiol, 2000. **35**(3): p. 154-67.
13. Farrokhyar, F., E.T. Swarbrick, and E.J. Irvine, *A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(1): p. 2-15.
14. Sartor, R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(7): p. 390-407.
15. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
16. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
17. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
18. Goyette, P., et al., *Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine*. Ann Med, 2007. **39**(3): p. 177-99.
19. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.

20. Libioulle, C., et al., *Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4*. PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e58.
21. Peltekova, V.D., et al., *Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 471-5.
22. Rioux, J.D., et al., *Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 223-8.
23. Rioux, J.D., et al., *Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis*. Nat Genet, 2007. **39**(5): p. 596-604.
24. Silverberg, M.S., et al., *Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(3): p. 328-35.
25. Yamazaki, K., et al., *Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(22): p. 3499-506.
26. Orholm, M., et al., *Familial occurrence of inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(2): p. 84-8.
27. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-6.
28. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
29. Evans, J.M., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease*. Gut, 1997. **40**(5): p. 619-22.
30. Andersson, R.E., et al., *Appendectomy and protection against ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 808-14.
31. Lindberg, E., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study*. Gut, 1988. **29**(3): p. 352-7.
32. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
33. Coombes, J.L. and K.J. Maloy, *Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells*. Semin Immunol, 2007. **19**(2): p. 116-26.
34. Zaph, C., et al., *Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 552-6.
35. Gionchetti, P., et al., *Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1202-9.
36. Sutherland, L., et al., *Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease*. Gut, 1991. **32**(9): p. 1071-5.
37. Inohara, N. and G. Nunez, *NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 371-82.
38. Strober, W., et al., *Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 9-20.
39. Kobayashi, M., et al., *Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1297-308.
40. Rakoff-Nahoum, S., L. Hao, and R. Medzhitov, *Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 319-29.

Literaturverzeichnis

41. Buhner, S., et al., *Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation?* Gut, 2006. **55**(3): p. 342-7.
42. Irvine, E.J. and J.K. Marshall, *Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk.* Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1740-4.
43. Gassler, N., et al., *Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G216-28.
44. Cario, E., et al., *Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors.* J Immunol, 2000. **164**(2): p. 966-72.
45. Hisamatsu, T., et al., *CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells.* Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 993-1000.
46. Yoshida, M., et al., *Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria.* J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2142-2151.
47. Wehkamp, J., et al., *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression.* Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
48. Wehkamp, J., et al., *Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18129-34.
49. Mashimo, H., et al., *Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor.* Science, 1996. **274**(5285): p. 262-5.
50. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
51. Fort, M.M., M.W. Leach, and D.M. Rennick, *A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis.* J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3256-61.
52. Herold 2012(Innere Medizin)
53. Carter, M.J., A.J. Lobo, and S.P. Travis, *Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults.* Gut, 2004. **53 Suppl 5**: p. V1-16.
54. Kornbluth, A. and D.B. Sachar, *Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee.* Am J Gastroenterol, 2004. **99**(7): p. 1371-85.
55. Scholmerich, J., *Review article: systemic and topical steroids in inflammatory bowel disease.* Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20 Suppl 4**: p. 66-74.
56. Marshall, J.K. and E.J. Irvine, *Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis.* Gut, 1997. **40**(6): p. 775-81.
57. Lichtenstein, G.R., et al., *American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 940-87.
58. Rutgeerts, P., et al., *Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis.* N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2462-76.
59. Sandborn, W.J. and S.B. Hanauer, *Systematic review: the pharmacokinetic profiles of oral mesalazine formulations and mesalazine pro-drugs used in the management of ulcerative colitis.* Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(1): p. 29-42.
60. Berg, D.F., et al., *Acute surgical emergencies in inflammatory bowel disease.* Am J Surg, 2002. **184**(1): p. 45-51.
61. Larson, D.W. and J.H. Pemberton, *Current concepts and controversies in surgery for IBD.* Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1611-9.

Literaturverzeichnis

62. Malchow, H., et al., *European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment*. Gastroenterology, 1984. **86**(2): p. 249-66.
63. Summers, R.W., et al., *National Cooperative Crohn's Disease Study: results of drug treatment*. Gastroenterology, 1979. **77**(4 Pt 2): p. 847-69.
64. Hanauer, S.B. and U. Stromberg, *Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(5): p. 379-88.
65. Kane, S.V., et al., *The effectiveness of budesonide therapy for Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2002. **16**(8): p. 1509-17.
66. Schoon, E.J., et al., *Bone mineral density in relation to efficacy and side effects of budesonide and prednisolone in Crohn's disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005. **3**(2): p. 113-21.
67. Travis, S.P., et al., *European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management*. Gut, 2006. **55 Suppl 1**: p. i16-35.
68. Hanauer, S.B. and W. Sandborn, *Management of Crohn's disease in adults*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(3): p. 635-43.
69. Herold 2012 (Innere Medizin)
70. Targan, S.R., et al., *A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group*. N Engl J Med, 1997. **337**(15): p. 1029-35.
71. Hanauer, S.B., et al., *Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial*. Gastroenterology, 2006. **130**(2): p. 323-33; quiz 591.
72. Pearson, D.C., et al., *Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis*. Ann Intern Med, 1995. **123**(2): p. 132-42.
73. Feagan, B.G., et al., *Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators*. N Engl J Med, 1995. **332**(5): p. 292-7.
74. Feagan, B.G., et al., *A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators*. N Engl J Med, 2000. **342**(22): p. 1627-32.
75. Akobeng, A.K. and E. Gardener, *Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of medically-induced remission in Crohn's Disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(1): p. CD003715.
76. Sandborn, W.J., et al., *Budesonide for maintenance of remission in patients with Crohn's disease in medically induced remission: a predetermined pooled analysis of four randomized, double-blind, placebo-controlled trials*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(8): p. 1780-7.
77. Hanauer, S.B., et al., *Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial*. Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1541-9.
78. Colombel, J.F., et al., *Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial*. Gastroenterology, 2007. **132**(1): p. 52-65.
79. Present, D.H., et al., *Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(18): p. 1398-405.
80. Itzkowitz, S.H. and D.H. Present, *Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(3): p. 314-21.

Literaturverzeichnis

81. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease*. Int J Colorectal Dis, 2000. **15**(3): p. 144-60.
82. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 541-6.
83. Wirtz, S. and M.F. Neurath, *Mouse models of inflammatory bowel disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(11): p. 1073-83.
84. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 260-76.
85. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
86. Dieleman, L.A., et al., *Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice*. Gastroenterology, 1994. **107**(6): p. 1643-52.
87. the Jackson Laboratory
88. Jones, J.M. and M. Gellert, *The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system*. Immunol Rev, 2004. **200**: p. 233-48.
89. the Jackson Laboratory
90. Taconic Europe
91. Abele-Ohl, S., et al., *Rag2^{-/-} gamma-chain^{-/-} mice as hosts for human vessel transplantation and allogeneic human leukocyte reconstitution*. Transpl Immunol, 2010. **23**(1-2): p. 59-64.
92. Cao, X., et al., *Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain*. Immunity, 1995. **2**(3): p. 223-38.
93. Goldman, J.P., et al., *Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain*. Br J Haematol, 1998. **103**(2): p. 335-42.
94. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
95. Taconic Europe
96. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
97. Narni-Mancinelli, E., S. Ugolini, and E. Vivier, *Tuning the threshold of natural killer cell responses*. Curr Opin Immunol, 2012.
98. Deguine, J. and P. Bousso, *Dynamics of NK cell interactions in vivo*. Immunol Rev, 2013. **251**(1): p. 154-9.
99. Vosshenrich, C.A., et al., *A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1217-24.
100. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
101. Gregoire, C., et al., *The trafficking of natural killer cells*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 169-82.
102. Hesslein, D.G. and L.L. Lanier, *Transcriptional control of natural killer cell development and function*. Adv Immunol, 2011. **109**: p. 45-85.
103. Martin-Fontecha, A., G.M. Lord, and H.J. Brady, *Transcriptional control of natural killer cell differentiation and function*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(21): p. 3495-503.
104. Elliott, J.M., J.A. Wahle, and W.M. Yokoyama, *MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment*. J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2073-9.

105. Joncker, N.T., et al., *Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment.* J Exp Med, 2010. **207**(10): p. 2065-72.
106. Burkett, P.R., et al., *Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis.* J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 825-34.
107. Di Santo, J.P., *Natural killer cells: diversity in search of a niche.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 473-5.
108. Beuneu, H., et al., *Cutting Edge: A dual role for type I IFNs during polyinosinic-polycytidylic acid-induced NK cell activation.* J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2084-8.
109. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
110. Nguyen, K.B., et al., *Coordinated and distinct roles for IFN- α beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4279-87.
111. Fernandez, N.C., et al., *Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk.* Eur Cytokine Netw, 2002. **13**(1): p. 17-27.
112. Newman, K.C. and E.M. Riley, *Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(4): p. 279-91.
113. Lucas, M., et al., *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15.* Immunity, 2007. **26**(4): p. 503-17.
114. Abdool, K., et al., *NK cells use NKG2D to recognize a mouse renal cancer (Renca), yet require intercellular adhesion molecule-1 expression on the tumor cells for optimal perforin-dependent effector function.* J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2575-83.
115. Smyth, M.J., et al., *NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer.* J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1325-35.
116. Charles A. Janeway jr. u. a. : Immunologie. 5. Auflage
117. Moretta, L. and A. Moretta, *Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors.* EMBO J, 2004. **23**(2): p. 255-9.
118. Hayakawa, Y. and M.J. Smyth, *CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity.* J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1517-24.
119. Kishimoto, T., et al., *Interleukin-6 family of cytokines and gp130.* Blood, 1995. **86**(4): p. 1243-54.
120. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld, *Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9.* J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1814-9.
121. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.* J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
122. Wolk, K., et al., *Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?* J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5397-402.
123. Ouyang, W. and P. Valdez, *IL-22 in mucosal immunity.* Mucosal Immunol, 2008. **1**(5): p. 335-8.

124. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation*. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 454-67.
125. McGeachy, M.J. and D.J. Cua, *Th17 cell differentiation: the long and winding road*. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 445-53.
126. Takatori, H., et al., *Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22*. *J Exp Med*, 2009. **206**(1): p. 35-41.
127. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
128. Bernstein, C.N., et al., *The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study*. *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(7): p. 1559-68.
129. Hanauer, S.B., et al., *Advances in the management of Crohn's disease: economic and clinical potential of infliximab*. *Clin Ther*, 1998. **20**(5): p. 1009-28.
130. Silverstein, M.D., et al., *Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(1): p. 49-57.
131. Ward, F.M., et al., *Clinical economics review: medical management of inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999. **13**(1): p. 15-25.
132. Feagan, B.G., *Maintenance therapy for inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(12 Suppl): p. S6-S17.
133. Sandborn, W.J., *Treatment of ulcerative colitis with oral mesalamine: advances in drug formulation, efficacy expectations and dose response, compliance, and chemoprevention*. *Rev Gastroenterol Disord*, 2006. **6**(2): p. 97-105.
134. Siegel, C.A. and B.E. Sands, *Review article: practical management of inflammatory bowel disease patients taking immunomodulators*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **22**(1): p. 1-16.
135. Fuss, I.J., et al., *Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(1): p. 9-15.
136. Mannon, P.J., et al., *Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(20): p. 2069-79.
137. Yen, D., et al., *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1310-6.
138. Moretta, L., et al., *Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions*. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 219-28.
139. Koopman, L.A., et al., *Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential*. *J Exp Med*, 2003. **198**(8): p. 1201-12.
140. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
141. Egawa, S. and N. Hiwatashi, *Natural killer cell activity in patients with inflammatory bowel disease*. *J Clin Lab Immunol*, 1986. **20**(4): p. 187-92.
142. Eiras, P., et al., *Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules*. *Scand J Immunol*, 2000. **52**(1): p. 1-6.
143. Leon, F., et al., *Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(2): p. 345-56.

144. Steel, A.W., et al., *Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment.* Aliment Pharmacol Ther, 2011. **33**(1): p. 115-26.
145. Shimamoto, M., et al., *Selective decrease in colonic CD56(+) T and CD161(+) T cells in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis.* World J Gastroenterol, 2007. **13**(45): p. 5995-6002.
146. Cohavy, O. and S.R. Targan, *CD56 marks an effector T cell subset in the human intestine.* J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5524-32.
147. Ng, S.C., et al., *A novel population of human CD56+ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR+) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis.* Clin Exp Immunol, 2009. **158**(2): p. 205-18.
148. Cella, M., et al., *A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity.* Nature, 2009. **457**(7230): p. 722-5.
149. Luci, C., et al., *Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin.* Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 75-82.
150. Sanos, S.L., et al., *RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells.* Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 83-91.
151. Hart, A.L., et al., *Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases.* Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 50-65.
152. Yadav, P.K., C. Chen, and Z. Liu, *Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.* J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 348530.
153. Schleinitz, N., et al., *Natural killer cells in human autoimmune diseases.* Immunology, 2010. **131**(4): p. 451-8.
154. Mahler, M., et al., *Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis.* Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 1): p. G544-51.
155. Kitajima, S., S. Takuma, and M. Morimoto, *Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium.* Exp Anim, 1999. **48**(3): p. 137-43.
156. Norris, S., et al., *Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes.* J Hepatol, 1998. **28**(1): p. 84-90.
157. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic.* J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
158. Kim, T.W., et al., *Involvement of lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis.* World J Gastroenterol, 2006. **12**(2): p. 302-5.
159. Ouyang, W., *Distinct roles of IL-22 in human psoriasis and inflammatory bowel disease.* Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(6): p. 435-41.
160. Liu, Z., et al., *The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity.* J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 597-606.