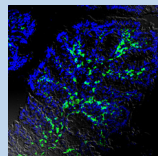
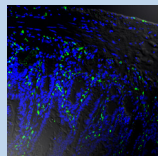
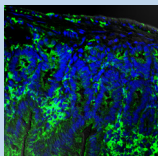
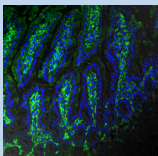
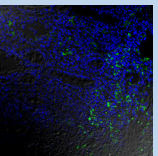
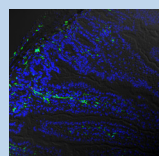
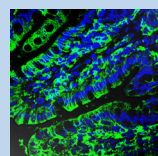


Expression des Mannoserezeptors durch  
Intestinale Epithelzellen bei chronisch  
entzündlichen Darmerkrankungen

Henrike Hacker  
Inauguraldissertation



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK



Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

Expression des Mannoserezeptors durch Intestinale Epithelzellen  
bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Henrike Hacker  
aus Rostock

Lübeck 2014

1. Berichterstatter/Berichterstatterin:	Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Büning
2. Berichterstatter/Berichterstatterin:	Priv.-Doz. Dr. med. Martin Hoffmann
Tag der mündlichen Prüfung:	8.1.2016
Zum Druck genehmigt Lübeck, den	8.1.2016
Promotionskommission der Sektion Medizin	

---

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau und Funktion der Darmwand	1
1.1.1	Aufbau der Darmwand	1
1.1.2	Anatomische Segmentierung des Darms	2
1.1.3	Epitheliale Integrität	3
1.1.4	Das Darm-assoziierte Immunsystem	4
1.2	Immunantwort des Darms	4
1.2.1	Möglichkeiten der Antigenaufnahme	5
1.2.2	Registrierung der Antigene	5
1.2.3	Haupthistokompatibilitätskomplex	5
1.2.4	Antigenprozessierung durch klassische Antigen-präsentierende Zellen	6
1.2.5	Aktivierung von B- und T-Zellen	8
1.3	Balance zwischen Homöostase und Immunabwehr	8
1.3.1	Diskrimination zwischen pathogen und apathogen	9
1.3.2	Intestinale Toleranzentwicklung	10
1.4	Pathologie des Darms – chronisch entzündliche Darmerkrankungen	11
1.4.1	Epidemiologie, Klinik und Therapie	11
1.4.2	Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	12
1.5	Besondere Funktion der Epithelzellen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	14
1.5.1	Sekretorische Funktion der Enterozyten	14
1.5.2	Intestinale Epithelzellen als Antigen-präsentierende Zellen	15
1.5.3	Antigenprozessierung und –präsentation durch Intestinale Epithelzellen	15
1.5.4	Bedeutung intestinaler Epithelzellen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	16
1.6	Der Mannoserezeptor	17
1.6.1	Zuordnung und Verteilung	17
1.6.2	Aufbau und Liganden	18
1.6.3	Bedeutung des Mannoserezeptors für die „cross presentation“	19
1.7	Fragestellungen	19

2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Versuchstiere	20
2.1.1	C57/129SvEv- und C57BL/6-Mäuse	20
2.1.2	BALB/c-Mäuse	20
2.1.3	Kolonisierte und keimfreie NMRI-Mäuse	21
2.1.4	Induktion einer Ileitis im Mausmodell - TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse	21
2.1.5	Induktion einer Colitis im Mausmodell - cDSS-C57BL/6-Mäuse	23
2.2	Bestimmung des Modified Disease Activity Index	24
2.3	Gewebebegewinnung	24
2.4	Paraffineinbettung	25
2.5	Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Mikrotom	25
2.6	Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Kryostat	25
2.7	Gewebefärbung mit Hämalaun und Erythrosin	26
2.8	Histologische Begutachtung des Gewebes	27
2.9	Immunhistochemische Färbung	27
2.10	Fluoreszenzmikroskopie	29
2.11	Konfokale Laserscanmikroskopie	30
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Mannoserezeptormarkierungen an Dün- und Dickdarmgewebe gesunder Mäuse	32
3.1.1	Antikörpertest und Konzentrationsbestimmung für den Mannoserezeptor-Antikörper	32
3.1.2	Fehlende Expression des Mannoserezeptors im Darmepithel gesunder C57/129SvEv-Mäuse	33
3.1.3	Fehlende Expression des Mannoserezeptors im Darmepithel gesunder BALB/c-Mäuse	34
3.2	MHC II- Markierungen an Dün- und Dickdarmgewebe gesunder Mäuse	35
3.2.1	Antikörpertest und Konzentrationsbestimmung für den MHC II-Antikörper	35
3.2.2	MHC II-Expression im Darmgewebe gesunder C57/129SvEv-Mäuse	36
3.2.3	MHC II- Expression im Darmgewebe gesunder BALB/c-Mäuse	37
3.3	Einfluss der Gewebekolonisierung auf die Mannoserezeptor- und MHC II-Expression	39

3.4	Mannoserezeptor und MHC II-Expression in Dün- und Dickdarmgewebe entzündeter Mäuse .....	42
3.4.1	Klinische Zeichen der Entzündung der TNFΔARE/WT-Mäuse .....	42
3.4.2	Histologische Zeichen der Entzündung im Dünndarmgewebe der TNFΔARE/WT-Mäuse.....	42
3.4.3	Mannoserezeptor und MHC II-Expression im Dünndarmgewebe der TNFΔARE/WT-Mäuse.....	43
3.4.4	Klinische und histologische Zeichen der Entzündung im Dickdarmgewebe der C57BL/6-cDSS Mäuse .....	44
3.4.5	Mannoserezeptor- und MHC II-Expression im Dickdarm der C57BL/6-cDSS-Mäuse.....	46
4	DISKUSSION .....	47
4.1	Hintergrund der Hypothesengenerierung.....	47
4.1.1	Gesteigerte Zahl CD8 <sup>+</sup> T-Zellen bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen .....	47
4.1.2	CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch Intestinale Epithelzellen .....	48
4.1.3	CD8 <sup>+</sup> T-Zell- Stimulation via „cross presentation“ .....	49
4.1.4	Potentielle „cross presentation“ durch Intestinale Epithelzellen.....	50
4.1.5	Expression costimulatorischer Moleküle durch Intestinale Epithelzellen	51
4.1.6	Konstitutive und regulierte Rezeptorexpression durch Intestinale Epithelzellen .....	52
4.2	Regulierte Mannoserezeptorexpression durch klassische Antigen-präsentierende Zellen .....	53
4.2.1	Mannoserezeptorexpression durch Makrophagen unter inflammatorischer Stimulation.....	53
4.2.2	Mannoserezeptorexpression durch dendritische Zellen unter inflammatorischer Stimulation.....	53
4.3	Fehlende Epithelmarkierung des Mannoserezeptors in Darmgewebe gesunder Mäuse .....	54
4.4	Mannoserezeptorbildung durch intestinale Zellen .....	55
4.5	Kompartimentierung des Darms.....	57
4.5.1	Verteilung der Strukturen des intestinalen Immunsystems .....	57
4.5.2	Differente Mikrobiotakolonisation.....	58

---

4.5.3	Unterschiedliche Verteilung von Rezeptoren und anderen Oberflächenmolekülen auf Epithelzellen verschiedener Darmsegmente . . . . .	58
4.6	Lokalisation des Mannoserezeptors in anderen Darmabschnitten . . . . .	59
4.6.1	Fehlende Mannoserezeptorexpression durch Epithelzellen weiterer Darmabschnitte . . . . .	59
4.7	Mannoserezeptorexpression in Abhängigkeit des genetischen Stammes . .	60
4.8	Einsatz der MHC II-Markierung . . . . .	60
4.8.1	Positive MHC II-Markierungen in allen verwendeten Präparaten . . . . .	61
4.9	Einfluss der intestinalen Mikrobiotakolonisation auf die Mannoserezeptorexpression . . . . .	62
4.9.1	Fehlende Mannoserezeptorbildung im Epithel konventionell kolonisierter Mäuse . . . . .	63
4.10	Einsatz verschiedener Entzündungsmodelle . . . . .	64
4.10.1	Entzündungsstatus im terminalen Ileum und Colon . . . . .	64
4.10.2	Einfluss der Inflammation auf die Mannoserezeptorexpression . . . . .	65
4.11	Schlussfolgerung . . . . .	66
5	AUSBLICK	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	68
7	LITERATURVERZEICHNIS	69
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
9	ANHANG	79
10	DANKSAGUNG	81
11	LEBENS LAUF	82

# 1 EINLEITUNG

Die Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten gestiegen. Somit gewinnt ihre Behandlung im klinischen Alltag zunehmend an Bedeutung. Eine vollständige Heilung ist trotz intensiver Forschungen bis heute nicht möglich. Dies ist unter anderem dadurch begründet, dass die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen bisher nur unvollständig verstanden sind.

Intestinalen Epithelzellen wird im Rahmen der Krankheitsentstehung, neben multiplen weiteren Faktoren, eine bedeutsame Rolle zugeschrieben. Sie bilden nicht nur eine Barriere, sondern besitzen auch die Fähigkeit Antigene zu präsentieren. Eine Voraussetzung dazu ist die Expression diverser Antigenrezeptoren.

Der Mannoserezeptor ist ein Oberflächenmolekül, dessen Bildung bereits für zahlreiche andere immunkompetente Zellen beschrieben wurde. Er ist einer der entscheidenden Mediatoren zur Direktionierung von Antigenen in differente Verarbeitungswege.

Eine Mannoserezeptorexpression durch intestinale Epithelzellen erscheint denkbar. Im Rahmen der immunologischen Kompetenz dieser Zellen, könnte dabei eine Relevanz des Mannoserezeptors in der Genese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen vermutet werden. Beide Hypothesen werden in dieser Arbeit thematisiert. Dazu sollen im Folgenden zunächst wichtige Grundlagen der Anatomie und Immunologie des Darms erläutert werden.

## 1.1 Aufbau und Funktion der Darmwand

### 1.1.1 Aufbau der Darmwand

Das Lumen des Darms wird durch die Schleimhaut (Tunica mukosa/Mukosa) begrenzt. Sie dient in erster Linie als Diffusionsbarriere und weist eine Dreiteilung auf.

Die oberste Zellschicht der Mukosa ist ein einschichtiges Zylinderepithel, welches von den Enterozyten gebildet wird. Sie werden als intestinale Epithelzellen (intestinal epithelial cells, IECs) bezeichnet. Ihnen sitzen Mikrovilli als kleine Fortsätze an der zum Lumen gewandten Seite (apikal) auf und bilden einen Bürstensaum.

Darunter befindet sich eine Bindegewebsschicht (Lamina propria, LP), welche Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern sowie eine Vielzahl von immunogenen Zellen enthält. Sie liegt einer dünnen Muskelschicht (Lamina muscularis mucosae) auf, die aus glatten Muskelzellen besteht und eine Eigenbeweglichkeit der Schleimhaut ermöglicht.

Im Dünndarm bildet die Mukosa zusammen mit der LP fingerförmige Fortsätze, welche Zotten

(Villi intestinales) genannt werden. Zwischen ihnen befinden sich Einsenkungen, die bis hin zur Lamina muscularis mucosae reichen. Sie heißen Krypten (Glandulae intestinales, Lieberkuhn-Krypten) und sind Ort der Zellerneuerung.

Die darunter liegende bindegewebige Submukosa (Tela submucosa) führt größere Blut- und Lymphgefäße sowie ein Nervengeflecht (Plexus submucosus, Meissner-Plexus), für die Versorgung der Mukosa.

Die Muskelschicht (Tunica muscularis) besteht aus einer inneren Ring- und einer äußeren Längsmuskelschicht glatter Muskelzellen, welche die Darmbewegung (Segmentierungs- und Pendelbewegungen) und Peristaltik ermöglichen. Zwischen diesen beiden Schichten liegt ein weiteres Nervengeflecht, der sogenannte Plexus myentericus (Auerbach-Plexus).

Die Serosa (Tunica serosa) mit der darunter liegenden Subserosa (Tela subserosa) bildet die äußere Begrenzung intraperitoneal gelegener Darmabschnitte (46). Durch anatomische Veränderungen von oral nach aboral kann der Intestinaltrakt in verschiedene Abschnitte unterteilt werden.

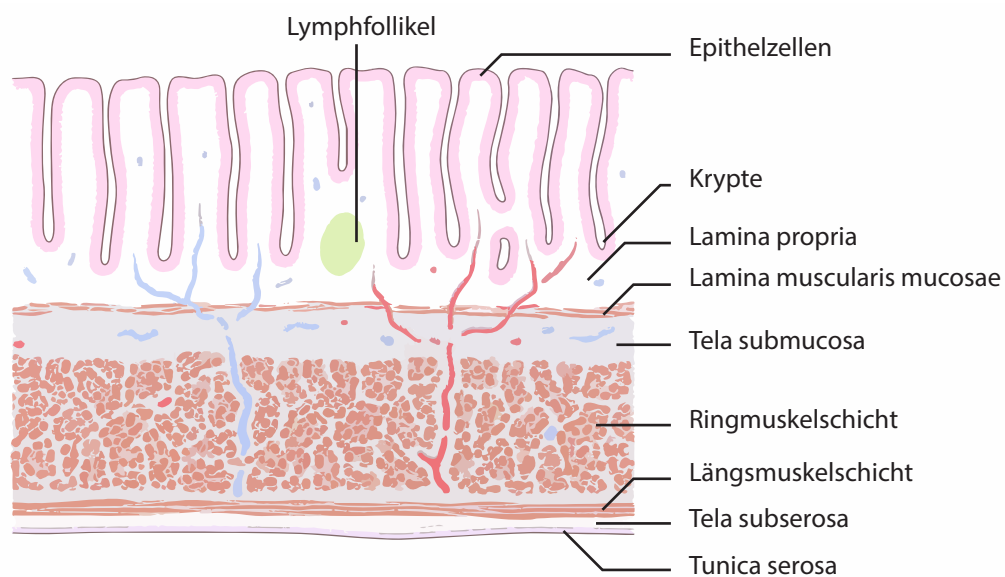


Abb. 1: schematische Darstellung der Colonwand (verändert nach Schünke (76))

### 1.1.2 Anatomische Segmentierung des Darms

Der Darm wird in die Abschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon und Rektum untergliedert. Diese Unterteilung erfolgt auf Grund regionaler Unterschiede.

Im Dünndarm (Jejunum und Ileum), dessen Aufgabe die enzymatische Aufspaltung und Resorption der Nahrungsbestandteile ist, sorgen Ringfalten, Zotten und Mikrovilli für eine extreme Oberflächenvergrößerung.

Die Ringfalten (Plicae circulares) werden von Mukosa und Submukosa gebildet, ragen bis zu

einem Zentimeter konstant ins Lumen hinein und sind halbkreisförmig. Von oral nach aboral werden die Ringfalten flacher und weniger, bis sie schließlich im terminalen Ileum nahezu gänzlich fehlen.

Der Dickdarm (Colon und Rektum) erfüllt vor allem die Aufgabe der Resorption von Wasser und Salzen sowie die der Schleimproduktion (Muzin). Zwischen den IECs der Mukosa liegen Becherzellen zur Muzinbildung. Sie finden sich bereits im Dünndarm, jedoch nimmt ihre Zahl nach aboral hin stetig zu.

Auch in der Dickdarmwand gibt es Schleimhautfalten (Plicae semilunares), diese sind allerdings nicht wie im Dünndarm konstant, sondern können bei peristaltischen Bewegungen verstreichen. Die Mukosa im Dickdarm bildet keine Zotten, sondern nur besonders tiefe und dicht aneinander stehende Krypten (46). Die anatomische Gliederung des Intestinaltrakts ist funktionell relevant. Dies zeigt sich sowohl auf makroskopischer und mikroskopischer als auch auf ultramikroskopischer Ebene. Besonders wichtig für die Darmfunktion ist dabei das Epithel der Mukosa.

### 1.1.3 Epitheliale Integrität

Das intestinale Epithel bildet eine funktionelle Barriere, deren Zusammenhalt und Permeabilität für die Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts entscheidend ist. Die stark polarisierten, absorptiven IECs bilden mit 80% die größte Zellpopulation. Der Zusammenhalt der IECs wird durch drei Hauptkontakte gewährleistet: Verschlusskontakte (Tight junctions, TJs), Adhärenzkontakte (Adherens junction, AJ) und Desmosomen.

Die TJs liegen apikal und verbinden zwei Zellen gürtelförmig miteinander (28). Dieser Verschlusskontakt dichtet den Interzellularspalt ab. Die gebildete Barriere ermöglicht die Kontrolle des Durchflusses von Wasser, Lipiden, Elektrolyten und Peptiden. Nur Moleküle, welche kleiner als 500 Dalton sind, können durch die TJs diffundieren. Dabei zeigen sie Veränderungen ihrer Durchlässigkeit entlang des Darms. Im Colon weisen TJs eine höhere Permeabilität auf als im Jejunum (55).

Die weiter vom Lumen entfernt (basolateral) gelegenen AJs verankern Nachbarzellen. Basal gelegene Desmosomen verbinden die IECs mit der LP (46, 55).

Das Epithel besitzt neben der Barrierefunktion auch immunologische Kompetenz. Im Folgenden soll jedoch zunächst auf den Aufbau des intestinalen Immunsystems eingegangen werden.

#### 1.1.4 Das Darm-assoziierte Immunsystem

Das Darm-assoziierte Immunsystem (gut-associated lymphoid tissue, GALT) enthält 50% der Lymphozytenpopulation eines Organismus und stellt damit einen beträchtlichen Anteil am gesamten Immunsystem dar (28). Zum GALT zählen mesenterische Lymphknoten (mLK), Peyer-Plaques (PPs), isolierte Lymphfollikel sowie in der Mukosa diffus verteilte Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen. Auch die Verteilung der lymphatischen Strukturen weist segmentale Differenzen auf (s. Kapitel 4.4.1).

Peyer-Plaques sind makroskopisch sichtbare Ansammlungen von Lymphfollikeln aus B-Lymphozyten mit dazwischen liegenden T-Zellregionen. Sie reichen von der LP bis in die Submukosa des Dünndarms, gehören zu den sekundären lymphatischen Organen und sind u.a. wichtig für die Toleranzinduktion (s. Kapitel 1.3.1) (68). Direkt über den Lymphfollikeln finden sich zahlreiche dendritische Zellen (DCs), Makrophagen, T- und B-Zellen in der sogenannten Domregion. Darüber ist das follikelassoziierte Epithel lokalisiert, welches spezifisch neben IECs auch microfold-Zellen (M-Zellen) enthält (58).

M-Zellen sind spezialisierte IECs, welche partikuläre, höhermolekulare Antigene in großer Menge transzytieren und an Antigen-präsentierende Zellen (APZ) der PPs weitergeben (56, 63). Nachdem ein Antigen die epitheliale Barriere überwunden hat, kann eine Immunantwort generiert werden.

#### 1.2 Immunantwort des Darms

Das Immunsystem lässt sich in einen angeborenen und einen erworbenen Teil untergliedern. Zellen des angeborenen (innaten) Immunsystems (DCs, Makrophagen und Monozyten) übernehmen die erste unspezifische Abwehr gegen Krankheitserreger. Zusätzlich aktivieren sie Zellen des erworbenen (adaptiven) Immunsystems (B- und T-Lymphozyten) zur Generierung einer spezifischen Abwehrreaktion. Diese beinhaltet die Bildung von Antigen-neutralisierenden Immunglobulinen (Antikörpern) und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Kommunikation der Zellen angeborener und erworbener Abwehr erfolgt entweder über direkte Interaktion oder indirekt via Zytokin- und Chemokinsekretion (45). Der erste Schritt zur Initiation einer Immunantwort ist die Aufnahme des Antigens.

### 1.2.1 Möglichkeiten der Antigenaufnahme

Ein Antigen ist eine Struktur, welche das Immunsystem als fremd erkennt und daraufhin eine Abwehrreaktion generiert. Der menschliche Darm ist einer enormen Vielzahl solcher Antigene ausgesetzt. Sie stammen entweder aus der Nahrung oder sind z.B. bakteriellen Ursprungs. Sowohl Proteine, Saccharide als auch Lipide besitzen dabei ein antigenes Potential (45). Sie passieren die mukosale Barriere transzellulär oder parazellulär.

Kleine, lösliche Nahrungsantigene diffundieren über Poren in den TJs (parazellulärer Weg). Größere Komplexe werden entweder unverändert oder verändert und gebunden durch das Epithel geschleust (transzellulärer Weg). Ihre Internalisierung erfolgt via Pinozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose. M-Zellen und IECs nehmen rezeptorvermittelt vor allem bakterielle Antigene auf (68). Eine weitere Möglichkeit der Barriereüberwindung ist die direkte Aufnahme durch Zellen der angeborenen Immunität.

Makrophagen (CX3CR1<sup>+</sup>) sowie CD103<sup>+</sup> ( $\alpha$ E Integrin) DCs sind in der Lage, eine Art Antenne direkt durch das Epithel zu führen, um das Darmlumen kontinuierlich nach Antigenen abzusuchen. Die Integrität der Epithelbarriere wird dabei nicht verletzt (55, 68). Nach der Überwindung der Epithelbarriere können die Antigene durch weitere Zellen registriert werden.

### 1.2.2 Registrierung der Antigene

Nach der Epithelpassage werden die Antigene zunächst durch APZ der angeborenen Immunität registriert und via Phagozytose, Pinozytose (fluidphase) oder rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen. Dazu exprimieren sie diverse Rezeptoren zur Antigenerkennung (79). Nach der Antigeninternalisierung wandern die APZ in Lymphfollikel und mLK.

Aufgenommene Proteinantigene werden in der Zelle durch Proteolyse zu Peptiden zerlegt und an Peptidrezeptoren (MHC-Moleküle) gebunden (s. Kapitel 1.2.4). Diesen Verarbeitungsvorgang nennt man Prozessierung. Er ermöglicht die anschließende Darbietung der Antigene für Zellen der erworbenen Immunität (45).

### 1.2.3 Haupthistokompatibilitätskomplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC), auch Humanes Leukozyten Antigen (HLA) genannt, beschreibt einen für Membranproteine codierenden, polymorphen Genkomplex auf Chromosom 6. Diese Membranproteine bilden die Grundlage für die Unterscheidung der T-Zellen zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen.

Es werden zwei Klassen des MHC-Komplexes unterschieden (MHC I und MHC II). Während

MHCI-Proteine von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, findet man MHCII-Moleküle auf klassischen APZ (DCs, Makrophagen und B-Lymphozyten) und nicht klassischen APZ wie IECs.

MHCI dient der Präsentation endogener Antigene, wie beispielsweise Antigene virusinfizierter Zellen. Exogene Antigene werden über die Kopplung an MHC II-Moleküle präsentiert.

Die über MHC-Moleküle präsentierten Antigene bestehen aus 9-30 Aminosäuren und können vom T-Zell-Rezeptor (TCR) registriert werden. MHC I-gebundene Antigene werden hierbei CD8<sup>+</sup>T-Zellen dargeboten, während MHCII-komplexierte Antigene CD4<sup>+</sup>T-Zellen präsentiert werden.

Die Bindung von Kohlehydrat- und Lipidantigenen erfolgt hingegen an CD1-Moleküle. Diese werden ebenfalls von APZ exprimiert und von T-Zellen erkannt (45).

Die Antigenbeladung von MHC I- und II-Molekülen erfolgt auf unterschiedlichen Prozessierungswegen.

#### 1.2.4 Antigenprozessierung durch klassische Antigen-präsentierende Zellen

Klassische APZ internalisieren exogene Antigene via Phagozytose oder Endozytose. Nach ihrer Aufnahme in die Zelle werden die Antigene in Endosomen transferiert (45). Endosomen bilden eine heterogene Population von Zellkompartimenten, die in ihrer Gesamtheit auch „MHC II-enriched compartments“ (MIICs) genannt werden. Auf Grund ultrastruktureller Merkmale wird zwischen elektronendichten (electron-dense body, EDB), multilamellären (multilamellar body, MLB) und multivesikulären (multivesicular body, MVB) Körperchen differenziert. Sie unterscheiden sich durch ihren Säuregehalt und ihre Expression von MHC-Molekülen, proteolytischen Enzymen sowie spezifischen Markern wie beispielsweise das Lysosomen-assoziierte Membranprotein (LAMP). EDB und MLB zählen zu den reifen Lysosomen, während MVB den späten Endosomen zugeordnet werden (24, 84).

Nach seinem Transfer in ein Endosom kann das Antigen anschließend auf unterschiedlichen Wegen verarbeitet werden.

Im endozytotischen Transportweg werden exogene Antigene in Lysosomen durch die enthaltenen Proteasen zu Peptiden fragmentiert. Nach der Fusion mit Vesikeln mit membranständig gebundenen MHC II-Molekülen werden MHC II-Peptid-Komplexe gebildet. Diese gelangen über Intermediärvesikel oder direkte Fusion der MIICs mit der Zellmembran an die Oberfläche (37, 48). Ein alternativer Weg der Direktionierung MHC II-gebundener Peptide zur Zelloberfläche ist die exozytotische Freisetzung aus MIICs über kleine Vesikel, welche Exosomen genannt werden (21, 22).

Endogene Antigene werden im Gegensatz zu exogenen Antigenen im Cytosol mit Hilfe des Proteasoms degradiert. Überspezialisierte Transporter (Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation, TAP) gelangen sie in das endoplasmatische Retikulum wo sie an MHC I-Moleküle gebunden werden. Über Vesikel des Golgi-Apparates folgt der Transfer der MHC I-Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche (s. Abb. 2).

Obwohl lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass MHC I-Moleküle ausschließlich der Präsentation endogener Antigene dienen, konnte gezeigt werden, dass auch eine MHC I-gebundene Darbietung exogener Antigenen möglich ist („cross presentation“). Diese führt zu einer Stimulation  $CD8^+$  zytotoxischer T-Zellen (19).

Es werden wiederum zwei Prozessierungswege unterschieden, in denen exogene Antigene MHC I-gekoppelt werden.

Endozytierte Antigene werden, wie bei dem klassischen endozytotischen Transportweg, nach ihrer proteolytischen Degradation zu Peptiden in MHC I an MHC I gekoppelt. Aufgenommene Antigene können aber auch zuerst in frühe Endosomen (early endosomes, EEs) verpackt und von dort ins Zytosol entlassen werden, wo sie wie endogene Antigene durch das Proteasom zu Peptidengespalten werden. Der Rücktransport der Antigenpeptide mittels des TAP-Transporters in EEs ermöglicht die räumliche Trennung zur endogenen Antigenprozessierung. In den EEs werden sie an MHC I gebunden und von dort zur Zelloberfläche transferiert (19, 14). Die Direktionierung zur Oberfläche ermöglicht die Antigenpräsentation für B- und T-Zellen.

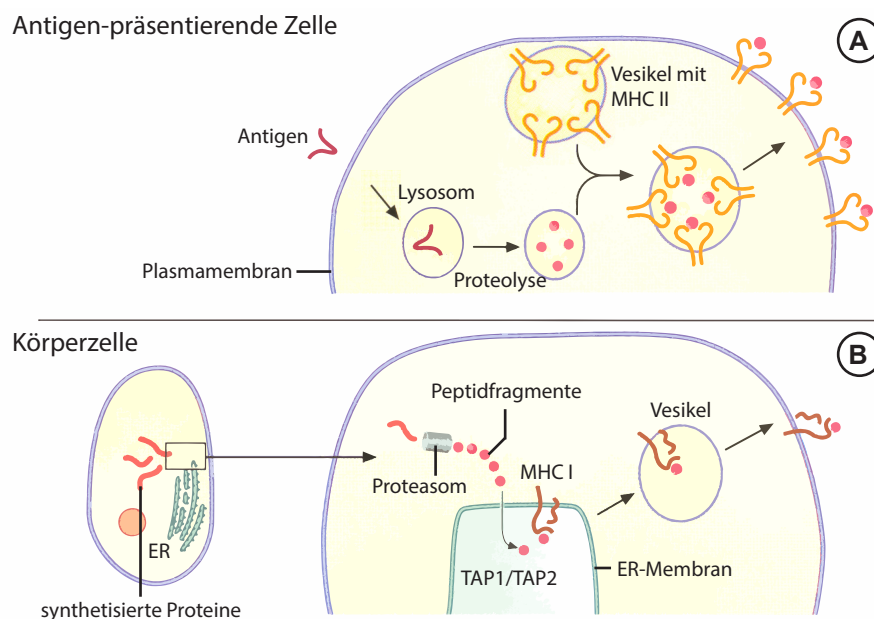


Abb.2: vereinfachte Darstellung der Antigenprozessierung (verändert nach Löffler (45))

A Prozessierung und MHC II-gebundene Darbietung exogener Antigene (klassischer endozytotischer Transportweg)  
 B Prozessierung und MHC I-gebundene Darbietung endogener Antigene

### 1.2.5 Aktivierung von B- und T-Zellen

Eine Antigenregistrierung durch naive T- und B-Zellen in PPs, Lymphfollikeln und mLK initiiert ihre Aktivierung zur klonalen Expansion und Differenzierung.

B-Zellendifferenzierung zu antigenspezifischen Plasmazellen. Diese produzieren Immunglobuline, welche ihr spezifisches Antigen aufspüren, binden und somit unschädlich machen.

T-Zellen lassen sich in unterschiedliche effektorische CD4<sup>+</sup> (Th1-, Th2- und Th17-Zellen) und CD8<sup>+</sup> Subtypen (T<sub>eff</sub>) einteilen. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th1-Zellen) sezernieren nach ihrer Aktivierung u.a. TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha) und IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma). IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  besitzen pleiotrope Effekte. IFN- $\gamma$  dient beispielsweise der Abwehr intrazellulärer Bakterien und Viren und erhöht die Permeabilität der Epithelbarriere (45). TNF- $\alpha$  regt u.a. Makrophagen an und stimuliert die IgG-Produktion der B-Zellen.

CD4<sup>+</sup>Th2-Zellen aktivieren v.a. Mastzellen, eosinophile Granulozyten und die IgE-Produktion zur Abwehr von Wurmparasiten. Sie produzieren u.a. die proinflammatorischen Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13. CD4<sup>+</sup> Th17-Zellen sezernieren u.a. die ebenfalls proinflammatorisch wirksamen Interleukine IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, sowie TNF- $\alpha$ . Durch die von Th17-Zellen produzierten Chemokine wird die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten und die mukosale Abwehrreaktion mit Sekretion von antimikrobiellen Peptiden verstärkt (9).

CD8<sup>+</sup> Effektorzellen erkennen u.a. enterozytenspezifische Antigene und können auch im Rahmen der „crosspresentation“ aktiviert werden. Sie reagieren mit einer intensiven Sekretion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und besitzen zytolytische Aktivität (93).

Die Registrierung eines Antigens setzt also eine ganze Vielzahl von Mechanismen in Gang, deren Ziel die Generierung einer adäquaten Abwehrreaktion ist.

Allerdings kann die Internalisierung der Antigene nicht nur in Immunität sondern auch in Toleranz münden. Für die Aufrechterhaltung der Darmhomöostase ist dazu eine Unterscheidung zwischen schädlich und harmlosen Antigenen vonnöten.

### 1.3 Balance zwischen Homöostase und Immunabwehr

Der Darm als wesentliches Organ der Immunabwehr ist täglich einer immensen Menge körperfremder Antigene ausgesetzt.

Schon während der Geburt wird der Darm durch eine Vielzahl von Bakterien besiedelt (74). Diese apathogenen Mikroorganismen helfen dem Körper bei der Zersetzung von Nahrungsbestandteilen und produzieren unter anderem Vitamin K. Man nennt sie in ihrer Gesamtheit deshalb kommensale Flora. Die Zahl der Mikroorganismen pro Gramm Darm steigt entlang des Gastrointestinaltrakts auf bis zu 10<sup>12</sup> an.

NebendenkommensalenBakterienbesitzenauchProteineausderNahrungantigenesPotential, von denen täglich etwa 100g aufgenommen werden.

Gleichzeitig gelangen zudem pathogene Erreger in den Darm, die durch das Immunsystem erkannt und unschädlich gemacht werden müssen.

DieMukosa,alsoobersteSchichtdesDarms,unterliegtständigerAntigenkonfrontation.Eineihrer wichtigstenAufgabenistdieDiskriminationzwischenSchädlichenundharmlosenAntigenen aus Nahrung und kommensaler Flora sowie die Einleitung einer effektiven Immunantwort gegen erstere (68).

### 1.3.1 Diskrimination zwischen pathogen und apathogen

DiePräsentation eines Antigenes mündet in Toleranz oder Immunität. Wie die Mukosa allerdings zwischen harmlosen Antigenen und schädlichen pathogenen Keimen unterscheidet, konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden. Das Abwehrsystem wird durch die habituell im Darm vorhandenen Antigene dauerhaft stimuliert. Um eine übermäßige Immunreaktion zu verhindern, wird durch IECs und Immunzellen unter physiologischen Bedingungen ein anti-inflammatorisches Milieu geschaffen. Der Interaktion zwischen DCs und IECs wird dabei eine Schlüsselrolle zugeschrieben (63, 93).

Intestinale Epithelzellen sind in der Lage tolerogene CD103<sup>+</sup> DCs zu induzieren, können aber ebenso immunogene DCs aktivieren (28).

Durch die Fähigkeit zur Registrierung von Virulenzfaktoren nehmen IECs eine wichtige Position zur Diskriminierung zwischen schädlichen und harmlosen Antigenen ein. Virulenzfaktoren sind Oberflächenstrukturen pathogener Keime wie Toxine, Adhärenzfaktoren oder Hämolsine, die kommensalen Bakterien fehlen. Werden diese durch Oberflächenrezeptoren der IECs erkannt, produzieren sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine zur Initiation einer effektiven Immunantwort (s. Kapitel 1.5.1). Menge, Aufnahmeart sowie die Dauer der Antigenkonfrontation beeinflussen dabei, neben zahlreichen weiteren Faktoren, das Geschehen (63, 79, 93). Beispielsweise führte ein über lange Zeit andauernder Kontakt von IECs einer Zellkultur mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), einer Oberflächenstruktur der Zellmembran gramnegativer Bakterien, in den Experimenten von Otte et al., zu einer verminderten Immunantwort. Hingegen konnte bei kurzer Inkubationszeit eine Abwehrreaktion ausgelöst werden (67).

Ob eine tolerogene oder immunogene Antwort des Abwehrsystems generiert wird, ist schlussendlich multifaktoriell begründet. Dabei ist nicht zuletzt der Einfluss von Makrophagen, Mastzellen, DC und besonders IECs als nichtklassische APZ von wesentlicher Bedeutung (79).

Eine unverhältnismäßige Reaktion des Immunsystems auf harmlose Antigene mündet in Nahrungsmittelallergien und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (68). Daher ist die Toleranzentwicklung gegenüber diesen Antigenen von zentraler Bedeutung.

### 1.3.2 Intestinale Toleranzentwicklung

Toleranz ist ein Zustand der Akzeptanz körpereigener, apathogener Antigene (68). Sie ist kein passiver Vorgang des Nichterkennens, sondern eine aktive Reaktion des Immunsystems im Darm. Die Entwicklung der Toleranz erfordert die Kollaboration von IECs, DCs und T-Zellen, deren Ziel u.a. die Generierung sogenannter regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) ist (28, 71). Die  $T_{reg}$  verhindern durch lokale und systemische Effekte eine Überreaktion auf harmlose Antigene und spielen somit eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase. Es wird zwischen zentraler und peripherer Toleranz unterschieden.

Die Induktion der zentralen Toleranz erfolgt im Thymus sowie im Knochenmark. Dort werden T- bzw. B-Zellen gebildet, welche verschiedenste Antigene binden können. Lymphozyten mit der Fähigkeit zur Bindung von Eigenantigenen werden erkannt und aus dem Zellpool eliminiert (negative Selektion). Ein Teil dieser T-Zellen exprimiert den Transkriptionsfaktor Forkheadbox P3 (Foxp3). Dieser Teil entgeht der negativen Selektion und wird zu stabilen, natürlichen regulatorischen T-Zellen ( $nT_{reg}$ ).

Da sowohl die Elimination als auch die Differenzierung zu  $nT_{reg}$  die Bindung des TCRs an sein Antigen im Thymus erfordert, ist die zentrale Toleranzbildung ungeeignet, um auf harmlose Antigene im Darm zu reagieren. Folglich müssen Mechanismen für eine periphere Toleranzinduktion existieren. Intensive Forschungen der vergangenen zwei Jahrzehnte ermöglichen eine genauere Beschreibung des Ablaufs der peripheren Toleranzentwicklung.

Die distinkten Wege der Antigenaufnahme wurden bereits unter Kapitel 1.2.1 beschrieben. Hat ein Antigen die enterozytäre Barriere überwunden, wird es an unter dem Epithel liegende, tolerogene  $CD103^+$  DCs weitergegeben. Sie wandern mit Hilfe ihres Chemokinrezeptors CCR7 in mLK und stimulieren dort antigenspezifische naive  $CD4^+$  T-Zellen. Diese differenzieren u.a. TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) abhängig zu  $Foxp3^+ T_{reg}$ , auch induzierte regulatorische T-Zellen ( $iT_{reg}$ ) genannt. Die  $iT_{reg}$  sorgen für eine lang andauernde Toleranz und können unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren wieder zu inflammatorischen T-Helferzellen werden.

Nach ihrer Rückkehr in die LP erfolgt eine IL-10 abhängige Proliferation der  $Foxp3^+ T_{reg}$ . Es existieren Hinweise darauf, dass die Menge der aufgenommenen Antigene die Zahl der

generierten  $\text{Foxp3}^+ \text{T}_{\text{reg}}$  beeinflusst (68).

Durch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, die Inhibition effektorischer T-Zellen und ihre Initiation der  $\text{Foxp3}^+ \text{T}_{\text{reg}}$  sind DCs ein elementarer Bestandteil der Toleranzentwicklungsmechanismen (28, 71). IECs sind ebenfalls in der Lage TGF- $\beta$  und IL-10 zu sezernieren. Sie tragen somit zur Bildung der  $i\text{T}_{\text{reg}}$  bei. Folglich wird auch ihnen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Antigen-toleranz zugeschrieben (93). Durch DCs und IECs werden  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+ \text{T}_{\text{reg}}$  induziert.

$\text{CD4}^+ \text{T}_{\text{reg}}$  inhibieren die übermäßige Effektorantwort von  $\text{CD4}^+$  Th1-, Th2- und Th17-Zellen. Die Inhibition erfolgt direkt zellkontaktabhängig oder indirekt am ehesten via Zytokinsekretion.  $\text{CD8}^+ \text{T}_{\text{reg}}$  hemmen die Proliferation von  $\text{CD4}^+$  sowie auch  $\text{CD8}^+ \text{T}_{\text{eff}}$ . Über diese zahlenmäßig geringere Population existieren bisher wenige Daten. Allerdings gilt als gesichert, dass die Balance zwischen  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+ \text{T}_{\text{reg}}$  und  $\text{T}_{\text{eff}}$  ein entscheidender Faktor für das immunologische Gleichgewicht des Darms ist (56, 93). Eine Dysbalance dieser Zellpopulationen ist charakteristisch für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

## 1.4 Pathologie des Darms – chronisch entzündliche Darmerkrankungen

### 1.4.1 Epidemiologie, Klinik und Therapie

Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden zwei Formen zusammengefasst Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Sie beschreiben eine andauernde, unspezifische Inflammation des Intestinaltrakts, deren Genese bis heute nicht vollständig geklärt ist.

Es existieren zahlreiche Theorien zu ihrer Entstehung. Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass nicht nur eine Ursache die Erkrankung des Darms bedingt. Vielmehr resultiert die Entstehung der CED aus einem komplexen Zusammenspiel von Umwelteinflüssen und genetischen sowie immunologischen und mikrobiellen Faktoren.

Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurden die ersten Fälle beschrieben, die in ihrem Erscheinungsbild dem Morbus Crohn ähnelten. Benannt wurde die Krankheit nach dem amerikanischen Arzt Burrill Bernhard Crohn, welcher 1932 zu einem Phänomen namens Ileitis regionalis heute Ileitis terminalis publizierte (79). Seither ist die Zahl der Erkrankungen stets angestiegen. Die höchste Prävalenz wird für westliche Industrieländer beschrieben und liegt bei etwa 200 Fällen pro 100 000 Einwohnern (18).

MC und CU besitzen einen ähnlichen Symptomkomplex, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Histologie, Verteilungsmuster der Entzündung sowie Komplikationen der Erkrankung.

Beiden gemeinsam sind Symptome wie Diarrhöen und abdominale Schmerzen.

Die Entzündung des MC kann den gesamten Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Anus befallen und ist histologisch durch einen segmentalen und transmuralen Befall der Darmwand gekennzeichnet. Makroskopisch zeigt sich die Inflammation durch aphthöse Läsionen und tiefe Ulzerationen. Strikturen bzw. Stenosen sowie Fisteln und Abszesse können den Krankheitsverlauf verkomplizieren.

Die CU hingegen zeichnet sich durch eine kontinuierliche, auf die Mukosa und Submukosa begrenzte Entzündung des Dickdarms aus. Sie beginnt am Anus und weitete sich in wenigen Fällen auch auf das terminale Ileum aus. Makroskopisch findet sich eine erythematöse Veränderung der Schleimhaut mit granulärem Charakter. Große, flächenhafte Ulzerationen können entstehen. Die gefürchtetste Komplikation ist das toxische Megacolon mit Gefahr der Perforation. Beide Erkrankungen weisen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Colonkarzinoms auf und können sich auch extraintestinal manifestieren. Typisch sind z.B. Beteiligungen der Augen, Haut oder Gelenke (28, 75, 70).

Zur medikamentösen Therapie der Erkrankungen stehen Aminosalicylate wie Mesalazin, Steroide und Immunsuppressiva z.B. Azathioprin, Methotrexat, Cyclosporin oder Tacrolimus zur Verfügung. Sogenannte Biologicals wie der monoklonale TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab sind neuere Medikamente mit immunmodulatorischer Wirksamkeit, die zu einer Verbesserung der Therapie beitragen konnten.

Die komplette Proktokolektomie kann bei CU als kurative Therapie eingesetzt werden. Diese Entfernung des gesamten Dickdarms steht bei MC durch den diskontinuierlichen Befall von Dünn und Dickdarm nicht als kurativer Ansatz zur Verfügung.

CED-Patienten besitzen hinsichtlich ihrer Lebenserwartung keine wesentlich schlechtere Prognose im Vergleich zur Normalbevölkerung (70). Allerdings bedeuten häufige Rezidive und die stark belastenden Symptome eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität. Obwohl die medikamentösen und operativen Therapieoptionen in den letzten Jahrzehnten wesentlich verbessert werden konnten, ist bis heute keine komplette Heilung möglich. Aus diesem Grund ist die Pathogenese der CED Gegenstand intensiver Forschungen.

#### 1.4.2 Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Genese von MC und CU ist, wie erwähnt, multifaktoriell bedingt. Zusammengefasst können alle Veränderungen in der intestinalen Homöostase, die eine Störung der Epithelbarriere bewirken, zu einem Toleranzverlust führen. Eine Überreaktion des Immunsystems auf Nahrungsantigene und kommensale Bakterien, welche eine chronische Inflammation auslöst, ist die

Folge. Abbildung 3 veranschaulicht die Komplexität des Faktorenzusammenspiels, in dessen Zentrum die IECs stehen. Umweltfaktoren, genetische Veranlagung und Veränderungen der kommensalen Flora führen zu einer Erhöhung der Barrierepermeabilität. Dies begünstigt die bakterielle Penetration, was zu einer Dysregulation des Immunsystems führt. Die Interruption der Immunzellkommunikation trägt im Sinne eines Circulus vitiosus zu einer weiteren Permeabilitätserhöhung bei.

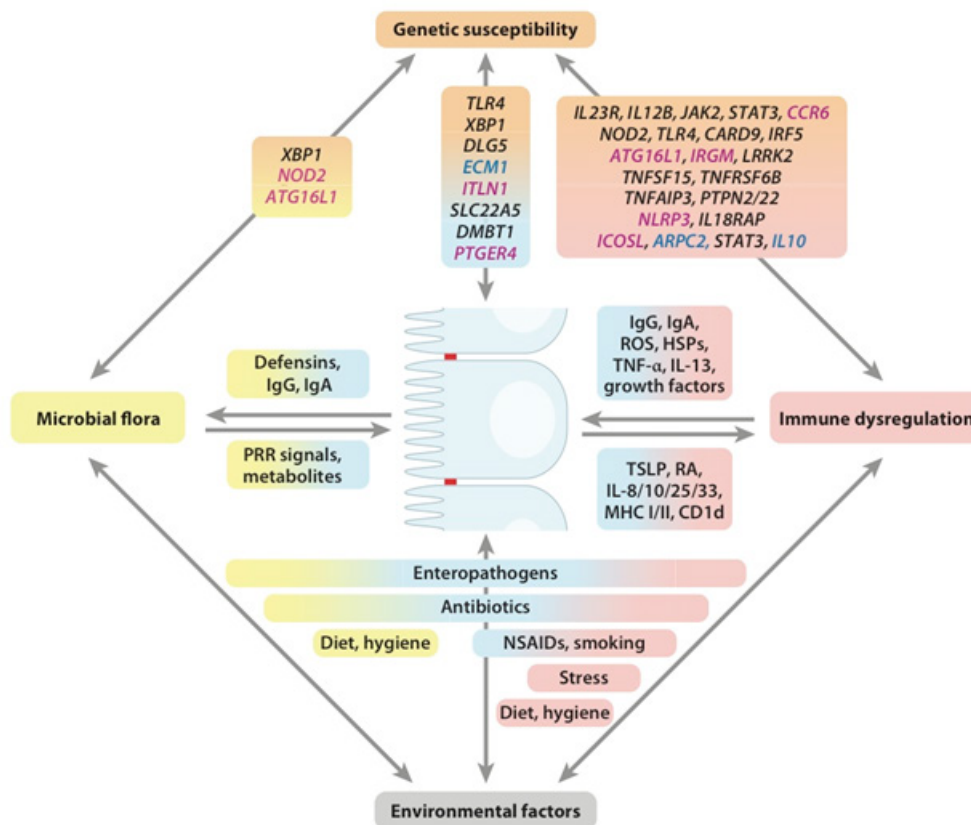


Abb.3: Schaubild des Faktorenzusammenspiels in der Pathogenese der CED (nach Kaser (36))

Als das Erkrankungsrisiko beeinflussende Umweltfaktoren wurden bisher vor allem ein hoher Hygienestandard, Rauchen und die geographische Lage beschrieben (18). Auch eine Reihe genetischer Determinanten erhöhen das Risiko der Krankheitsentstehung. Ein Beispiel ist die Mutation des NOD-2/CARD15-Gens durch die eine Überbesiedlung des Darms mit pathogenen und kommensalen Bakterien sowie eine Störung der Barriereintegrität und Toleranzinduktion resultiert. Zahlreiche weitere Genmutationen wurden in Zusammenhang mit dem Risiko zur CED-Entstehung beschrieben (28, 32, 40, 64). Diverse Veränderungen in der Sekretion von Stoffen der mukosalen Abwehr sowie unterschiedlichster Zytokine und anderer Signalmoleküle,

die das intestinale Immunsystem beeinflussen, konnten bisher identifiziert werden. Die Erläuterung all dieser Forschungsansätze würde an dieser Stelle allerdings zu weit führen. Da die IECs in ihrer Funktion als APZ ein wichtiger Bestandteil dieser komplexen Pathogenese sind, beschränke ich mich im Folgenden auf ihre Rolle in der intestinalen Gleichgewichtserhaltung und Krankheitsentstehung.

## 1.5 Besondere Funktion der Epithelzellen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Das Epithel der Darmschleimhaut bildet eine physiologische Barriere gegenüber Krankheitserregern. Durch die Sekretion von Muzinen, Enzymen und Defensinen sowie der Ausbildung einer Glycokalix wird diese Barriere verstärkt. So schafft die IEC seine dynamische Oberfläche, welche die Anlagerung potentiell schädlicher Substanzen erschwert (28, 93).

Forschung der letzten Jahrzehnte konnten zeigen, dass IECs nicht nur eine einfache Grenzfläche bilden, sondern über die Sekretion von Signalmolekülen und ihre Fähigkeit zu Antigenpräsentation auch in der Lage sind, aktiv in das Immungeschehen einzugreifen. Sie sind damit wichtige Partner für die Toleranzinduktion sowie die Einleitung einer effektiven Immunantwort gegen Pathogene (s. Kapitel 1.3.1 und 1.3.2).

### 1.5.1 Sekretorische Funktion der Enterozyten

Durch ihre Fähigkeit zur Sekretion unterschiedlicher Signalstoffe, nehmen IECs wesentlichen Einfluss auf die Funktion anderer immunogener Zellen, insbesondere der T-Zellen und DCs (s. Kapitel 1.3.1). Sie produzieren zwei verschiedene Arten von Chemokinen, induzierbare, proinflammatorische und konstitutive, homöostasefördernde Chemokine. Daneben bilden IECs eine Vielzahl von entzündungshemmenden und entzündungsfördernden Zytokinen. TGF- $\beta$  besitzt antiinflammatorische Wirksamkeit und hemmt beispielsweise die Expression von MHCII und costimulatorischen Molekülen auf DCs. Weiterhin ist es, zusammen mit dem ebenfalls von IECs gebildeten IL-10, wichtig für die Toleranzinduktion (s. Kapitel 1.3.2) (93). IECs sezernieren im Rahmen ihrer innaten immunologischen Funktion zahlreiche weitere Signalstoffe. Auf deren Erläuterung soll in Ermangelung der Relevanz für die aktuelle Fragestellung dieser Arbeit allerdings nicht weiter eingegangen werden. Eine ihrer wichtigsten Funktionen im Rahmen ihrer immunologischen Kompetenz ist, neben der Sekretion von Signalmolekülen, die Fähigkeit zur Antigenpräsentation.

### 1.5.2 Intestinale Epithelzellen als Antigen-präsentierende Zellen

Durch ihre Lokalisation sind IECs den im Darmlumen vorhandenen Antigenen direkt ausgesetzt. Wiman et al. konnten bereits 1978 die MHC II-Expression der IECs im Tiermodell nachweisen, wodurch sich erste Hinweise auf ihre Immunkompetenz ergaben (95). Eine Hochregulation ihrer MHC-Expression unter inflammatorischen Bedingungen konnte gezeigt werden (52). Der Nachweis der Expression costimulatorischer Moleküle wie z.B. CD1d, CD80, CD86 oder gp180 bis zum Ende der 90er Jahre bescheinigte den IECs die Erfüllung aller Voraussetzungen für eine effektive T-Zell-Interaktion (29). Weitere Forschungen ergaben, dass IECs in der Lage sind Antigene über verschiedene Rezeptoren zu registrieren und aufzunehmen. Die Antigenprozessierung und -präsentation durch IECs konnten nachvollzogen und ihre Funktion als nicht klassische APZ weitgehend charakterisiert werden (12).

### 1.5.3 Antigenprozessierung und -präsentation durch Intestinale Epithelzellen

Intestinale Epithelzellen können exogene Antigene apikal via Rezeptor-unabhängiger Pinozytose oder via Rezeptor-gesteuerter Endozytose aufnehmen. Dieser Vorgang läuft allerdings langsamer ab als bei klassischen APZ und kann unter inflammatorischen Bedingungen auch basolateral erfolgen (12, 28).

Nach der Internalisierung werden unbearbeitete Antigene zur Prozessierung in frühe apikale oder basale Endosomen transferiert. Von dort können sie zwei Wege nehmen. Entweder sie werden recycelt und zu entsprechenden Oberflächen transportiert oder dem endozytotischen Weg zur Prozessierung zugeführt (s. Kapitel 1.2.4) (28). Büning et al. konnten zeigen, dass den IECs dafür mit EDBs, MLBs und MVBs die gleiche Prozessierungsmaschinerie zur Verfügung steht, wie klassischen APZ.

Mit Hilfe des Modellantigens Ovalbumin (OVA) konnte der MHC II-assoziierte Antigenverarbeitungsweg in IECs nachvollzogen und mit der Prozessierung unter inflammatorischen Bedingungen der CED verglichen werden. Dabei erwies sich dies spätendosomalen MVBs als die zentralen MIICs. Nach der proteolytischen Verarbeitung des antigenen Materials und der MHC II-Kopplung in diesen Kompartimenten, folgt der Transport zur basolateralen Oberfläche. Dort werden MHC II-gebundene Peptide aus den MVBs über direkte Membranfusion freigegeben und additional interzellulär über Exosomen freigesetzt. Anschließend kann das MHC II-gekoppelte Antigen CD4<sup>+</sup>T-Zellen und DCs präsentiert werden. Dieser Vorgang geschieht unabhängig vom Darmabschnitt und wird auch durch das proinflammatorische Milieu einer Entzündung nicht beeinflusst (11, 28, 33).

Die Antigenpräsentation kann direkt an der Zelloberfläche der IECs über die Interaktion mit

basolateral lokalisierten T-Zellenerfolgen oder indirekt über die Sezernierung von Exosomen gesteuert werden (89, 90).

MHC-Peptidkomplex-beladene Exosomen können wiederum von klassischen APZ internalisiert werden, welche die Antigenpräsentation übernehmen. Die Antigen darbietung bleibt somit nicht auf eine membrannah Interaktion begrenzt sondern erhält Zugang zur systemischen Zirkulation und erhöht damit den immunologischen Einfluss der IECs (12). MHC-gekoppelte Antigene auf IECs können durch T-Zellenerkannt werden. Eine Bedeutung dieses Sachverhalts für die Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der CED kann vermutet werden.

#### 1.5.4 Bedeutung intestinaler Epithelzellen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

IECs besitzen die Fähigkeit zur Aktivierung regulatorischer sowie effektorischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Unter physiologischen Bedingungen stimulieren IECs CD8<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> über die Interaktion mit einem Komplex der costimulatorischen Moleküle CD1d und gp180. Ebenso fördern sie die Proliferation von CD4<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> sowie effektorischen CD4<sup>+</sup>T-Zellen (69, 93). In vitro Versuche durch Cruickshank et al. zeigten, dass IECs sogar fähig sind bereits geprimte CD4<sup>+</sup>T<sub>eff</sub> zu supprimieren und dadurch vermutlich in der Lage sind, eine Inflammation lokal zu begrenzen (20).

Im gesunden Darm besteht ein Gleichgewicht dieser CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Zell-Populationen, zu dessen Aufrechterhaltung die IECs als nicht klassische APZ in wesentlichem Maße beitragen (93). Bei CED ist dieses Gleichgewicht gestört und durch eine erhöhte Effektor T-Zell-Antwort gekennzeichnet.

Beim MC zeigt sich eine typische Verschiebung zur Seite der Effektor CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen mit gesteigerter Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie IL-12, IL-21, IL-22 und IL-26 (9, 61). Ein weiteres Charakteristikum des MC ist die gesteigerte Zahl der CD4<sup>+</sup> Th17-Zellen und die damit verbundene IL-17 Produktion. Bisher ist die Rolle dieser T-Zell-Population und ihres Interleukins in der Genese der Darmerkrankungen allerdings weitestgehend ungeklärt.

Die Verteilung der Immunzellpopulationen bei der CU ist weniger eindeutig. Als typische Merkmale konnten eine größere Population von CD1-reaktiven Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie eine erhöhte Produktion von CD4<sup>+</sup> Th2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 beobachtet werden (79, 93).

Über die Rolle CD8<sup>+</sup> T-Zellen existieren in diesem Zusammenhang weniger Daten. Brimnes et al. konnten einen enterozytären Expressionsdefekt des CD1d/gp180-Komplexes in Patientengewebe identifizieren. Der Defekt führte zu einer mangelnden Stimulation regulatorischer

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und leistete somit vermutlich seinen Beitrag zum Toleranzverlust und damit zur Krankheitsentstehung (10, 93). Forschungen von Bisping et al. zeigten eine Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen durch IECs bei aktiver Entzündung bei CED (s. Kapitel 4.1.2) (4). Diese Interaktion setzt eine MHC I-gekoppelte Antigendarbietung voraus. In der „cross presentation“ werden exogene Antigene MHC I-gebunden präsentiert. Büning et al. fanden MHC I-Moleküle in allen Kompartimenten des endozytotischen Transportweges und konnten die Kollokalisierung exogener Antigene und MHC I auf der basolateralen Zelloberfläche von IECs und in Exosomen zeigen (12). Diese Erkenntnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass IECs zumindest strukturell das Armamentarium für eine solche Form der Antigenpräsentation („cross presentation“) besitzen. Sie führt zu der Annahme, dass die proinflammatorische Kompetenz der IECs durch CD8<sup>+</sup> Effektor-Stimulation in CED möglicherweise in einer gesteigerten „cross presentation“ begründet sein könnte.

Die Antigenpräsentation durch IECs spielt also besonders im Hinblick auf ihre Relevanz für die Induktion und Kontrolle regulatorischer und effektorischer T-Zellen eine zentrale Rolle für den Erhalt der intestinalen Homöostase (s. Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). An der Genese von CED sind sie durch ihre Partizipation an der überschießenden T<sub>eff</sub>-Antwort maßgeblich beteiligt. Allerdings bleiben die genauen Mechanismen hierzu bis heute in vielen Punkten unverstanden. Es war deshalb Ziel dieser Arbeit, die Ursachen der aberranten Stimulation CD8<sup>+</sup>-zytotoxischer T<sub>eff</sub> genauer zu beleuchten. Warum es im Rahmen dieser Intention plausibel erschien, die Mannoserezeptor-Expression durch IECs zu untersuchen, soll im Folgenden erläutert werden.

## 1.6 Der Mannoserezeptor

### 1.6.1 Zuordnung und Verteilung

Zur Mannoserezeptorfamilie gehören vier Rezeptoren, der Dendritic cell receptor (DEC-205, CD205), Endo 180, (CD280), M-typ Phospholipase A<sub>2</sub> Rezeptor (PLA<sub>2</sub>R) und der Mannoserezeptor (MR, CD206).

Der MR gehört zu den C-Typ Lectinrezeptoren und ist ein membranständiger Rezeptor mit endozytotischer Funktion. Er wurde erstmals 1978 von Stahl et al. erwähnt (72, 80). Zunächst galt er als makrophagen-spezifischer Rezeptor, konnte später aber auch auf einer Reihe weiterer Zellen identifiziert werden (94). Dazu zählen diverse Populationen von DCs sowie spezialisierte Zellen verschiedenster Organe, wie retinale Pigmentepithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur der Trachea, Mesangiumzellen der Niere sowie mikrovaskuläre Endothelzellen von z.B. Milz, Leber, Gehirn oder Haut. Seine Expression durch intestinale Epithelzellen wurde bisher noch

nicht beschrieben, ist aber auf Grund seines ubiquitären Vorkommens durchaus denkbar. Hinsichtlich des Expressionsmusters des MRs in menschlichem Gewebe existieren bisher auf Grund fehlender Antikörper wenige Daten. Hingegen ist seine Verteilung in Mausgewebe detailliert erforscht (15, 24, 43, 50).

### 1.6.2 Aufbau und Liganden

Der MR ist ein 180 kDa Protein und besitzt einen vierteiligen Aufbau. Einem kurzen intrazellulär gelegenen Teilschließt sich der transmembranäre Abschnitt an. Dieser ist an 8 C-Typ Lectin-like Domänen (CTLDs) gebunden, auf die eine Fibronectin Typ II Domäne (FNII) folgt. Den letzten Abschnitt bildet die N-terminale cysteinreiche Domäne (CysR).

Die dreidimensionale Struktur des MRs existiert in einer linearen und einer gebogenen Konformation, in der die CysR zurückgefaltet ist und mit den CTLDs in der Mitte interagieren kann.

Neben anderen Umgebungseinflüssen ist die Konformationsänderung pH-abhängig und bestimmt über die Ligandenselektivität und Oligomerisierung des Rezeptors (44).

Die strukturelle Gliederung gewährleistet eine funktionelle Unterteilung der einzelnen Abschnitte. Die CysR bindet sulfatierte Oligosaccharide wie sie z.B. auf Hypophysenhormonen vorkommen. Die FNII registriert Kollagen, während die allein funktionelle CTLD4 kalziumabhängig Glycoprotein mit n-terminaler Fucose, N-Acetylglucosamin oder Mannose bindet (8). Der MR vermittelt die Aufnahme von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen mit derartigen oberflächlichen Glycoproteinen und sorgt u.a. für die Clearance von Kollagen und Prokollagen aber auch  $\beta$ -Glucuronidase, t-PA und lysosomalen Hydrolasen, welche unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt vorkommen (8, 15, 43, 51). Damit übernimmt er gleichzeitig homöostatische und immunogene Aufgaben. Die Effektivität seiner Bindung wird dabei durch die Glykosylierung der Liganden sowie die des Rezeptors selbst moduliert (50).

Seine Liganden werden Clathrin-abhängig internalisiert und folglich in frühe endosomale Kompartimente transferiert. Durch das leicht saure Milieu der EEs werden Rezeptor und Ligand vermutlich voneinander getrennt, der MR zurück zur Plasmamembran transferiert und somit recycelt. Der Ligand kann dann seinem weiteren Prozessierungsweg zugeführt werden. Eine der bedeutendsten Funktionen des MRs ist die Registrierung und Internalisierung löslicher Antigene. Dazu gehören z.B. Nahrungsantigene wie OVA, welche durch die MR-vermittelte Aufnahme für die „cross presentation“ zugänglich werden (s. Kapitel 4.1.3) (15, 42, 73).

### 1.6.3 Bedeutung des Mannoserezeptors für die „cross presentation“

Die „cross presentation“ beschreibt den Vorgang der MHC I-Komplexierung mit exogenen Antigenen, welche anschließend CD8<sup>+</sup>T-Zellen präsentiert werden können (s. Kapitel 1.2.4). Die Fähigkeit zur „cross presentation“ konnte bisher für klassische APZ gezeigt werden. Einer ihrer Rezeptoren zur Antigeninternalisierung ist der MR (s. Kapitel 1.6.1), welcher die Aufnahmelöslicher Antigene für eine „cross presentation“ vermittelt. In den Forschungsarbeiten von Burgdorf et al. wurde dem MR eine essentielle Rolle für die „cross presentation“ durch DCs und Makrophagen zugeschrieben (13). Es wurde gezeigt, dass ausschließlich MR-endozytierte Antigene sowohl in DCs als auch in Makrophagen der „cross presentation“ zugänglich sind. Versuche mit MR-defizienten Makrophagen und DCs ergaben, dass diese Zellen zwar in der Lage sind OVA aufzunehmen, jedoch keine „cross presentation“ initiieren können. Die „cross presentation“ exogener Antigene scheint daher MR-abhängig und somit die MR-Expression eine mögliche Voraussetzung zur Aktivierung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen zu sein (13,15).

## 1.7 Fragestellungen

Intestinale Epithelzellen tragen durch ihre Funktion als nichtklassische APZ maßgeblich zum Erhalt der intestinalen Homöostase bei. Im Rahmen der CED besitzen sie proinflammatorische Kompetenz durch die Stimulation von Effektor-T-Zellen. Die Mechanismen, die zu dieser übermäßigen Aktivierung proinflammatorischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen führen, sind weitestgehend ungeklärt. Ein Weg der Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist die MHC I-gebundene Präsentation exogener Antigene („cross presentation“) durch klassische APZ. Die Theorie, dass die MR-Expression möglicherweise eine Grundbedingung für die „cross presentation“ darstellt, führte zu unserer Hypothese. Demnach wäre eine MR-spezifische Antigenaufnahme durch IECs und eine anschließende MHC I-gekoppelte CD8<sup>+</sup>-T-Stimulation denkbar, welche zur Aufrechterhaltung der Inflammation der CED beitragen könnte.

Auf dieser Grundlage ergeben sich für meine Forschungsarbeit nun folgende Fragestellungen:

- Wird der Mannoserezeptor von intestinalen Epithelzellen exprimiert?

Und -im Falle der Erfüllung dieser elementaren Voraussetzung- weiterhin:

- Bestehen Unterschiede im Verteilungsmuster des Mannoserezeptors zwischen den einzelnen Darmabschnitten?
- Wird der Mannoserezeptor konstitutiv auch ohne Antigenstimulation der kommensalen Flora gebildet?
- Kommt es im entzündeten Darm zu einer Modulation der Mannoserezeptor-Expression?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

In den Versuchen kamen Tiere dreier verschiedener Genfamilien, C57 (129SvEV und BL/6), BALB/c und NMRI, zum Einsatz. Die C57BL/6- und BALB/c-Tiere wurden von der Firma Charles River bezogen. Die C57/129SvEV Mäuse erhielten wir von Ph. D. George Kollias aus dem Alexander Fleming Institut in Athen, während die NMRI-Mäuse von Dr. Werner Niklas aus dem DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden. In den Versuchen wurde Gewebe von Tieren in einem ausgewogenen Verhältnis männlicher und weiblicher Mäuse eingesetzt. Die Durchführung aller Tierversuche erfolgte nach dem geltenden Tierschutzgesetz und mit Genehmigung der Universität zu Lübeck. Die Tierversuchsantragsnummern lauten: cDSS-C57BL/6-Tiere und gesunde Kontrollen: TVA V312-72241.122-4, BALB/c-Tiere: 82-7/09, NMRI kolonisiert und keimfrei: TVA 93-10/10, TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse und gesunde Kontrollen: TVA 23/p/04. Dabei wurden von mir selbst keine Tierversuche durchgeführt, sondern lediglich Gewebe von vorhergehenden, inhaltlich ähnlichen Projekten genutzt.

#### 2.1.1 C57/129SvEv- und C57BL/6-Mäuse

Die C57/129SvEv- und C57BL/6-Mäuse wurden spezifisch pathogenfrei (SPF) unter Standardbedingungen gehalten. Sie lebten in Standardkäfigen aus transparentem Polycarbonat, welche in klimatisierten Räumen standen. Die Einstreu der Käfige aus staubfreiem Weichholzgranulat wurde einmal wöchentlich erneuert. Ein zwölfstündiger Wechsel von Hell-Dunkel-Phasen simuliert den Tag-Nachtrhythmus der Mäuse (Dunkelphase 18-6 Uhr). Wasser und Standardfutter in Form von Pellets erhielten sie ad libitum.

Nach der Lieferung nach Lübeck lebten sie, bis zu ihrer Verwendung im Alter von 10-12 Wochen, unter gleichen Bedingungen in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck (GTH).

Tiere dieser Genfamilien wurden in den Versuchen als gesunde Kontrollen verwendet. Sie zeigten bei der Futteraufnahme, Stuhlgang, Bewegung oder Verhalten keinerlei klinische Auffälligkeiten, die auf eine Entzündung hindeuteten.

#### 2.1.2 BALB/c-Mäuse

Die verwendeten Mäuse der BALB/c-Linie wurden ebenfalls unter den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Standardbedingungen SPF gehalten und waren klinisch gesund. Auch sie wurden im Alter von 10-12 Wochen getötet.

### 2.1.3 Kolonisierte und keimfreie NMRI-Mäuse

Die NMRI-Mäuse mit konventioneller Kolonisation wurden unter den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Standardbedingungen jedoch nicht SPF gehalten und zeigten keine Krankheitszeichen. Die keimfreien Mäuse lebten dagegen unter keimfreien Bedingungen. Sie stammten aus dem DKFZ in Heidelberg.

Dort wurden sie in Überdruckisolatoren gehalten, deren Zu- und Abluftfiltration über 3 bzw. 2 Lagen Filterwatte (Filtermedium der Filterklasse E11 mit einem mittleren Abscheidegrad von 96,7 %) erfolgte.

Käfige, Einstreu, Futter, Trinkflaschen und Wasser wurden vor dem Einschleusen über spezielle Transfermanschetten in bestimmten Programmen autoklaviert.

Das Autoklavieren der Einstreu erfolgte bei 134°C für 60 min, während Futter, Trinkflaschen und Käfige in Versorgungszylindern für 30 min bei 124°C autoklaviert wurden. Wasser wurde in Flaschen mit einem speziellen Flüssigkeitsprogramm bei 124°C für 60 min autoklaviert.

Die Sterilisation aller Oberflächen in der Transfermanschette (inklusive der Wasserflaschen) erfolgte durch Abreiben mit 4% Wofasteril und anschließendem Einsprühen mit Wofasteril (4%) mit einer Einwirkungszeit von 30 min.

In 3 monatlichen Abständen wurden jeweils 2 Mäuse auf Keimfreiheit untersucht. Dies erfolgte durch eine mikroskopische Untersuchung von Blinddarminhalt im Nativpräparat und einer Gramfärbung eines Ausstriches.

Für die kulturelle Untersuchung auf Keimfreiheit wurde Blinddarminhalt in Standard 1-Bouillon, Sabouraud-Bouillon und in Thioglycollat-Bouillon verbracht sowie zusätzlich auf Blutagar ausgestrichen und für 10 Tage bei 37°C bebrütet.

Die Überführung der keimfreien Mäuse nach Lübeck erfolgte ebenfalls in sterilen Käfigen, während die kolonisierten Tiere in Standardkäfigen transferiert wurden. Die Gewebegewinnung wurde unmittelbar nach ihrer Ankunft durch einen Kollegen der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt 8-12 Wochen alt.

### 2.1.4 Induktion einer Ileitis im Mausmodell - TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse

Die heterozygoten TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse wurden auf dem Hintergrund der C57/129SvEv-Mäuse im Alexander Fleming Institut in Athen generiert. Dort lebten sie unter SPF Bedingungen (siehe Kapitel 2.1.1).

Die DNA dieser Tiere ist durch die Deletion von AU (Adenosin-Urazil)-reichen Elementen (ARE) der Tumornekrosefaktor-mRNA (TNF-mRNA) gekennzeichnet. Dadurch wird bei diesen Mäusen eine Dünndarmentzündung (Ileitis), als Folge einer TNF-Überexpression,

initiiert. Der Tumornekrosefaktor hat zahlreiche Funktionen in immunologischen Prozessen. Er ist ein Zytokin, welches vor allem von Monozyten und Makrophagen gebildet wird. TNF aktiviert Zellen, regt sie zur Proliferation oder auch Apoptose an und trägt maßgeblich zur Entstehung von autoimmunen Entzündungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder rheumatoider Arthritis bei.

In einem gesunden Organismus hemmt die ARE des Mausgenoms die TNF-Biosynthese von hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen sowie von Stromazellen wie beispielsweise Fibroblasten, indem sie die TNF-mRNA destabilisieren und die Translation unterdrücken.

Die gezielte Deletion der ARE führt durch die fehlende Inhibition der TNF-Biosynthese zu einer Überproduktion von TNF in den genannten Zellen. In Folge dessen, entwickeln die Tiere schwere Entzündungen im Bereich des Dünndarms und der Gelenke.

Die histopathologischen Krankheitszeichen stimmen mit den bei Menschen beobachteten Veränderungen bei MC und rheumatoider Arthritis überein.

Die Tiere leiden unter Durchfall, Gewichtsverlust und arthritischen Beschwerden wie Gelenkschwellungen und Deformitäten.

Im terminalen Ileum und vereinzelt auch im proximalen Colon ist nach 8 Wochen eine histologische Entzündung sichtbar. Diese zeigt sich durch Infiltration der Mukosa und Submukosa durch Entzündungszellen wie Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen sowie vereinzelt neutrophile Leukozyten. Weiterhin ist eine vergrößerte Anzahl an Lymphfollikeln und eine Verbreiterung und Abflachung der Dünndarmzotten zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer transmuralen Entzündung, vollständiger Zottenatrophie sowie der Bildung weniger nicht-verkäsender Granulome.

Im Bereich der Gelenke sind histologisch nach 6-8 Wochen entzündliche Infiltrate und eine Hyperplasie der Synovialmembran zu erkennen. Später kommt die Bildung von Pannusgewebe, ein fibrotischer Gewebsumbau und auch Knorpel- und Knochendestruktion dazu.

Entzündungsmanifestationen sind bei homozygoten Mäusen schon Tagen nach der Geburt zu beobachten und so schwer, dass diese Tiere schon nach 5-12 Wochen versterben (39). Aus diesem Grund wurden für die Versuche heterozygote Mäuse verwendet. Diese zeigten bei ihrer Lieferung klinische Symptome der Darm- und Gelenkentzündung in Form von Durchfällen ohne Blutbeimengungen, reduziertem Gewicht, symmetrischen Gelenkschwellungen der Vorder- und Hinterpfoten und damit verbundene Bewegungseinschränkungen. Die Tötung der Tiere und die Gewebeentnahme erfolgte im Alter von 12 Wochen.

### 2.1.5 Induktion einer Colitis im Mausmodell - cDSS-C57BL/6-Mäuse

Dextran Sodium Sulfat (DSS) ist ein Natriumsalz, welches eine direkte zytotoxische Wirkung auf IECs und intraepitheliale Lymphozyten entfaltet und somit die Epithelbarriere schädigt. Es stört die Interaktion zwischen Lymphozyten und IECs und greift damit in den Ablauf der normalen Immunabwehr des Darms ein. Lymphozyten werden zur Proliferation angeregt, Zytokine ausgeschüttet und neurophile Granulozyten wandern in das Gewebe ein (62). In Folge dieser Entzündungsreaktion der Darmmukosa leiden die Tiere unter Durchfällen, Gewichtsverlust und rektalen Blutungen. Dabei entspricht das klinische Bild dieses Modells der chronischen Colitis bei der CU (65).

Für die Untersuchungen an entzündeten Dickdarm wurde bei C57BL/6-Mäusen eine chronische Colitis induziert. Die Haltung der Tiere erfolgte wie unter Kapitel 2.1.1 beschrieben. Zur Colitisinduktion erhielten die Mäuse abwechselnd fünf Tage lang 2% DSS über das Trinkwasser und fünf Tage lang normales Trinkwasser ad libitum. Diese Phasen folgten dreimal aufeinander. Nach insgesamt 30 Tagen wurde die Entzündungsaktivität der Tiere mittels „Modified Disease Activity Index“ eingeschätzt (s. Kapitel 2.2). Es erfolgte eine Endoskopie zur makroskopischen Dokumentation der Darmerkrankung. Diese zeigte Schwellungen der Mukosa, Hyperämie der Darmschleimhaut sowie disseminierte Ulzerationen und Fissuren, passend zum typischen klinischen Bild der CED.

Anschließend wurden die Tiere zur Gewebegewinnung getötet wie unter Kapitel 2.3 beschrieben. Das Gewebe dieser Mäuse erhielten wir von der von Dr. Christian Sinage leiteten Arbeitsgruppe „Molekulare Gastroenterologie“ der Medizinischen Klinik 1 der Universität zu Lübeck. Die Forschungsgruppe schätzte vor der Tötung der Tiere den modified Disease Activity Index (mDAI) ein und stellte uns diese Daten zur Verfügung.

## 2.2 Bestimmung des Modified Disease Activity Index

Der mDAI ist ein klinischer Score zur Beurteilung der Colitisaktivität bei Mäusen (78). Er beinhaltet die Einschätzung des Gewichtsverlusts in Prozent sowie die Untersuchung auf okkultes Blut im Stuhl (mit Hilfe eines Hämocculttest) bzw. makroskopisch sichtbares Blut (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: modified Disease Activity Index (mDAI)

Gewichtsverlust in %	Blut im Stuhl	Punkte
< 5%	negativ	0
5-10%		1
10-15%	positiv	2
15-20%		3
>20%	makroskopisch sichtbar	4

## 2.3 Gewebegewinnung

Zur Gewinnung des Darmgewebes wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet.

Anschließend erfolgte die Entnahme des Darms. Dazu wurden die Tiere auf dem Rücken liegend mit Nadeln an einer Korkplatte befestigt und das Fell mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Mit einem Y-Kragenschnitt wurde die Haut des Bauches unter Zuhilfenahme eines Skalpellseröffnet und das Peritoneum durchtrennt. Nach Entnahme des gesamten Darms von Duodenum bis Rektum erfolgte eine Spülung des Gewebes mit eisgekühlter PBS (phosphatgepufferter Salzlösung). Zuletzt wurde es in 3 mm lange Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zeitspanne zwischen Organentnahme und Einfrieren des Gewebes betrug für jedes Tier weniger als fünf Minuten. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung der Proben für die Immunfluoreszenzfärbung nativ bei -80 °C in Cryo Tubes. Die Tötung und Gewebeentnahme wurde von einem Kollegen aus der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. Für die HE-Färbung wurde das Gewebe in Einbettkapseln in einer 4 %igen Formalinlösung fixiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Untersuchung der MR-Expression in verschiedenen Darmsegmenten wurde Gewebe von je 2-6 unterschiedlichen Mäusen je Lokalisation genutzt (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: verwendete Darmabschnitte der unterschiedlichen Stämme

Stamm	Darmabschnitt	n=Anzahl der Tiere
C57/129SvEv und BL/6	Duodenum	6
	Jejunum	5
	Ileum	6
	Colon	5
BALB/c	Duodenum	5
	Jejunum	5
	Ileum	5
	Colon	5
NMRI kolonisiert	Jejunum	5
	Ileum	5
	Colon	5
NMRI keimfrei	Jejunum	2
	Ileum	5
	Colon	5
TNF $\Delta$ ARE/WT	Ileum	3
cDSS C57BL/6	Colon	5

## 2.4 Paraffineinbettung

Für die Paraffineinbettung wurde das zuvor in 4 % Formalin fixierte Gewebe mindestens 2h unter fließendem Leitungswasser gespült und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3x 70 %, 80 %, 90 %, 3x 100 % Isopropanol je 24 h) dehydriert. Anschließend erfolgte eine Behandlung des Gewebes mit einem 1:1 Paraffin/Isopropanol-Gemisch und 3x 100% Paraffin bei 55-65 % für je 24 h sowie das Einblocken des Gewebes in Paraffin.

## 2.5 Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Mikrotom

Für die HE-Färbung des Gewebes wurden von den in Paraffin gebetteten Gewebsblöcken 4,5  $\mu$ m dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Firma Leica) angefertigt. Dazu lagerten sie zuvor mindestens 2h bei -20°C und wurden nach dem Schneidevorgang in einem Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen. Nach einem Heißwasserbad (45°C) konnten sie anschließend glatt auf einen Objektträger gezogen werden, wo sie über Nacht bei 37 °C bis 45 °C trockneten.

## 2.6 Anfertigung von Gewebeschnitten mittels Kryostat

Die Anfertigung immunhistochemischer Markierungen und spätere Auswertung am Laserscannmikroskop erfordert die Herstellung von 10  $\mu$ m dicken Gewebeschnitten. Diese wurden mit einem Kryostat CM30505 hergestellt, eine Methodik, welche Antigenstrukturen gut erhält und somit auch für immunhistochemische Färbungen ideal geeignet ist (6). Das benötigte Gewebe

wurde bei -80 °C nativ aufbewahrt und bei -20 °C geschnitten. Dazu wurde es mit Hilfe eines Gefriermediums auf einen speziellen Träger, einen Metallstift mit runder Platte, aufgebracht. Nachdem Einspannen und Ausrichten erfolgte anschließend das Trimmen des Blocks, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach Einstellung der Schnittdicke wurde der Gewebekblock dann in 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Jeweils drei Scheibchen wurden auf einen Objektträger aufgebracht und mit Hilfe eines Pinsels glattgezogen. In der Dunkelfeldmikroskopie erfolgte eine Kontrolle des Anschnittes und eventuelle Nachjustierung am Gerät. Anschließend konnten die Schnitte bei Raumtemperatur etwa 24 h getrocknet und dann bei -20 °C aufbewahrt werden.

## 2.7 Gewebefärbung mit Hämalaun und Erythrosin

Um die Entzündung der TNFΔARE- und C57 BL/6 cDSS-Tiere histologisch zu dokumentieren und sie mit gesunden Kontrollen vergleichen zu können, erfolgte eine HE-Färbung der Gewebeschnitte. Diese Methode ermöglichte eine bessere Unterscheidung der einzelnen Gewebestrukturen. So konnten eingewanderte Entzündungszellen und Gewebedestruktionen in den untersuchten Präparaten identifiziert werden.

Die Schnitte wurden dazu zuerst viermal fünf Minuten mit Xylol gespült, welches als Lösemittel für Paraffin dient. Danach wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 2x 70 % Isopropanol je 2 min) weiter entparaffiniert, mit destilliertem Wasser gespült (2x 2 min) und anschließend in Hämalaun gebadet (6 min). Dieser Stoff bindet an basophiles Chromatin und färbt deshalb vor allem Zellkerne blau. Das Bläuen erfolgte, nach einer weiteren Spülung mit destilliertem Wasser, durch Spülen in Leitungswasser (10 min). Anschließend wurden die Schnitte in Erythrosin, welches mit einem Tropfen Eisessig versetzt wurde, gebadet (30s). Dieser Farbstoff bindet azidophile Zellbestandteile, also vornehmlich das Zytoplasma mit den enthaltenen Proteinen und färbt sie rosa. Wiederholtes kurzes Waschen mit destilliertem Wasser entfernte überschüssige Farbreste, so dass die Färbung dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 2x 100 % Isopropanol) fixiert und differenziert werden konnten.

Abschließend erfolgte eine Spülung mit Xylol (4x 5 min). Die Schnitte wurden zuletzt in Entellan-Einbettmedium eingedeckt und mit Deckgläschen versehen. Ihre Auswertung erfolgte am Zeiss 2 plus Axioskop. Bilder zur Dokumentation wurden mit Hilfe der Computersoftware Olympus CellSense erstellt.

## 2.8 Histologische Begutachtung des Gewebes

Um den Grad der Entzündung des Gewebes der C57 BL/6 cDSS-Tiere beurteilen und dokumentieren zu können, wurden nach der Betrachtung unter dem Mikroskop der histologische Index zur Entzündungsaktivität erhoben. Es erfolgte hierbei eine Punktevergabe von 0-3 Punkten für den Strukturverlust und die Infiltration der Gewebsschicht durch Entzündungszellen sowie eine anschließende Addition dieser Punkte (78). Tabelle 3 zeigt die Punktevergabe für die einzelnen Kriterien des Histologischen Index.

Tabelle 3: Histologischer Index

Infiltration durch Entzündungszellen	Gewebescha-den	Punkte
kaum Infiltrat	normale Morphologie	0
Infiltration der Lamina propria	lymphoepitheliale Läsion	1
bis in die Submukosa reichend	oberflächliche Erosion oder fokale Ulzeration	2
transmural	ausgedehnter Mukosascha-den, Beteiligung tieferer Wandschichten	3

## 2.9 Immunhistochemische Färbung

Die Darstellung der untersuchten Proteine, dem MR und MHC II, erfolgte mittels Immunfluoreszenzmarkierung. Dies ist eine Methode bei der das Vorhandensein und die Lokalisation von zu untersuchenden Proteinen mit Hilfe von fluoreszierenden Antikörpern bestimmt werden können. Es wurden primäre und sekundäre Antikörper verwendet (s. Tabelle 4 und 5). Die primären Antikörper binden die zu untersuchenden Oberflächenantigene des Gewebes (MR und MHC II). Die Lokalisation dieser Antigene kann dann mit Hilfe des sekundären Antikörpers sichtbar gemacht werden. Der sekundäre Antikörper richtet sich spezifisch gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers. Er ist an ein Fluorochrom, einen fluoreszierenden Farbstoff, gebunden, welcher in Fluoreszenzmikroskopen durch Anregung bestimmter Wellenlängen visualisiert werden kann.

Tabelle 4: verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Klonalität	Wirt	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
anti-Mannose-Rezeptor C Typ 1	IgG2a	CD206 monoklonal	Ratte	Maus	1:100	AbD Serotec (Oxford, Großbritannien)
anti-MHC II	IgG1	CD311 monoklonal	Ratte	Maus	1:100	Gift from D. Kaiserlian, Institut Pasteur de Lyon (94)

Tabelle 5: verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Isotyp	Klonalität	Wirt	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488*	IgG (H+L)	monoklonal	Ziege	Ratte	1:400	Invitrogen (Eugene, Oregon, USA)
Alexa Fluor 555*	IgG (H+L)	monoklonal	Ziege	Ratte	1:400	Invitrogen (Eugene, Oregon, USA)

\*Um die Antikörperstabilität bei einer Lagerung in -20°C zu erhalten, wurden die sekundären Antikörper 1:2 in Glycerin vorverdünnt. Die Verdünnung auf 1:400 bzw. 1:200 erfolgte unter der Verwendung von 3% Normalserum der Maus. Das Serum enthält Blockierungsproteine, die mit dem Antikörper um hydrophobe Bindungsstellen v.a. in Epithelien, Bindegewebe und Lipiden konkurrieren. Somit werden unspezifische Antikörperbindungen verringert und unerwünschte Hintergrundfärbungen reduziert (6).

In Vorbereitung der Färbung wurden die Objektträger mit dem bei -20°C gefrorenen Gewebe aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet und beschriftet. Anschließend wurden die Schnitte zur Fixierung bei -20 °C in ein Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) getaucht (10-15 min). Methanol fixiert durch Koagulation, ohne Quervernetzungen auszubilden und sorgt somit für einen guten Erhalt sowohl der Zellmorphologie als auch der Antigene. Zudem bleibt das Gewebe unter Erhalt der immunreaktiven Determinanten gut zugänglich für Antikörper. Ein Nachteil dieser Fixierungsmethode ist allerdings die schlechte Gewebedurchdringung des Acetons. Der Fixierungseffekt ist somit unvollständig, was das Gewebe bei häufigerem Spülen in Pufferbädern für Membranverlust und Kernauflösung anfälliger macht. Durch das vorherige Lufttrocknen der Gewebeschnitte über einen längeren Zeitraum und die entwässernde Wirkung des Alkohols wird dieser Artefaktbildung entgegengewirkt (6).

Nach der Fixierung wurden die Objektträger in PBS gewaschen (3x 3 min) und anschließend mit dem primären Antikörper beschichtet. Die Objektträger wurden danach in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert (ca. 60 min). Die Aufbewahrung in der Kammer verhinderte das Austrocknen der Schnitte während der Inkubationszeit.

Im Anschluss an die Inkubation folgte die Entfernung der ungebundenen Reste des primären Antikörpers durch Waschen in PBS (3x 3 min).

Der nächste Schritt war das Beschichten der Schnitte mit dem sekundären Antikörper und die erneute Inkubation bei Raumtemperatur in der abgedunkelten Feuchtkammer (ca. 60 min). Nachdem Auswaschen (3x 3 min) der ungebundenen Rückstände des sekundären Antikörpers mit PBS wurden die Objektträger in eine Glasküvette mit 200 ml Höchstfarbstoff getaucht (mind. 30 min). Das Höchstreagenz bindet an die DNA der Zellkerne. Es wurde in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

Ungebundener Farbstoff wurde anschließend wiederum mit PBS abgewaschen (3x 5 min).

Zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop oder Laserscanmikroskop (LSM) wurden die Objektträger mit Movirole eingedeckt. Danach mussten die Objektträger bei Raumtemperatur trocken. Die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop war unmittelbar möglich. Für die Auswertung am LSM sollte die Trocknung über Nacht erfolgen.

## 2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist das Verfahren, welches zur Visualisierung der Gewebemarkierung dient. Sie wurde am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss 2 plus Axioskop) durchgeführt und ist eine Form der Auflichtmikroskopie, bei der der fluoreszierende Farbstoff durch Licht eines Wellenlängenbereichs angeregt wird.

Licht des ultravioletten Bereichs und des gesamten sichtbaren Spektrums wird mit Hilfe einer Quecksilberdampf-Kurzbogenleuchte HBO 103 erzeugt und auf das Objekt geleitet. Dabei werden Exzitationsfilter zwischengeschaltet, um nur den erforderlichen Wellenlängenbereich zu erhalten, welcher für die Anregung (Exzitation) des jeweiligen Farbstoffes benötigt wird. Das Fluorochrom des Sekundärantikörpers emittiert nach der Anregung Licht eines anderen Wellenlängenbereichs.

Um das gewünschte Fluoreszenzlicht der Emission zu isolieren, werden sogenannte Sperrfilter verwendet, sodass am Ende nur eine Farbe sichtbar ist (57).

In den Experimenten wurde für die Markierung der untersuchten Proteine mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 und Alex Fluor 555 gearbeitet. Die Exzitations- und Emissionsmaxima ihrer Fluorochromeliegen bei 495 nm und 519 nm bzw. 550 nm und 565 nm. Dabei erscheint Alexa Fluor 488 grün und Alexa Fluor 555 rot. Weiterhin wurde der Höchstfarbstoff für die Kernfärbung verwendet. Seine Exzitations- und Emissionsmaximaliegen bei 352 nm und 461 nm. Er erscheint daher blau.

Um einen Überblick über die Qualität des Anschnittes des Gewebes und den Anteil an Hintergrundfärbung zu erhalten, wurde zuerst die Negativkontrolle in der 10er Vergrößerung betrachtet. Hintergrundfärbungen, sind unspezifische Markierungen des Gewebes, welche möglichst minimal sein sollten, da sie die Auswertung des Ergebnisses verfälschen. Die Anfertigung einer Negativkontrolle, die anstelle des primären Antikörpers nur mit PBS inkubiert wurde, erfolgte für jeden gefärbten Gewebeschnitt.

Für die Übersichtsbetrachtung wurde der Blaulichtfilter verwendet. Dieser Filter ermöglicht die Betrachtung der mit dem Höchstreagenzangefärbten Zellkernes sowie eine Begutachtung der Dicke und Ausrichtung des Anschnittes. Anschließend erfolgte der Wechsel des Filters über die Drehung des Reflektorrevolvers zur Einstellung der Grün- oder Rotlichtfilter je nachdem,

welcher Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 555) benutzt wurde. Nach der Betrachtung der Negativkontrollen wurden die Schnitte mit den spezifischen Markierungen zentriert und ebenfalls zuerst in der 10er Übersichtsvergrößerung betrachtet. Zunächst erfolgte auch in diesem Schritt die Betrachtung der Höchsfärbung. Daraufhin wurde die Auswertung der spezifischen Färbung des MRs sowie die der MHC II-Markierung vorgenommen. Hierbei war außer der 10er- auch die 20er- und 40er-Vergrößerung mit Immersionsöhlhilfreich, um die genauere Lokalisation der markierten Proteine zu bestimmen. Alle Ergebnisse wurden parallel dazu auf Auswertungsbögen tabellarisch festgehalten. Beurteilt wurden dabei die Qualität der Negativkontrollen, die Qualität des Schnittes und das Vorhandensein einer Markierung innerhalb der verschiedenen Schichten der Darmwand. Nach der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte die Auswahl qualitativ hochwertiger Schnitte, die für die weitere bildliche Dokumentation am LSM verwendet werden sollten.

## 2.11 Konfokale Laserscanmikroskopie

Die Laserscanmikroskopie diente der weiterführenden Auswertung sowie bildlichen Dokumentation einer spezifischen, zellgebundenen Markierung und ermöglichte somit die Visualisierung der Ergebnisse für den außenstehenden Betrachter.

Hierbei wurde mit dem Zeiss LSM 510 meta und dem dazugehörigen Computerprogramm LSM meta510 gearbeitet.

Bei der konfokalen Laserscanmikroskopie wird das Objekt im Vergleich zur unter Punkt 2.10 beschriebenen Fluoreszenzmikroskopie durch Laser bestrahlt. Dies erfolgt nicht an allen Stellen des Objektes gleichzeitig sondern punktförmig. Der fokussierte Laser rastert das Objekt dabei stellenweise ab. Die Fluoreszenz jeder einzelnen bestrahlten Objektstelle wird ebenfalls punktförmig detektiert und anschließend im Computer wieder zu einem vollständigen Bild zusammengefügt. Ein Vorteil dieser Methode ist dabei, dass die entstehenden optischen Schnittbilder besonders kontrastreich sind. Entscheidend hierfür ist der Einsatz einer sogenannten Lochblende (Pinhole). Diese lässt nur Licht des Objektpunktes hindurch, der gerade fokussiert und damit scharf abgebildet wird. Licht aus anderen unscharfen Ebenenbereichen wird blockiert. Der Beobachtungspunkt in der Mitte der Lochblende und der Beleuchtungspunkt des Objekts stehen dabei gleichzeitig im Fokus. Dies wird auch als „konfokal“ bezeichnet (57, 58).

Für den Scanvorgang der ausgewählten Präparate erfolgte der Einsatz verschiedener Anregungslaser. Der Enterprise UV-Laser wurde für den Höchstfarbstoff, der Argonlaser für die Färbung mit Alexa Fluor 488 verwendet. Für die Anregung der Markierung mit Alexa Fluor 555

wurde der Helium-Neon-Laser benötigt.

Nach dem Einstellen der Laser erfolgte die Konfiguration der Mikroskopeinstellungen und die Festlegung der Farbkanäle (blau, grün/rot, weiß). Bei den Aufnahmen wurde zusätzlich ein sogenannter DIC-Kanal (differentieller Interferenzkontrast-Kanal) verwendet. Dieser Kanal diente der plastischen Wiedergabe transparenter Präparatedetails und wurde im Bild weiß dargestellt.

Vor Beginn des Scanvorgangs wurde eine ausreichend markierte Stelle im Schnitt aufgesucht, die das Ergebnis der Färbung gut abbildete. Dies erfolgte in der 20er-Vergrößerung im Blaukanal und je nachdem, welcher Sekundärfarbstoff verwendet wurde, im Rot- oder Grünkanal. Nach der groben Positionierung des Schnittes wurde ein Bild im Fast-Scan-Modus erstellt. Dadurch war zu erkennen, welchen Bildausschnitt der Computer scannt und wie scharf dieser ist. Gegebenenfalls erfolgte während dieses Vorgangs eine manuelle Nachjustierung. Anschließend wurde im Single-Scan-Modus gearbeitet. Bilder in 10er und 20er-Vergrößerung wurden erstellt. Dabei erfolgte eine viermalige Aufnahme jedes abgerasterten Objektbereichs. Die Software errechnet daraus einen Mittelwert für die Bilderstellung. Dies ermöglichte die Berechnung eines Bildes mit besonders hoher Qualität, welches aus drei übereinander gelegten Wellenlängen besteht. Über die Anpassung der Laser- und Detektorintensität in der Computer-Software konnte die Bildqualität optimal eingestellt werden.

Zuletzt wurde das fertige Bild über Kontrastveränderungen im Programm bearbeitet und abgespeichert.

Die genaue Bedienung des Gerätes sowie die vorzunehmenden Einstellungen sind dem Handbuch zu entnehmen. (Operating Manual LSM 510 meta Laser Scanning Microscopes from Carl Zeiss)

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Mannoserezeptormarkierungen an Dün- und Dickdarmgewebe gesunder Mäuse

#### 3.1.1 Antikörpertest und Konzentrationsbestimmung für den Mannoserezeptor-Antikörper

Die Untersuchung der Expression des MRs in gesundem und entzündetem Gewebe sollte mittels Immunfluoreszenzmarkierung erfolgen. Dazu bedurfte es der Verwendung eines passenden Antikörpers.

Die aktuelle Literatur zu diesem Thema wurde daraufhin studiert und auf die erfolgreiche Verwendung eines solchen Antikörpers in Immunfluoreszenzmarkierungen durchsucht. In den Versuchen von Hassan et al. wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung mit dem monoklonalen IgG2a CD206 anti-Mannose C Typ 1 Ratte-anti-Maus-Antikörper an Leber- und Milz-Gewebe von C57BL/6-Mäusen beschrieben. Die Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen dieser Forschungsgruppe verdeutlichen eine spezifische Markierung (27). Daraufhin erfolgte eine eigene Testung dieses Antikörpers, an Gewebeschnitten des Ileums von C57/129SvEv-Mäusen. So konnte seine Funktionsfähigkeit in einem Darmsegment einer Standardmaus, welches einen typischen Manifestationsort des MC darstellt, bestimmt werden. Eine Isotypkontrolle wurde durchgeführt. In dieser Kontrolle wurde ein Immunglobulin der gleichen Klasse und Subklasse verwendet. So konnte das Ausmaß der unspezifischen Färbung des zu testenden Antikörpers eingeschätzt werden.

Es folgte eine Titration des Antikörpers für den MR, mit dem Ziel, die höchstmögliche Verdünnung zu bestimmen, bei welcher eine deutliche, spezifische Markierung ohne Hintergrundsignal zu verzeichnen ist. Das Hintergrundsignal ist eine unspezifische Markierung anderer, vom MR differenter Strukturen. Die Antikörpertestung in verschiedenen Konzentrationen (1:10; 1:25; 1:100; 1:400; 1:800) bei einer IgG-Konzentration von 1,0 mg/ml ergab eine eindeutige, zellgebundene, spezifische Markierung mit geringstmöglicher Hintergrundfärbung in der Verdünnung 1:100 (s. Abb. 3 A). Eine Isotypkontrolle mit einem IgG2a Ratte-anti-Maus Antikörper wurde in gleicher Konzentration durchgeführt. Sie zeigte ebenfalls kein Hintergrundsignal (s. Abb. 3 B). Aus diesem Grunde erfolgte die Entscheidung für die Verwendung des monoklonalen IgG2a CD206 Ratte-anti-Maus-Antikörpers in unseren Experimenten in einer Verdünnung von 1:100 bei einer IgG-Konzentration von 1,0 mg/ml.

Die Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 555 wurden ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen (1:200; 1:400; 1:800) an Ileumgewebe von C57/129SvEv-Mäusen getestet.

Dieser Vorgang ergab eine spezifische und zellgebundene Markierung ausreichender Intensität mit fehlendem Hintergrundsignal bei einer Konzentration von 1:400 für den Alexa Fluor 488 und bei 1:200 für den Alexa Fluor 555. Negativkontrollen der beiden Farbstoffe, bei denen das Gewebe nur mit PBS anstelle des Primärantikörpers behandelt wurde, zeigten keine unspezifische Färbung (s. Abb. 3 C).

#### Antikörpertest MR - C57/129SvEv-Ileumgewebe

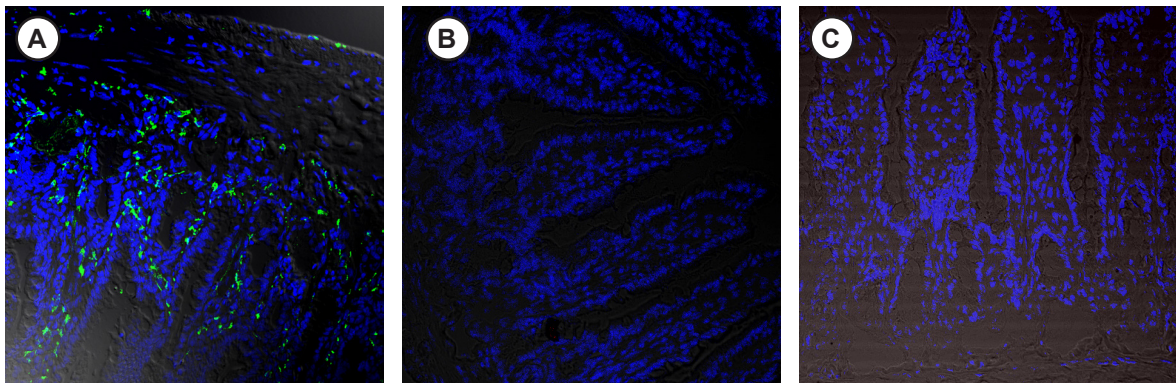


Abb.4: Antikörpertest für den IgG2a anti-CD206-Antikörper an Ileumgewebe von C57/129SvEv – Mäusen Verdünnung 1:100 für den Primär- und 1:400 für den Sekundärantikörper A Zellkerne (blau), spezifische Markierung des MR (grün); B Die IgG2a-Isotypkontrolle zeigte keine unspezifische Markierung C Negativkontrolle mit PBS ohne unspezifische Markierung

#### 3.1.2 Fehlende Expression des Mannoserezeptors im Darmepithel gesunder C57/129SvEv-Mäuse

Das erste Ziel der Experimente beinhaltete den Nachweis einer Expression des MRs sowie die Ermittlung seiner Lokalisation im gesunden, kolonisierten Darm adulter Mäuse (8-12 Wochen). Dazu wurde Darmgewebe der C57/129SvEv-Mäuse (und später C57BL/6) verwendet, da an diesem Gewebe im Rahmen der Antikörpertestung (siehe Kapitel 3.1.1) bereits im Ileum eine spezifische Markierung zu verzeichnen war.

An fünf bis sechs unterschiedlichen Tieren wurden die Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon hinsichtlich ihrer MR-Expression untersucht (s. 2.3 Tabelle 2).

Die Immunfluoreszenzfärbung für den MR wies im Epithel von Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon keine Fluoreszenz auf.

Sie ergab hingegen eine positive Markierung von Zellen der LP in jedem dieser Darmabschnitte. Ebenso war in Zellen der Submukosa und Subserosa eine spezifische Färbung sichtbar (s. Abb. 4 A-D). Muskel- (und Serosazellen) zeigten keine Markierungen. Innerhalb der Muskelschicht waren jedoch vereinzelte Zellen mit Fluoreszenz erkennbar.

Die Negativkontrollen für jeden gefärbten Schnitt wiesendurchgehendkeinerlei Markierungen auf (nicht dargestellt).

MR-Markierung - gesunde C57/129SvEv-Mäuse

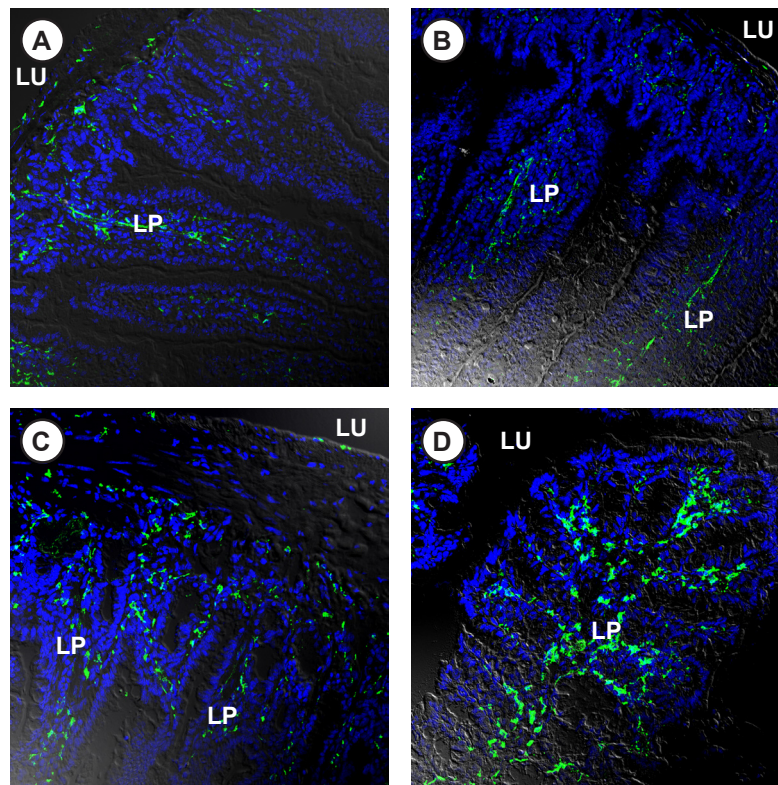


Abb.5: Immunfluoreszenzmarkierung des MRs an Darmgewebe von gesunden C57/129SvEv-Mäusen  
 A Duodenum, B Jejunum, C Ileum, D Colon  
 Die Zellkerne wurden mit dem Höchstfarbstoff (blau) dargestellt. Im Epithel (und der Serosa) konnte keine Färbung nachgewiesen werden. Die Lokalisation des MR zeigt sich durch seine spezifische Markierung (grün) in den Zellen der LP, Submukosa und Subserosa. Innerhalb der Muskelschicht waren vereinzelt markierte Zellen erkennbar. LP (Lamina propria), LU (Lumen)

### 3.1.3 Fehlende Expression des Mannoserezeptors im Darmepithel gesunder BALB/c-Mäuse

Im nächsten Schritt galt es zu verifizieren, dass die fehlende MR-Expression des Epithels nicht auf den genetischen Hintergrund der C57/129SvEv-Mäuse zurückzuführen ist. Deshalb wurden Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon von jeweils fünf Tieren eines anderen genetischen Stammes (BALB/c) hinsichtlich ihrer MR-Expression untersucht.

Die Fluoreszenzfärbung des o.g. Darmgewebes zeigte dabei äquivalente Ergebnisse zu den C57/129SvEv-Mäusen mit fehlender Epithelmarkierung und positiver Markierung von Zellen der LP, Submukosa und Subserosa (s. Abb. 5 A-D). In der Muskelschicht zeigten sich erneut vereinzelte Zellfärbungen. Die Negativkontrollen wiesen auch hier keine unspezifische Färbung auf (nicht dargestellt).

MR-Markierung - gesunde BALB/c-Mäuse

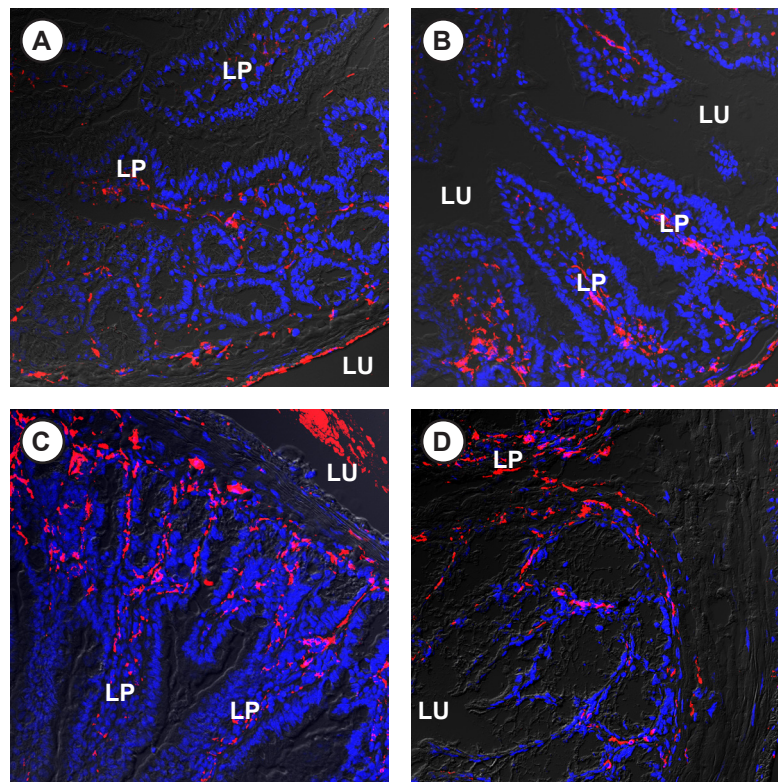


Abb.6: Immunfluoreszenzmarkierung der MHC II-Komplexe an Gewebe von BALB/c-Mäusen

A Duodenum, B Jejunum, C Ileum, D Colon

Die Zellkerne wurden mit dem Höchstfarbstoff (blau) dargestellt. Im Epithel war auch hier keine Färbung nachweisbar. Die Lokalisation des MRs zeigte sich durch seine spezifische Markierung (rot) von Zellen der LP, Submukosa und Subserosa und vereinzelt in der Muskelschicht. Die Ergebnisse stimmten mit denen der Immunfluoreszenzmarkierung an Darmgewebe der C57/129SvEv-Mäuse überein.

LP (Lamina propria), LU (Lumen)

Die bisher durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen des MRs ergaben unabhängig von der Lokalisation im Darm und vom genetischen Hintergrund keine Epithelmarkierungen. Gleichzeitig waren spezifische Färbungen innerhalb der Schichten der Darmwand erzielbar. Um eine mangelnde epitheliale Stimulation durch Mikrobiota als Ursache für die fehlende MR-Expression auszuschließen, erfolgte die Markierung der MHC II-Komplexe.

### 3.2 MHC II- Markierungen an Dün- und Dickdarmgewebe gesunder Mäuse

#### 3.2.1 Antikörpertest und Konzentrationsbestimmung für den MHC II-Antikörper

Die Markierung der MHC II-Moleküle erfolgte zur Verifizierung des Stimulationszustandes des Epithels im gesunden und entzündeten Gewebe.

Unter physiologischen Bedingungen werden IECs durch kommensale Bakterien stimuliert. Sie exprimieren daraufhin MHC II-Moleküle. Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es

zu einer Hochregulation der MHC II-Expression (52). Für die erforderliche Markierung wurde der monoklonale IgG1 CD311 anti-MHC II Ratte-anti-Maus-Antikörper ausgewählt. Er kam in Fluoreszenzfärbungen von Vida et al. zum Einsatz und fand bereits erfolgreich Verwendung in vorangegangenen Versuchen der Forschungsgruppe von Büning et al. (91). Es erfolgte eine Austestung verschiedener Antikörperkonzentrationen (1:25; 1:100; 1:400). Da in der Literatur zahlreiche Daten hinsichtlich der MHC II-Expression im Ileum der Mausexistieren, wurden die Tests an Gewebeschnitten dieses Darmsegmente einer genetischen Standardmaus (C57/129SvEv-Mäusen) durchgeführt. Gewählt wurde, wie bereits bei der Antikörpertestung für den MR, die höchstmögliche Verdünnung, bei welcher eine deutliche, spezifische Markierung ohne Hintergrundsignal zu verzeichnen war. Dies entsprach einer Verdünnung von 1:100 (s. Abb. 6 A). Auch hier wurde eine Isotypkontrolle mit einem IgG1 Ratte-anti-Maus-Antikörper in gleicher Verdünnung durchgeführt, welche keine unspezifische Färbung zeigte (s. Abb. 6 B). Die Sekundärantikörper wurden wie unter Kapitel 3.1.1 beschrieben getestet, mit dem Ergebnis, dass auch für die MHC II-Färbung eine Festlegung auf eine Konzentration von 1:400 für den Alexa Fluor 488 und von 1:200 für den Alexa Fluor 555 erfolgte. Die Negativkontrollen zeigten wiederum keine unspezifische Markierung (s. Abb. 6 C).

#### Antikörpertest MHC II - C57/129SvEv-Ileumgewebe

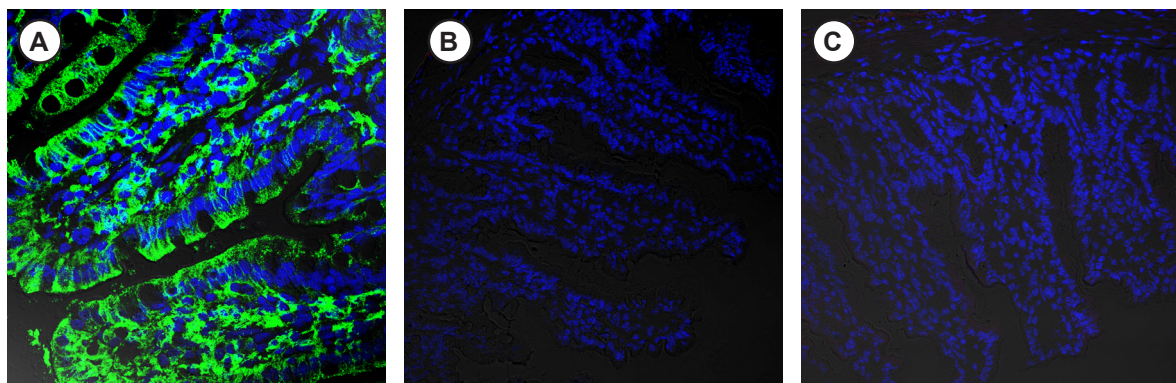


Abb.7: Antikörpertest für den IgG1 anti-MHC II-Antikörper an Ileumgewebe von C57/129SvEv-Mäusen Verdünnung 1:100 für den Primär- und 1:400 für den Sekundärantikörper A Zellkerne (blau), spezifische Markierung des MHC II (grün); B Die Isotypkontrolle zeigte keine unspezifische Markierung C Negativkontrolle ohne unspezifische Markierungen

#### 3.2.2 MHC II-Expression im Darmgewebe gesunder C57/129SvEv-Mäuse

Die Expression der MHC II-Komplexe zeigt sich durch positive Markierungen des Epithels von Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon. Das Expressionsmuster der einzelnen Darmsegmente unterscheidet sich dabei. Im Duodenum stellt sich das Epithel der Zottenbasis sowie der Krypten ohne Markierung dar, während Jejunum und Ileum in diesen Bereichen markierte IECs

aufwiesen. Im Colon zeigten sich nur vereinzelt gefärbte Abschnitte vornehmlich des Oberflächenepithels (s. Abb.7 A-D). Die MHC II-Färbung der IECs erschien supranukleär sowie basolateral mit granulärem Charakter.

Weiterhin ergaben sich positive Markierungen von Zellen der LP sowie Submukosa und Subserosa in allen Lokalisationen. Innerhalb der Muskelschicht wiesen einzelne Zellen Fluoreszenz auf. Die Muskelzellen blieben dabei unmarkiert. Negativkontrollen der MHC II-Färbung zeigten durchgehend keine unspezifischen Markierungen (nicht dargestellt).

#### MHC II-Markierung – gesunde C57/129SvEv-Mäuse

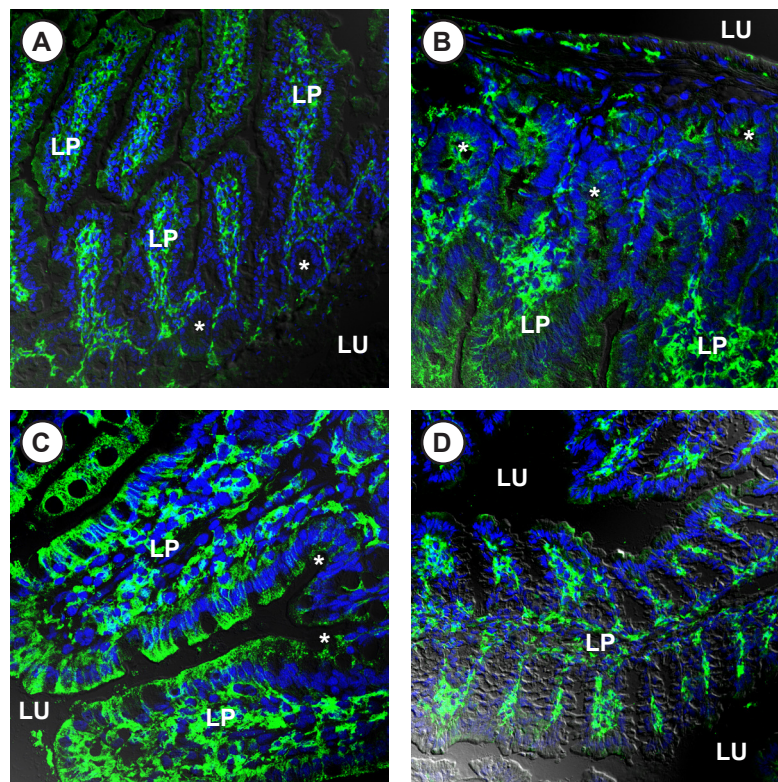


Abb.8: Immunfluoreszenzmarkierung der MHC II-Komplexe an Gewebe von C57/129SvEv-Mäusen  
A Duodenum, B Jejunum, C Ileum, D Colon

Die Lokalisation der MHC II-Komplexe (grün) kam in Epithelzellen aller Darmetagen zur Darstellung. Das Epithel der Zottenspitzen wies Färbungen in Duodenum, Jejunum und Ileum auf. Im Jejunum und Ileum waren zusätzlich auch die Zottenbasis- und Krypten-IECs markiert. Im Colon zeigten sich nur vereinzelt Abschnitte mit Markierungen der MHC II-Komplexe im Oberflächenepithel. Die IEC-Färbungen erschienen granulär, supranukleär und basolateral. Markierungen aller anderen Schichten der Darmwand waren eruiert. LP (Lamina propria), LU (Lumen), \* kennzeichnet die Krypten

#### 3.2.3 MHC II- Expression im Darmgewebe gesunder BALB/c-Mäuse

Eine MHC II-Markierung erschien auch bei den BALB/c-Mäusen in IECs des Duodenums, Jejunums, Ileums und Colons. Im Duodenum und Jejunum dominierten Färbungen im Bereich der Zottenspitzen, während sie im Ileum zudem an der Zottenbasis und in den Krypten nachweisbar waren. Im Colon beschränkte sich die IEC-Markierung v.a. auf das Oberflä-

chenepithel. Sie stellte sich, wie bereits bei den C57/129SvEv-Mäusen, in allen Darmetagen, supranukleär sowie basolateral granulär dar.

LP, Submukosa, Subserosa und vereinzelt auch die Muskularis enthielten fluoreszenzmarkierte Zellen (s. Abb. 8 A-D).

Die Negativkontrollen dieser Färbung ergaben keine unspezifischen Markierungen (nicht dargestellt).

MHC II-Markierung – gesunde BALB/c-Mäuse

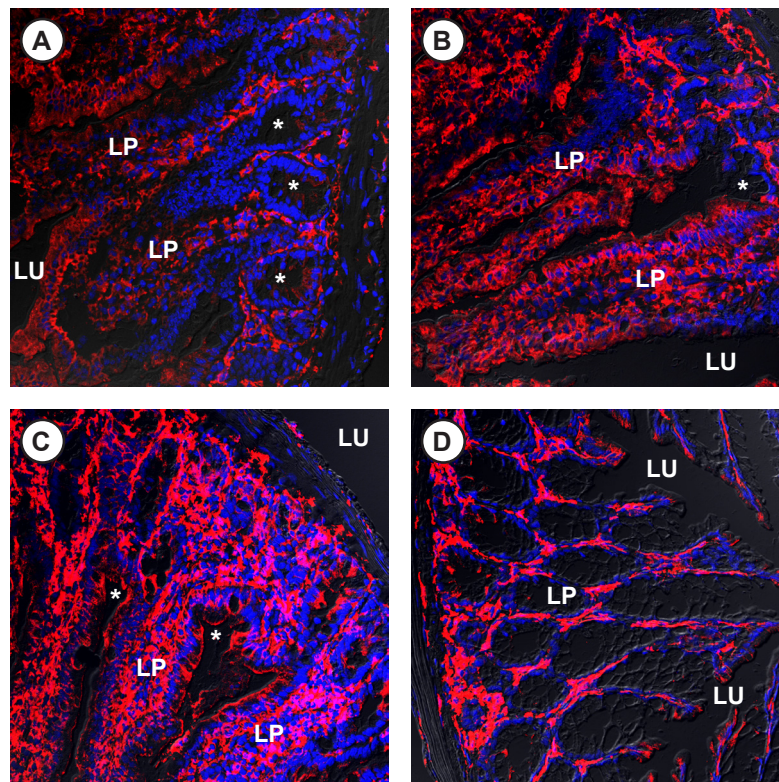


Abb.9: Immunfluoreszenzmarkierung der MHC II-Komplexe an Gewebe von BALB/c-Mäusen  
A Duodenum, B Jejunum, C Ileum, D Colon

MHC II-Komplexe (rot) konnten in allen Darmsegmenten dargestellt werden. Die Markierung zeigte sich in Zottenspitzen von IECs des Duodenums und Jejunums. Im Ileum waren zudem Zottenbasis- und Kryptenepithelzellen gefärbt, während das Colonepithel nur vereinzelte lumennahe Markierungen aufwies.

Fluoreszenzfärbungen von Zellen der LP, Submukosa, Muskularis und Subserosa bzw. Serosa waren eruiert. LP (Lamina propria), LU (Lumen), \* kennzeichnet die Krypten

Nach der erfolgreichen MHC II-Markierung aller Darmsegmente der eingesetzten, SPF gehaltenen C57- und BALB/c-Mäuse sollten weitere mögliche Ursachen für die fehlende MR-Markierung ausgeschlossen werden. Dazu wurde zunächst der Einfluss der Gewebekolonisierung überprüft.

### 3.3 Einfluss der Gewebekolonisierung auf die Mannoserezeptor- und MHC II-Expression

Bisher wurde Darmgewebe zweier genetischer Stämme untersucht. Dabei konnten keine Markierungen im Epithel festgestellt werden. Beide genetische Linien wurden unter SPF Bedingungen gehalten und stammten aus unterschiedlichen Tierställen. Ihre Darmflora unterscheidet sich von der konventionell kolonisierter Tiere.

Um den Einfluss der Kolonisierung des Darms mit physiologischen Darmbakterien auf die MR-Expression zu untersuchen, wurden in den folgenden Experimenten NMRI-Mäuse eingesetzt. Wir erhielten dazu, durch die Kooperation mit dem DKFZ in Heidelberg, die Möglichkeit, keimfreie mit kolonisierten NMRI-Mäusen direkt zu vergleichen.

Mikrobiotastimulieren eine regelmäßige Rezeptorexpression durch APZ. Daher konnte geprüft werden, ob die MR-exprimierenden Zellen die MR konstitutiv bilden oder ob es möglicherweise erst durch die bakterielle Stimulation exprimiert wird.

Es wurden Jejunum, Ileum und Colon fünf verschiedener kolonisierter NMRI-Mäuse untersucht und mit keimfreien Tieren dieses Stammes in unterschiedlicher Fallzahl pro Darmabschnitt (s. 2.3 Tabelle 2) verglichen.

Die keimfrei gehaltenen NMRI-Mäuse wiesen keine Markierung des Epithels auf. Eine spezifische Markierung des MR zeigte sich äquivalent zu den bisherigen Ergebnissen der C57- und BALB/c-Mäuse. Es stellte sich eine Färbung von Zellen der LP, Submukosa und Subserosa mit vereinzelt markierten Zellen der Muskelschicht dar (s. Abb. 9 A-C).

Auch bei den konventionell kolonisierten Tieren ließ sich keine Epithelmarkierung eruieren. Wie bei den Tieren der Stämme C57/129SvEv- bzw. BL/6 und BALB/c zeigte sich hingegen eine Anfärbung von Zellen der LP, Submukosa und Subserosa sowie vereinzelt Markierung von Zellen der Muskelschicht (welche nicht den Muskelzellen entsprechen), in allen Segmenten (s. Abb. 10 A-C).

Negativkontrollen beider Einfachmarkierungen zeigten keine unspezifische Färbung (nicht dargestellt).

MR-Markierung – keimfreie NMRI-Mäuse

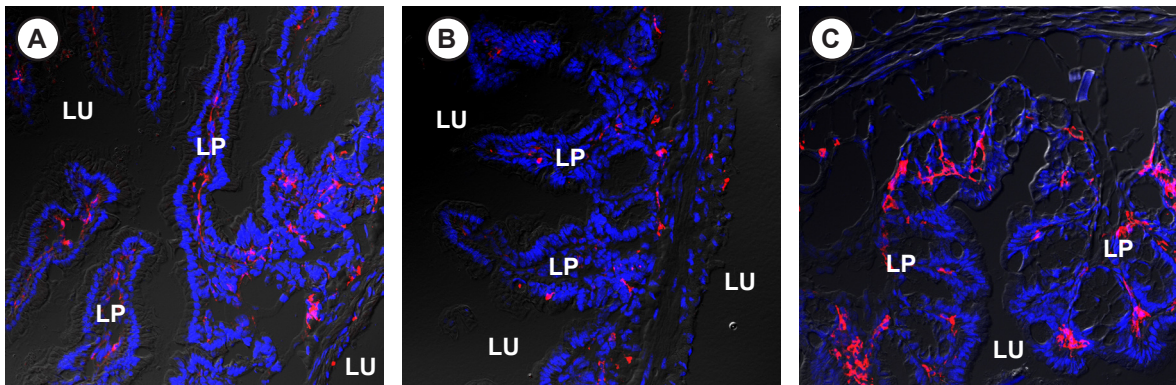


Abb.10: Immunfluoreszenzmarkierung des MRs an Gewebe von keimfreien NMRI-Mäusen

A Jejunum, B Ileum, C Colon

Die Zellkerne wurden mit dem Höchstfarbstoff (blau) dargestellt. Das Epithel enthielt durchgehend keine Markierungen. Eine Anfärbung des MRs (rot) zeigte sich in der LP, Submukosa und Subserosa in jedem der drei Darmabschnitte. Vereinzelt ließen sich Markierungen von Zellen innerhalb der Muskelschicht ausmachen. LP (Lamina propria), LU (Lumen)

MR-Markierung – kolonisierte NMRI-Mäuse

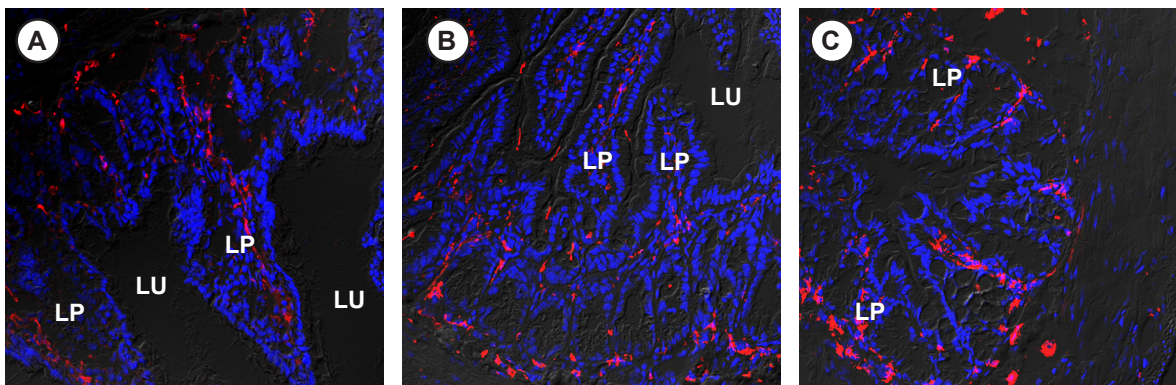


Abb.11: Immunfluoreszenzmarkierung des MRs an Gewebe von kolonisierten NMRI-Mäusen

A Jejunum, B Ileum, C Colon

Die Zellkerne wurden mit dem Höchstfarbstoff (blau) dargestellt. Das Epithel wies keine Färbung auf. Die MR-Expression zeigte sich durch eine spezifische Zellmarkierung (rot) in den Schichten LP, Submukosa und Subserosa sowie vereinzelt in der Muskelschicht.

LP (Lamina propria), LU (Lumen)

Zur Kontrolle des Stimulationszustandes des Epithels wurde auch für das Gewebe der NMRI-Mäuse eine MHC II-Färbung durchgeführt. Diese ergab eine fehlende Epithelmarkierung der keimfreien NMRI-Mäuse in allen Abschnitten. Zellen der LP, Submukosa und Subserosa von Jejunum, Ileum und Colon wiesen jedoch Markierungen auf (s. Abb.11 A und B, Colon nicht dargestellt).

MHC II-Markierung- keimfreie NMRI-Mäuse

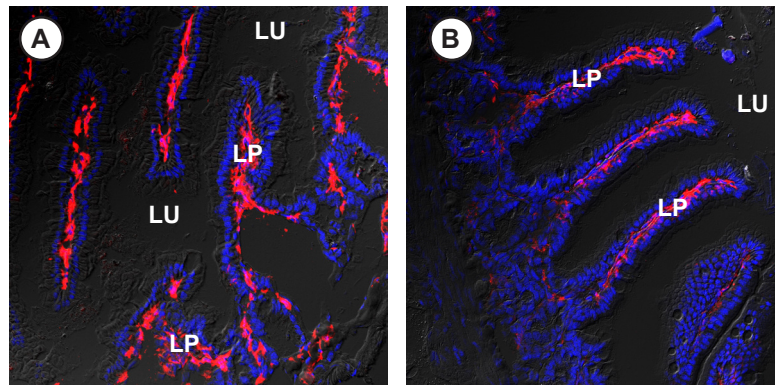


Abb.12: Immunfluoreszenzmarkierung der MHC II-Komplexe an Gewebe von keimfreien NMRI-Mäusen  
A Jejunum, B Ileum

Eine Epithelmarkierung der MHC II-Komplexe war in keinem der Darmabschnitte nachweisbar. In der LP, Submukosa, Subserosa und Serosa des Jejunums und Ileums konnte eine MHC II-Expression durch Anfärbung der Komplexe (rot) dargestellt werden.

LP (Lamina propria), LU (Lumen)

MHC II-Markierung - kolonisierte NMRI-Mäuse

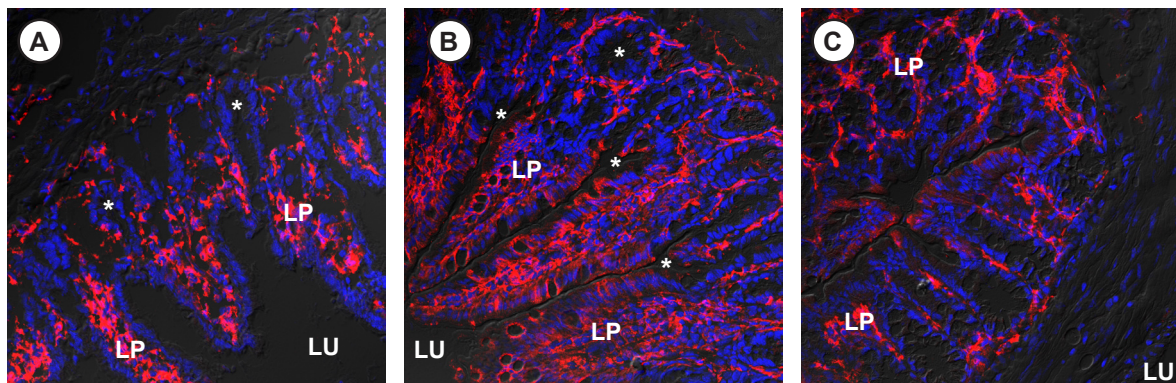


Abb.13: Immunfluoreszenzmarkierung der MHC II-Komplexe an Gewebe von kolonisierten NMRI-Mäusen

A Jejunum, B Ileum, C Colon

Die MHC II-Expression (rot) zeigte sich in Zellen aller Schichten der Darmwand. Dabei erschien die Epithelmarkierung des Ileums in Zotten und Krypten. Das Jejunum wies vereinzelte Epithelfärbungen der Zotten auf, welche sich im Colon etwas häufiger zeigten.

LP (Lamina propria), LU (Lumen), \* kennzeichnet die Krypten

Die MHC II-Bildung der kolonisierten NMRI-Mäuse zeigte sich wie in den zuvor untersuchten Darmgewebeproben der C57- und BALB/c-Tiere durch positive Markierungen in Zellen aller Etagen des Darms. Im Jejunum waren IECs der Zottenspitze und im Ileum IECs der Zottenspitze, -basis sowie der Krypten markiert. Im Colon ließen sich Färbungen des Oberflächenepithels erkennen. Zellen der LP, Submukosa sowie Subserosa wiesen MHC II-Markierungen auf. (s. Abb.12 A-C). Die Negativkontrollen der MHC II-Färbungen sowohl der kolonisierten als auch der keimfreien NMRI-Mäuse ergaben keinerlei unspezifische Markierungen (nicht dargestellt).

Die bisher durchgeführten Experimente an gesundem Dün- und Dickdarmgewebe adulter Mäusedreier unterschiedlicher Genfamilien ließen immunhistochemisch unabhängig vom Kolonisierungszustand des Gewebes keine MR-Expression durch IECs erkennen. Es wäre denkbar, dass sich die MR-Expression unter proinflammatorischer Stimulation differenzieren zu den bisherigen Ergebnissen darstellt. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte die Durchführung weiterer Versuche an entzündetem Dün- sowie Dickdarmgewebe.

### 3.4 Mannoserezeptor und MHC II-Expression in Dün- und Dickdarmgewebe entzündeter Mäuse

Die Hauptmanifestationsorte der CED sind das Ileum beim MC und das Colon bei der CU. Kennzeichnend für beide Erkrankungen ist eine übermäßige Aktivierung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>-Zellen. Eine gesteigerte Sekretion von Entzündungsmediatoren, wobei u.a. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  dominieren, ist die Folge.

Ob es durch proinflammatorische Stimuli zu einer Hochregulation der MR-Bildung und in diesem Zuge auch zu einer Expression durch IECs kommt, wurde bisher noch nicht beschrieben. Um dieser Unerkenntnis entgegenzutreten, wurden fünf verschiedene Tiermodelle untersucht, um sie mit den gesunden Kontrollen zu vergleichen.

Die TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse mit Ausbildung einer terminalen Ileitis dienten der Untersuchung des Dünndarms, die C57BL/6-cDSS-Mäuse mit Ausbildung einer Colitis wurden zur Untersuchung des Dickdarms ausgewählt.

#### 3.4.1 Klinische Zeichen der Entzündung der TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse

Die TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse zeigten Durchfälle, Gewichtsverluste und Gelenkschwellungen der Vorder- und Hinterpfoten sowie damit verbundene Bewegungseinschränkungen als klinische, makroskopische Zeichen der Entzündung. Nach ihrer Tötung wurden die gewonnenen Dünndarmgewebeschnitte mit Hämalau-Eosin-Färbung behandelt, um die histologischen Zeichen der Entzündung zu dokumentieren.

#### 3.4.2 Histologische Zeichen der Entzündung im Dünndarmgewebe der TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse

Bei der Betrachtung der Schnitte unter dem Mikroskop war eine Infiltration der Mukosa, Submukosa und tieferer Wandschicht durch Entzündungszellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen sichtbar. Hinzu kam eine vergrößerte Anzahl an Lymphfollikeln sowie eine Ballonierung und Verplumpung der Dünndarmzotten (s. Abb. 8). Zudem waren wenige, nicht-verkäsende Granulome erkennbar.

## HE-Färbung Ileum gesund und entzündet

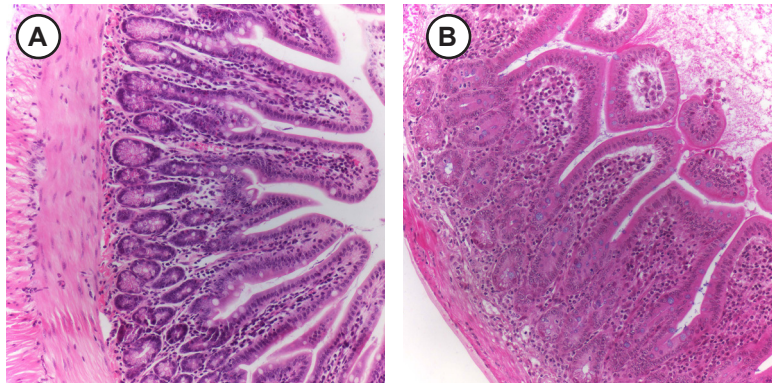


Abb.14: HE-Färbung von Ileumgewebe gesunder Kontrollen und entzündeter TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse  
A gesund, B entzündet

Im Gegensatz zum gesunden Dünndarm stellen sich die Zotten des entzündeten Gewebes verbreitert und abgeflacht dar. Zahlreiche Entzündungszellen finden sich in allen Wandschichten.

Nach der makroskopischen sowie mikroskopischen Überprüfung der Entzündung im Dünndarmgewebe wurde die MR-Markierung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die MHC II-Färbung, deren Ergebnisse weitere Hinweise auf eine statthafte Inflammation liefern sollten.

### 3.4.3 Mannoserezeptor und MHC II-Expression im Dünndarmgewebe der TNF $\Delta$ ARE/WT-Mäuse

Proinflammatorische Stimuli in entzündetem Gewebe könnten möglicherweise die MR-Expression durch IECs positiv beeinflussen.

Die Immunfluoreszenzfärbung des MRs des entzündeten Ileumgewebes zeigte jedoch ebenso keine Markierung der IECs, wie es schon im Gewebe der gesunden Mäuse der Fall war. Durch die Markierung von Zellen der LP sowie Submukosa, Muskularis und Subserosa stellte sich die MR-Expression in diesen Gewebsschichten äquivalent zu den Färbungen des gesunden Ileumgewebes dar (s. Abb. 9 A).

Die MHC II-Markierung war dagegen im Epithel und auch in den anderen Wandschichten positiv (s. Abb. 9 B). Sie erschien durch Färbungen der IECs in den Zotten und Krypten in vornehmlich supranukleärer und basolateraler Lokalisation mit granulärem Charakter. Zudem waren Zellmarkierungen der LP, Submukosa, Subserosa eruierbar.

Die Negativkontrollen ließen keine unspezifische Färbung erkennen (nicht dargestellt).

MR- und MHC II-Markierung - TNFΔARE/WT-Mäuse

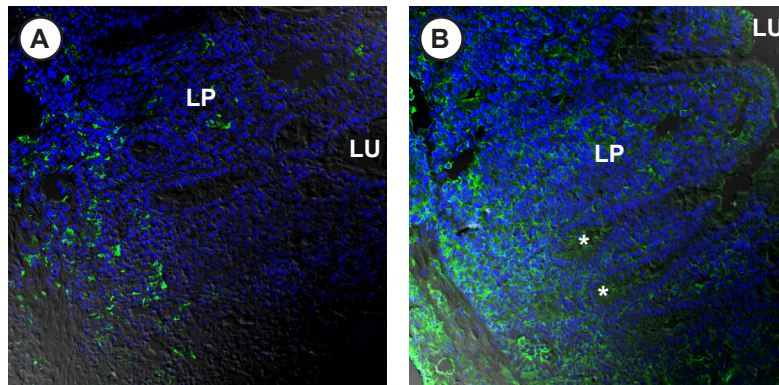


Abb.15: Immunfluoreszenzmarkierung des MRs und der MHC II-Komplexe an Ileumgewebe von entzündeten TNFΔARE/WT-Mäusen

A Das Epithel blieb unmarkiert. Eine MR-Expression zeigte sich durch Färbungen (grün) im Bereich der LP, Submukosa, Muskelschicht (vereinzelt Zellen) und Subserosa.  
 B Eine MHC II-Expression erschien durch Markierungen (grün) innerhalb aller Darmwandschichten. IECs der Zotten und Krypten waren v.a. supranukleär sowie basolateral granulär gefärbt.  
 Die Zellkerne wurden mit dem Höchstfarbstoff (blau) dargestellt  
 LP (Lamina propria), LU (Lumen), \* kennzeichnet die Krypten

Die bisher beobachtete fehlende epitheliale Expression des MRs stellt sich auch in entzündetem Dünndarmgewebe unverändert dar. Dieser Sachverhalt sollte im Folgenden zusätzlich für entzündetes Dickdarmgewebe überprüft werden.

3.4.4 Klinische und histologische Zeichen der Entzündung im Dickdarmgewebe der C57BL/6-cDSS Mäuse

Neben der klinischen Begutachtung der Tiere wurde ihre Krankheitsaktivität zusätzlich mit Hilfe des „modified Disease Activity Index“ (mDAI) eingeschätzt (s. Tabelle 6). (Zur Erhebung des mDAI s. Kapitel 2.2)

Tabelle 6: modified Disease Activity Index am 30. Lebenstag

Tier	mDAI Tag 30
cDSS28	2
cDSS29	2
cDSS36	4
cDSS37	8
cDSS39	7

Das Gewebe wurde zudem histologisch untersucht. Ein histologischer Index der Colitis wurde angefertigt (s. Tabelle 7).

Die Begutachtung der angefertigten HE-Schnitte von Biopsien des distalen Colons ließ Zeichen der Entzündung in Form einer Infiltration mit Entzündungszellen wie Makrophagen,

Lymphozyten und Plasmazellen erkennen. Zudem erschienen Bereiche mit Epithelverlust und Ulzerationen.

In der folgenden Abbildung (Abb.10) sind die genannten Veränderungen im Vergleich zu gesundem Gewebe dargestellt.

HE-Färbung Colon gesund und entzündet

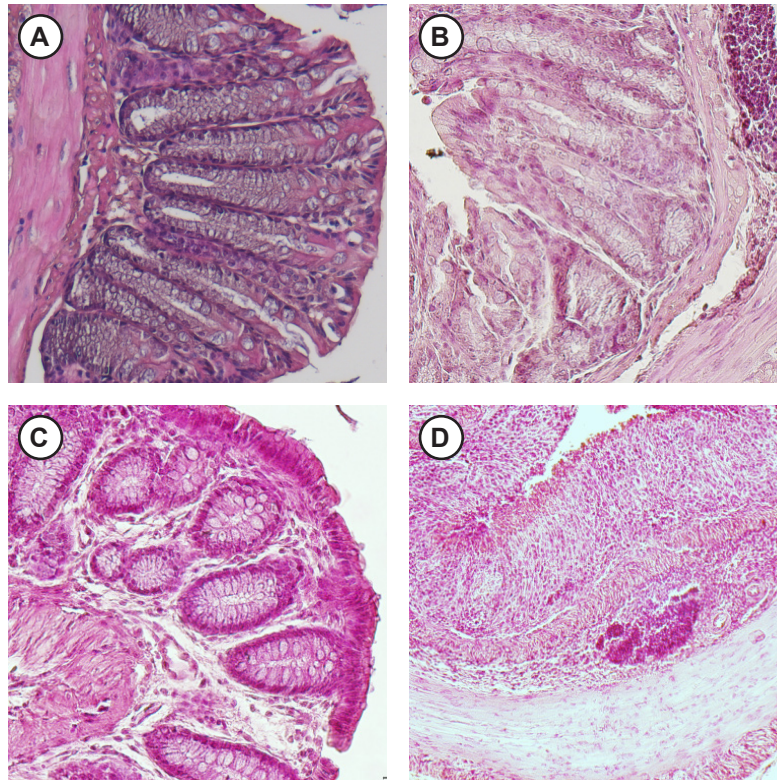


Abb.16: HE-Färbung von Colongewebe gesunder Kontrollen und entzündeter C57BL/6-cDSS-Mäuse  
 A gesund B, C und D entzündet  
 Das Gewebe der C57BL/6-cDSS-Mäuse zeigt eine deutliche Infiltration durch Entzündungszellen z.T. unter Einbeziehung der tieferen Wandschichten (Muskularis und Subserosa) (D) mit Aufweitung der LP. Zudem finden sich erosive Veränderungen des Epithelverbandes.

Die Erhebung des histologischen Index der Dickdarmentzündung ist in Tabelle 7 dargestellt (zur Erhebung des histologischen Index s. Kapitel 2.8).

Tabelle 7: Histologischer Index der C57BL/6-cDSS Tiere

Tier	Punkte Infiltration durch Entzündungszellen	Punkte Gewebeschaden	Gesamtpunktzahl
cDSS28	2	1	3
cDSS29	2	1	3
cDSS36	2	2	4
cDSS37	1	0	1
cDSS39	2	0	2

Nach der Erhebung der Daten hinsichtlich des Entzündungszustandes im Dickdarmgewebe konnte die MR-Markierung erfolgen. Die ebenfalls durchgeführte MHC II-Färbung diente der weiteren Verifizierung der inflammatorischen Stimulation des Gewebes.

### 3.4.5 Mannoserezeptor- und MHC II-Expression im Dickdarm der C57BL/6-cDSS-Mäuse

Die Immunfluoreszenzfärbung des Dickdarmgewebes der C57BL/6-cDSS-Tiere ergab erneut keine Markierung des Epithels für den MR, während Zellen der LP, Submukosa, Muskelschicht und Subserosa eine Färbung zeigten (s. Abb. 11 A). Das Ergebnis erschien somit analog zu dem der gesunden C57-Mäuse.

Die MHC II-Markierung zeigte eine Färbung von Zellen aller Schichten bis auf die Serosa (s. Abb. 11 B). So waren Markierungen der IECs v.a. im Oberflächenepithel aber auch im Kryptenbereich nachweisbar. Ebenso fanden sich Zellfärbungen der LP, Submukosa sowie Subserosa. Negativkontrollen blieben ohne unspezifische Markierung (nicht dargestellt)

#### MR- und MHC II-Markierung - C57BL/6-cDSS-Mäuse

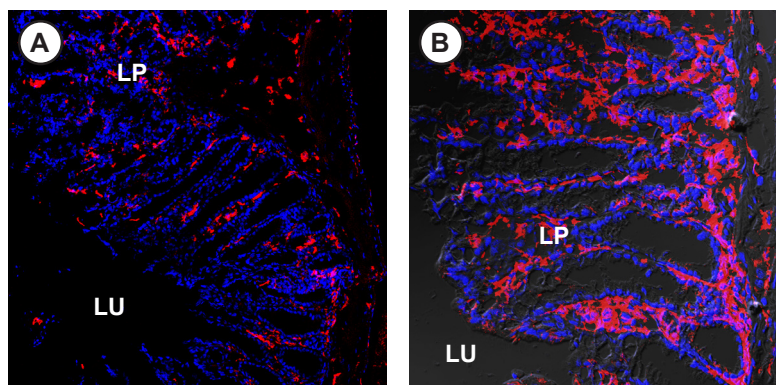


Abb.17: Immunfluoreszenzmarkierung des MRs und der MHC II-Komplexe an Colongewebe von entzündeten C57BL/6-cDSS-Mäusen

A Das Epithel zeigte keine Markierung. Eine MR-Expression wurde durch Färbungen (rot) von Zellen im Bereich der LP, Submukosa, vereinzelt in der Muskularis und Subserosa erfasst.

B Eine MHC II-Expression wurde durch Markierungen (rot) innerhalb aller Wandschichten bis auf die Serosa dargestellt. Das Epithel zeigt v.a. in den lumennahen Bereichen Anfärbungen. Zum Teil waren zudem Markierungen von Krypten-IECs erkennbar. Zellen der LP, Submukosa, vereinzelt Zellen innerhalb der Muskularis sowie der Subserosa konnten gefärbt werden. Die Zellkerne wurden mit dem Höchstfarbstoff (blau) dargestellt.

LP (Lamina propria), LU (Lumen)

Zusammengefasst war keine MR-Expression durch IECs eruierbar. Dieser Sachverhalt stellte sich unabhängig von Lokalisation, genetischem Hintergrund sowie Gewebekolonisierung dar und konnte auch durch den Einfluss einer Inflammation nicht verändert werden.

## 4 DISKUSSION

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, weisen eine charakteristische Epithelbarrierestörung mit erhöhter bakterieller Penetration auf. Diese führt zu einem gesteigerten Antigenangebot und mündet in einem Toleranzverlust mit Interruption des intestinalen Gleichgewichts. Typisch dafür ist eine überschießende Aktivierung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> effektorischer T-Zellen.

In ihrer Funktion als nicht klassische APZ nehmen IECs dabei, unter anderem über die Stimulation von regulatorischen und effektorischen T-Zellen, Einfluss auf die Homöostase des Darms. Durch die Aktivierung von T-Effektor-Zellen leisten sie ihren Beitrag zur Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der CED.

### 4.1 Hintergrund der Hypothesengenerierung

#### 4.1.1 Gesteigerte Zahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Störung der intestinalen Homöostase wird neben anderen Veränderungen durch eine gesteigerte Zahl effektorischer T-Zellen charakterisiert. Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) sind unter physiologischen Bedingungen nur in kleiner Zahl vorhanden. Erst durch die Antigenerkennung über ihren TCR werden sie zur klonalen Expansion stimuliert (72). Indem sie zytolytische Granula mit z.B. Perforin und Granzymen entleeren, welche die Apoptose der Zielzellen initiieren, nehmen sie ihre zytotoxische Funktion auf. Über die Sekretion von IFN- $\gamma$  können sie Makrophagen aktivieren und die Abtötung intrazellulärer Bakterien bewirken, ohne die Zelle selbst zu zerstören (45).

Eine gesteigerte Zahl zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (sowie CD4<sup>+</sup>-Zellen) in Darmgewebebiopsien (terminales Ileum und Colon) von CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnte durch Müller et al. nachgewiesen werden. Dies gelang durch die In-situ-Hybridisierung und FACS-Analyse von isolierten humanen Lymphozyten der LP (Lamina propria Lymphozyten, LPL) sowie epithelständiger Lymphozyten (intraepitheliale Lymphozyten, IEL). Erhöhtes RNA Level von Granzym A und Perforin ließen sich auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückführen. Diese Zellener schienen im Gewebe der CED-Patienten (in beiden Darmsegmenten) nach immunhistochemischer Färbung in hoher Zahl im lumennahen Teil der Krypten (IEL) und der LP (LPL) (59).

Die gezeigte Aktivierung der CD8<sup>+</sup>T<sub>eff</sub> trägt u.a. über den Toleranzverlust zu einer Aufrechterhaltung der Entzündung bei. Der Toleranzverlust stellte sich in den Experimenten von Chung et al. durch eine inaktivierte Zytolyse in murinem Gewebe dar. Sie wurde durch OVA-spezifische

CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach oraler OVA-Gabe, in Verbindung mit der Injektion eines CD40-stimulierenden Antikörpers, initiiert. Das Modellantigen OVA wird durch APZ (DCs, Makrophagen) mittels „cross presentation“ CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargeboten. Die orale Applikation dieses Antigens bewirkt dabei normalerweise eine Toleranzinduktion, welche in diesen Experimenten durch die CD40-Stimulation ausblieb (17).

Die Bedeutung CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen für die Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen konnte durch Forschung der Arbeitsgruppe von Nancey et al. ebenfalls unterstrichen werden. Sie zeigten in einem *in vivo* Mausmodell, dass antigenspezifische zytotoxische T-Zellen in der Lage sind eine rezidivierende Colitis zu induzieren (61).

Auf Grundlage dieser Daten, kann davon ausgegangen werden, dass CD8<sup>+</sup> effektorische T-Zellen eine wichtige Rolle in der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von CED einnehmen.

Die in der oben angeführten Arbeit von Müller et al. gefundene, epithelnahe Lokalisation der CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub> legt einen Einfluss der IECs auf diese T-Zell-Populationen nahe (35, 59). Eine Möglichkeit dieser Einflussnahme bestünde in der IEC-vermittelten Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen via „cross presentation“.

#### 4.1.2 CD8<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch Intestinale Epithelzellen

Die Hypothese der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch IECs konnte durch den Nachweis einer Interaktion dieser Zellen in anderen Forschungsarbeiten gestützt werden. Die *in vitro* Experimente von Arosa et al. zeigten eine Interaktion zwischen IECs und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen in der Zellkultur. Die Inkubation CD8<sup>+</sup> peripherer T-Lymphozyten mit *ex vivo* gewonnenen humanen IECs initiierte neben einer gesteigerten T-Zell-Zahl auch eine Veränderung des Phänotyps dieser Zellen von CD28<sup>+</sup> zu CD28<sup>-</sup> (2).

Bisping et al. konnten mit Hilfe eines humanen Zellkulturmodells und FACS-Analysen nachweisen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch IECs stimuliert werden. Dazu wurden *ex vivo* gewonnene, periphere T-Lymphozyten aus dem Blut von CED-Patienten (sowie gesunden Spendern) sowohl mit IECs der Caco2-Zelllinie als auch mit direkt isolierten IECs inkubiert. Diese Epithelzellen wurden aus entzündetem bzw. gesundem Human Gewebe der Colonkrypte gewonnen. Nach der Inkubation mit den IECs ließ sich ein signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen der CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen.

Der *in vitro* Nachweis dieser Interaktion zwischen IECs und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit proinflammatorischer Wirkung konnte sowohl für MC als auch für CU ohne signifikante Unterschiede erbracht werden. Im Gegensatz dazu zeigten periphere T-Lymphozyten gesunder Kontrollen keinen Sekretionsanstieg von IFN- $\gamma$  durch die epitheliale Stimulation.

Der Einsatz eines murinen MHC I-Antikörpers lieferte einen wichtigen Hinweis darauf, dass die T-Zell-Stimulation durch IECs auf einer direkten MHC I-abhängigen Zell-Zell-Interaktion beruhen könnte. Nach der MHC I-Blockade in der Zellkultur war ein Ausbleiben der, in den vorherigen Experimenten beobachteten Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion zu verzeichnen (4). Diese Daten stützen die Hypothese, dass effektorische CD8<sup>+</sup> Lymphozyten durch IECs aktiviert werden können. Die Hinweise auf eine MHC I-Beteiligung an dieser Interaktion, lassen denkbar erscheinen, dass die Stimulation der T-Zellen durch IECs via „cross presentation“ erfolgen könnte.

#### 4.1.3 CD8<sup>+</sup> T-Zell- Stimulation via „cross presentation“

Die „cross presentation“ ist der Vorgang bei dem exogene Antigene MHC I-gekoppelt zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden. Die Fähigkeit zur „cross presentation“ wird bisher v.a. DCs und Makrophagen als klassische APZ zugesprochen (72).

Für diese Art der Präsentation müssen aufgenommene Antigene einem von zwei möglichen Prozessierungswegen zugeführt werden (s. Kapitel 1.2.4). Dazu verbleiben sie nach ihrer Internalisierung entweder im EE oder verlassen es zur weiteren Verarbeitung.

Letztgenannter Weg konnte durch Forschungsarbeiten von Burgdorf et al. an murinen DCs und Knochenmarksmakrophagen mit Hilfe des Modellantigens OVA in den vergangenen Jahren genau nachvollzogen werden. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzmarker für frühe (Rab5 und early endosomal antigen 1, EEA1) und späte Endosomen bzw. Lysosomen (Rab7, LAMP-1) konnte gezeigt werden, dass schon der Mechanismus der Antigenaufnahme den Prozessierungsweg determiniert. Der MR ist dabei der entscheidende Mediator, welcher das Antigen in einem frühen endosomalen Kompartiment zuführt, dass sich von den Lysosomen des endozytischen Weges unterscheidet. Damit ermöglicht er den Eintritt in den Verarbeitungsweg für die „cross presentation“ (s. Abb. 18) (13, 14).

In Versuchen mit DCs MR-defizienter C57/BL6-Mäuse erwies sich der MR dabei als unverzichtbar für die „cross presentation“ löslicher Antigene (z.B. OVA), während für die „cross presentation“ zellassoziierter Antigene weitere Mechanismen existieren müssen (15).

Wie anfangs beschrieben konnte nachgewiesen werden, dass auch IECs die erforderlichen strukturellen Gegebenheiten für diese Art der Prozessierung besitzen (s. Kapitel 1.5.4). Eine gesteigerte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung durch IECs bei CED könnte demnach möglicherweise durch eine vermehrte „cross presentation“ dieser Zellen begründet sein.

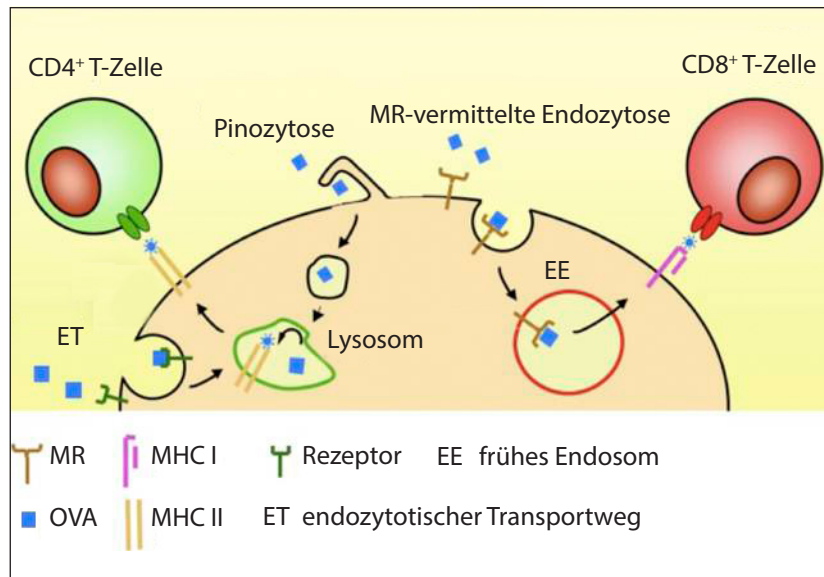


Abb.18: Vereinfachte Darstellung verschiedener Wege der Antigenpräsentation  
 links: klassischer endozytotischer Transportweg (vgl. Abb 2 Kapitel 1.2.4) zur MHC II- gebundenen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung  
 rechts: MR-vermittelte Antigenaufnahme und Zuführung des Antigens für die MHC I- gekoppelte CD8<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation („cross presentation“)

#### 4.1.4 Potentielle „cross presentation“ durch Intestinale Epithelzellen

Die Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> Zellen bedarf dreier Signale: der Bindung des antigenspezifischen TCRs an sein MHC I-gebundenes Antigen, der Interaktion costimulatorischer Moleküle wie CD86 mit ihrem Liganden und der Sekretion proinflammatorischer Zytokine. (38). Gewöhnliche Zellen des Gewebsverbandes sind allerdings nicht in der Lage diese drei Signale zu generieren. Ihnen fehlen costimulatorische Moleküle (19). Aus diesem Grund sind sie darauf angewiesen, dass APZ ihr zu präsentierendes Antigen internalisieren und für die T-Zell-Aktivierung darbieten.

IECs als nicht klassische APZ sind in der Lage, alle drei dieser Signale zu generieren. Die Expression costimulatorischer Moleküle, die Fähigkeit zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie die Möglichkeit Antigene wie z.B. OVA zu prozessieren und potentiell auch MHC I-gekoppelt darzubieten, konnte für IECs nachgewiesen werden (s. Kapitel 1.5.4). Ein denkbarer Weg der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung wäre daher die „cross presentation“ durch IECs. Dem MR wurde eine zentrale Rolle für die „cross presentation“ löslicher Antigene zugesprochen. Dieser Sachverhalt lässt die Vermutung zu, dass auch IECs möglicherweise diesen Rezeptor zur spezifischen Antigenaufnahme exprimieren könnten.

#### 4.1.5 Expression costimulatorischer Moleküle durch Intestinale Epithelzellen

Für die Antigenpräsentation durch IECs zur T-Zell-Aktivierung bedarf es neben Rezeptoren und costimulatorischen Signalen auch Molekülen zur Antigenanbietung. Zu den bereits nachgewiesenen gehören u.a. klassische MHC Moleküle der HLA Klasse I (z.B. HLA-E) und -II sowie die nicht klassischen MHC Proteine MR1, CD1d, MICA und MICB. Bisher bekannte costimulatorische Moleküle auf IECs sind u.a. CD58, CD80, CD86, und CD40 (29, 77).

Die beträchtliche Zahl diverser Oberflächenmoleküle ermöglicht eine vielfältige Kommunikation der IECs mit Zellen der Innaten (z.B. NK-Zellen über HLA-E) sowie der adaptiven Immunität (z.B.  $\gamma\delta$ T-Zellen über MICA/B). Sowohl stimulatorische als auch regulatorische Mechanismen der Immunantwort können folglich resultieren (69, 77).

Ein Teil dieser Moleküle wird konstitutiv gebildet und unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Bildung von MHC I- und II-Molekülen, welche im gesamten Intestinaltrakt konstitutiv, überwiegend an der basolateralen Membran der IECs, exprimiert und im Zuge der CED (bei gleichbleibender Lokalisation) hochreguliert werden (s. Kapitel 4.7.) (29, 52).

Das nichtklassische MHC-Protein MICA (MHC I polypeptid-related sequence A) wird ebenfalls konstitutiv durch IECs exprimiert. Allez et al. gelang es, die Hochregulation von MICA bei CED zu zeigen. Sie untersuchten aus makroskopisch entzündeten Darmgewebe biopsien isolierte IECs durch Flusszytometrie und verglichen sie mit gesunden Kontrollen (1).

Eine konstitutive Expression und Hochregulation von CD86 in Colonepithelzellen von CU-Patienten konnte durch Nakazawa et al. gezeigt werden. Dabei erwies sich  $\text{IFN-}\gamma$  in vitro Versuchen als Induktor der CD86-Expression durch Colonepithelzellen (60).

Andere Moleküle werden dagegen nicht grundlegend exprimiert. Ihre Bildung wird erst durch den Einfluss proinflammatorischer Zytokine initiiert. Ein Beispiel ist das Oberflächenprotein CD40, welches auch auf klassischen APZ und u.a. auf Endothelzellen zu finden ist. Seine enterozytäre Expression wurde durch Borchering et al. untersucht. Die Forschungsgruppe konnte durch immunhistochemische Färbungen an Gewebe eines umfangreichen CED-Patientenkollektivs nachweisen, dass die CD40-Expression durch IECs scheinbar streng auf entzündete Mukosaabschnitte bei MC und CU beschränkt ist (7). Durch den Einsatz der proinflammatorischen Zytokine  $\text{IFN-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$  gelang es eine Hochregulation des costimulatorischen CD40 auf verschiedenen Epithelzelllinien zu initiieren.

Das CD40-Protein bindet seinen Liganden CD40L. Dieser findet sich neben  $\text{CD4}^+$  T-Zellen auch auf  $\text{CD8}^+$  zytotoxischen T-Zellen. Die CD40/CD40L-Bindung bewirkt die Sekretion verschiedener Zytokine durch die IECs darunter IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 sowie  $\text{TNF-}\alpha$  und

führt zu einer Hochregulation weiterer costimulatorischer Moleküle z.B. CD80/86 sowie der MHC-Komplexe. Interessanterweise trägt das Signal der CD40/CD40L-Interaktion zur Stimulation von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (und CD4<sup>+</sup> Th-Zellen) bei (7, 17, 88). Diverse ExperimentemitttransgenenMausmodellenundmitCD40L-AntikörpernkonnendemCD40/CD40L-SystemeinewichtigeRolleinderPathogenesederexperimentellenColitisattestieren (17, 25). Die Expression von CD40 durch IECs sowie CD40L durch zytotoxische T-Zellen und die wichtige Rolle des CD40/CD40L-Interaktion in der Inflammation stützen unsere Hypothese. Die bestehenden Daten liefern einen weiteren Hinweis auf die Interaktion zwischen IECs und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie ihre besondere Funktion im Entzündungsgeschehen. Dabei könnte der MRA als Voraussetzung für die „crosspresentation“ an dieser Interaktion entscheidend beteiligt sein.

#### 4.1.6 Konstitutive und regulierte Rezeptorexpression durch Intestinale Epithelzellen

Bisher bekannte Rezeptoren, die den IECs zur Antigenerkennung zur Verfügung stehen, sind u.a. TLRs, NOD-like-Rezeptoren, polymerische Ig-Rezeptoren, CD23 Fc Rezeptor, DEC-205 und Gangliosid M1 (29, 55). Ein Teil dieser Rezeptoren wird durch inflammatorische Stimuli vermehrt exprimiert. Dazu gehören z.B. der TLR-3 und der CD23 Fc Rezeptor.

Der TLR-3 dient der Detektion viraler Doppelstrang RNA und kommt besonders häufig auf IECs des menschlichen Dün- und Dickdarms vor. Für diesen Rezeptor konnte mit Hilfe der Immunhistochemie eine konstitutive Expression sowie Hochregulation unter inflammatorischen Bedingungen der CED gezeigt werden (66).

Auch der CD23 Fc Rezeptor, welcher IgE registriert, wird von IECs gebildet. In Biopsien von CED-Patienten konnte eine Hochregulation dieses Rezeptors durch immunhistochemische Färbungen verzeichnet werden (34). Ebenso gelang es anderen Forschungsgruppen, die vermehrte Expression diverser Oberflächenproteine der IECs unter proinflammatorischen Bedingungen zu verifizieren. Dazu gehören z.B. der Transferrinrezeptor und das MRP1 (multidrug resistance-associated-protein 1). In beiden Arbeitsgruppen wurde eine Hochregulation der untersuchten Proteine u.a. durch Fluoreszenzmarkierungen an Humangewebe von CED-Patienten beobachtet (5, 26).

Wie oben beschrieben, besitzen IECs eine ganze Reihe von Rezeptoren, deren Expression durch den Einfluss proinflammatorischer Mediatoren, welche auch bei CED vermehrt sezerniert werden, reguliert wird. Der MR könnte ein weiteres Oberflächenprotein auf IECs sein, welches einer solchen Regulation unterliegt. Seine Expression und Hochregulation durch Makrophagen und DCs unter entzündlichen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden.

## 4.2 Regulierte Mannoserezeptorexpression durch klassische Antigen-präsentierende Zellen

### 4.2.1 Mannoserezeptorexpression durch Makrophagen unter inflammatorischer Stimulation

Intestinale Epithelzellen stimulieren  $T_{\text{eff}}$  unter entzündlichen Bedingungen der CED potenter als im gesunden Zustand. Die mögliche Expression des MRs durch IECs könnte damit in Zusammenhang stehen. Unter der Voraussetzung einer MR-Expression hielten wir es für möglich, dass der Rezeptor entweder konstitutiv gebildet und unter entzündlichen Bedingungen hochreguliert wird oder proinflammatorische Stimuli der CED seine Expression initiieren. Zur MR-Expression anderer Zellen unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren existieren bisher wenige Daten. Einige Arbeiten zeigen, dass die MR-Synthese in Makrophagen durch  $\text{IFN-}\gamma$  und LPS gehemmt wird, während sie durch IL-4 und IL-13, gesteigert werden kann. Paradoxe Weise wurde ebenfalls eine gesteigerte MR-Bildung durch Makrophagenstimulation mit antiinflammatorisch wirksamen IL-10 beobachtet. Ebenso scheinen Glukokortikoide, welche auf Grund ihrer entzündungshemmenden Wirkung auch in der CED-Therapie zum Einsatz kommen, die MR-Expression positiv zu beeinflussen (51, 86).

Eine gesteigerte Konzentration der Interleukine IL-4 und IL-13 welche auch bei CU vermehrt vorkommen, war auch in unserem Mausmodell zu erwarten (Büning unveröffentlichte Daten). Stein et al. untersuchten in einem in vitro Modell den Einfluss des IL-4 auf die MR-Expression isolierter, muriner Peritonealmakrophagen (82). Martinez-Pomares et al. arbeiteten ebenfalls mit diesen Zellen in der Durchflusszytometrie und Western Blot (s. Kapitel 2.9 und 4.2) (51). In beiden Arbeitsgruppen führte die Stimulation der Makrophagen durch IL-4 zu einer erhöhten MR-Expression. Doyle et al. erforschten den Einfluss von murinem IL-13 auf Peritonealmakrophagen. In den Experimenten der Forschungsgruppe zeigte sich eine gesteigerte MHCII- und MR-Expression durch Makrophagen (22).

Nicht nur für Makrophagen, sondern auch für MR-exprimierende DCs konnte bis dato ein Einfluss proinflammatorischer Mediatoren gezeigt werden.

### 4.2.2 Mannoserezeptorexpression durch dendritische Zellen unter inflammatorischer Stimulation

Andere Forschungsgruppen lieferten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Inflammation und MR-Expression, indem sie  $\text{MR}^+$  DC-Subpopulationen nachwiesen, deren Zahl unter entzündlicher Stimulation anstieg bzw. deren Vorkommen auf entzündliche Erkrankungen beschränkt war. Wollenberg et al. fanden einen  $\text{MR}^+$  DC-Subtyp in entzündlich veränderter

Haut bei atopischer Dermatitis und Psoriasis, welcher in gesunder Haut nicht nachweisbar war (96).

Mc Kenzie et al. registrierten eine erhöhte Anzahl einer MR-exprimierenden murinen DC-Population in peripheren LK unter dem Einfluss des TLR-Agonisten Flagellin (54). Die Arbeitsgruppe konnte durch die s.c. Immunisierung von Mäusen mit einem spezifischen MR-Liganden zeigen, dass eine Antigenaufnahme über den MR zu einer gesteigerten Immunantwort führt, wenn das Immunsystem mit bakteriellen Oberflächenstrukturen (z.B. Flagellin) stimuliert wird. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie gelang es der Forschungsgruppe neben der MR-Expression auch MHC II, CD40, CD86 und CD11c (ein DC-Markerprotein) auf der Oberfläche dieser DCs nachzuweisen. Die Coexpression von MHC II, CD86 und CD40 durch diesen DC-Subtyp als klassische APZ ist eine Parallele zum Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle auf IECs (unter inflammatorischer Stimulation) als nichtklassische APZ. Dieser Sachverhalt liefert ein weiteres Indiz für eine möglicherweise konstitutive und regulierte oder durch entzündliche Mediatoren initiierte MR-Expression durch IECs.

Unter der Voraussetzung der MR-Expression wäre es hypothetisch möglich, dass durch IECs internalisierte luminale Antigene dem Prozessierungsweg für die „crosspresentation“ zugeführt werden könnten. Eine subsequente MHC I-vermittelte Antigenpräsentation mit CD40 Kostimulation für die Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen wäre denkbar. Über diesen Mechanismus könnten IECs einen entscheidenden Beitrag zur Entzündungsaufrechterhaltung in CED leisten. Die Ergebnisse unserer Experimente weisen jedoch darauf hin, dass der MR durch IECs nicht exprimiert wird.

#### 4.3 Fehlende Epithelmarkierung des Mannoserezeptors in Darmgewebe gesunder Mäuse

In unseren Experimenten mit der sehr umfangreichen Anzahl von insgesamt 82 betrachteten Mäusen dreier unterschiedlicher genetischer Stämme konnte die MR-Expression durch immunhistochemische Färbungen weder im Dünndarm noch im Dickdarm nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt stellte sich auch unter dem Einfluss der Entzündung unverändert dar. Die ersten Versuche der Immunfluoreszenzmarkierung des MRs dienten der Evaluierung eines geeigneten Antikörpers. In der Literatur fand sich die Beschreibung einer erfolgreichen Verwendung des MR5D3 monoklonalen IgG2a anti-Mannose Ratte-anti-Maus-Antikörper. Dieser Antikörper wurde vom Hersteller (AbD Serotec) für die Immunhistochemie an gefrorenem Gewebe, die Durchflusszytometrie und das Verfahren der Immunpräzipitation als funktionierend eingestuft. Gewebe und Zellen von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen kamen

dabei zum Einsatz (27). In Experimenten durch Martinez-Pomares et al. wurde ebenfalls für die Verwendung beim Western Blot beschrieben (51). Auch in den Immunfluoreszenzfärbungen von Mc Kenzie et al. wurde der gleiche Klon erfolgreich eingesetzt (s. Kapitel 4.2.2) (54). Der eingesetzte MR5D3-Klon gilt als Antikörper, welcher die Bindung von Carbohydratstrukturen durch den MR nicht behindert. Durch den Gebrauch in diversen experimentellen Verfahren und die Verwendung von Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, erschien dieser Antikörper als geeignet für die Generierung valider Ergebnisse in unseren Experimenten. Der Einsatz des monoklonalen IgG2a CD206-Antikörpers erfolgte zunächst an Gewebe einer gesunden Maus mit IECs im physiologischen Zustand. Dazu wurde initial ein Ileumpräparat verwendet, da diese Lokalisation ein typischer Manifestationsort des MC ist und eine hohe Expressionsdichte von MHC II sowie costimulatorischen Molekülen auf IECs durch die Mikrobiotakolonisation aufweist.

Das verwendete Präparat eines C57/129SvEv-Tieres wies dabei allerdings auch bei hohen Antikörperkonzentrationen keine Epithelmarkierung des MRs auf. Hingegen zeigte sich eindeutig spezifische Markierungen von Zellen in der LP, Submukosa und Subserosa sowie vereinzelt von Zellen innerhalb der Muskularis. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden 5 weitere Ileumpräparate verschiedener männlicher und weiblicher C57/129SvEv- bzw. BL/6-Tiere mit gleichem Resultat gefärbt.

Die gleichzeitig durchgeführte Kernfärbung und die Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe der Konfokalmikroskopie ließ die Schlussfolgerung zu, dass die erhaltene, spezifische Markierung sicher zellgebunden war.

Aus diesen Gründen wurde angenommen, dass der verwendete Antikörper in der eingesetzten Verdünnung für die weitere Verwendung in allen folgenden Experimenten geeignet war, um die intestinale MR-Expression zu eruieren.

#### 4.4 Mannoserezeptorbildung durch intestinale Zellen

Der MR wird sowohl von humanen als auch von murinen Makrophagen und DCs exprimiert (50). Die vorhandenen Daten hinsichtlich der MR-Expression intestinaler Subpopulationen dieser Zellen sind rar. Die zellspezifische Färbung innerhalb der LP, Submukosa, Muskularis sowie Subserosa ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf diese Zellen zurückzuführen. Sowohl Makrophagen als auch DCs sind typischer Weise in der LP lokalisiert und finden sich häufig auch in der Submukosa und Subserosa.

Linehan et al. beschrieb die MR-Expression mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen und In-situ-Hybridisierung mit einem polyklonalen MR-Antikörper des Hasen, an Gewebe von

BALB/c und C57-129SvEV Mäusen. Ihnen gelang der MR Nachweis u.a. auf reifen murinen Makrophagen von Lunge, Leber, Peritoneum, Milz, LK und Thymus sowie in lymphatischem Endothel der LK (43). Unveröffentlichte Daten dieser Gruppe sollen auch eine MR-Expression im Darm ergeben haben, wobei nähere Angaben hinsichtlich der MR-bildenden Zellen fehlten.

Takahashi et al. wiesen den MR in einem in vivo Mausmodell in lymphatischen Endothelzellen des Dünndarms nach. Die Forschungsgruppe untersuchte die MR-Expression verschiedener Gewebe von C57/BL6 und BALB/c Mäusen mittels Immunfluoreszenzmarkierungen. Die Dünndarmbiopsien wurden mit einem Ratten-Antiserum gegen MR-Antikörper sowie einem Antikörper gegen das makrophagenspezifische Antigen F4/80 gefärbt. Die Bilder der Immunfluoreszenz intestinaler Villi ähneln denen unserer Färbung der Dünndarmsegmente. Sie zeigen positive Markierungen im Zentrum der Villi, welche die Forschungsgruppe auf MR-exprimierende Makrophagen sowie lymphatische Endothelzellen zurückführt. Die IECs standen nicht im Fokus der Betrachtungen. Es finden sich daher keine Angaben zu Markierungen der IECs (85).

Die lymphatischen Endothelzellen kämen somit als weitere Population in Frage, welche die positiven Markierungen in dem von uns verwendeten Gewebe bedingen könnten.

Eine MR-Expression durch mikrovaskuläre Endothelzellen der o.g. Wandschichten wäre ebenfalls denkbar, da seine Bildung auch für Gefäßendothelzellen diverser anderer Organe wie Gehirn, Leber oder Milz beschrieben wurde.

Unsere Experimente zeigten durchgehend keine Markierung der Muskelzellen der Tunica muscularis. Da eine MR-Expression für tracheale glatte Muskelzellen beschrieben wurde, wäre eine MR-Bildung theoretisch auch für intestinale glatte Muskulatur denkbar gewesen (50). Unsere Markierungen sprechen allerdings dafür, dass der MR nicht durch Muskelzellen des Darms exprimiert wird. Vereinzelt Markierungen innerhalb der Muskelschicht könnten möglicherweise auf Endothelzellen zurückgeführt werden.

Unsere Ergebnisse liefern erstmalig Hinweise darauf, dass der MR auch von intestinalen Subpopulationen von Makrophagen und DCs gebildet wird. Eine genauere Charakterisierung durch den Einsatz von spezifischen Zellmarkern in der Mehrfachmarkierung fand im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht statt. Die immunhistochemischen Färbungen dienten dem primären Ziel die MR-Expression durch Epithelzellen zu untersuchen und beschränkten sich daher zunächst auf Einfachmarkierungen.

Zusammenfassend passt die Verteilung der Fluoreszenzfärbung innerhalb der Gewebeschichten insgesamt gut zu den bisher in der Literatur beschriebenen MR-exprimierenden Zellen. Spezifische und zellgebundene Markierungen zeigen sich in der LP, Submukosa, Muskularis und

Subserosa. Keinerlei Markierungen waren dagegen im Epithel eruierbar. Die vorbeschriebene Verwendung des MR5D3-Antikörpers in ähnlichen Experimenten und die fehlende Markierung in den Negativ- und Isotypkontrollen sprechend dabei für die Spezifität der Färbungen und somit für die Validität des Ergebnisses. Die MR-Expression durch IECs in gesundem Ileumgewebe einer C57/129SvEv-Maus lässt sich durch den verwendeten Antikörper, mit dem eingesetzten Klon und der gewählten Verdünnung in der Immunfluoreszenzmarkierung nicht nachweisen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass der MR durch IECs des Ileums entweder nicht exprimiert wird oder seine Konzentration für eine Detektion mittels Immunfluoreszenzfärbung zu gering ist. Differentielle Ergebnisse für andere Darmabschnitte wären durch die Kompartimentierung des Darms denkbar gewesen.

#### 4.5 Kompartimentierung des Darms

Die ersten Färbungen ergaben zunächst keinerlei Markierungen des Epithels in einem gesunden C57/129SvEV-Maus ileum. Auf eine anatomische bzw. morphologische Segmentierung des Darms wurde bereits in der Einleitung (s. Kapitel 1.1.2) eingegangen. Auch seine immunologische Kompartimentierung ist auf verschiedensten Ebenen evident. Auf Grund der homöostatischen sowie immunogenen Funktion des MRs, hielten wir daher Unterschiede des MR-Expressions-musters zwischen den verschiedenen Darmabschnitten für wahrscheinlich. Einige Ebenen der immunologischen Segmentierung des Intestinums sollen im Folgenden dargestellt werden.

##### 4.5.1 Verteilung der Strukturen des intestinalen Immunsystems

Im Gegensatz zur bakteriellen Besiedlung steht die Verteilung immunologischer Strukturen entlang des Intestinaltrakts. Die zum GALT gehörenden PPs sind im Dünndarm zahlreich vorhanden, während sie im Colon fehlen. T-Zellen sind im Colon ebenfalls zahlenmäßig wesentlich geringer vertreten als in Jejunum und Ileum. Exokrine Paneth-Zellen, welche am Kryptengrund lokalisiert sind, produzieren Stoffe der unspezifischen Abwehr, z.B. antimikrobiell wirkende Lysozyme und  $\alpha$ -Defensine. Ihre Anzahl steigt entlang des Ileums. Im Colon sind sie, wenn überhaupt vorhanden, nur im proximalen Teil vereinzelt zu finden.

Die Verteilung immunologischer Strukturen weist eine inverse Korrelation mit der bakteriellen Besiedlung des Darms auf. Sie steht dabei im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dieser Mikrobiota (55).

#### 4.5.2 Differente Mikrobiotakolonisation

Der Dichte und Zusammensetzung der bakteriellen Besiedlung des Darms wird eine zentrale Rolle für die Entwicklung des intestinalen Immunsystems zugesprochen (s. Kapitel 4.6). Die genauen Mechanismen hierzu sind allerdings noch unvollständig erklärt.

Als gesichert gilt die Beobachtung, dass sich die bakterielle Flora der einzelnen Darmsegmente sowohl qualitativ als auch quantitativ unterscheidet. Es wird postuliert, dass die Besiedlungsdichte kommensaler Mikroorganismen von Dünndarm zum Dickdarm hin ansteigt. Die Zahl der Mikroorganismen im Ileum beispielsweise wird auf etwa  $10^9 \text{ ml}^{-1}$  geschätzt und steigt bis auf ca.  $10^{12} \text{ ml}^{-1}$  im Colon an. Die geringere Zahl im Duodenum und Jejunum ist u.a. auf den Einfluss der Magensäure sowie der Pankreasenzyme und des Motilitätsverhaltens zurückzuführen. Es wird vermutet, dass die Dichte sowie Zusammensetzung der Mikrobiota über die Quantität der Expression von Rezeptoren sowie MHC-Proteinen und costimulatorischen Molekülen auf immunogenen Zellen entscheidet (55).

#### 4.5.3 Unterschiedliche Verteilung von Rezeptoren und anderen Oberflächenmolekülen auf Epithelzellen verschiedener Darmsegmente

Intestinale Epithelzellen der verschiedenen Darmsegmente weisen eine unterschiedliche Expression von Antigen-registrierenden Rezeptoren (z.B. TLR), costimulatorischen Molekülen sowie Proteinen zur Antigenpräsentation (z.B. MHC II) auf. Während beispielsweise TLR-3 durch IECs im gesamten Intestinaltrakt in hoher Zahl exprimiert wird, finden sich TLR-2 und TLR-4 eher im Dünndarm. Der TLR-5 wird zumeist von IECs des Colon gebildet (55).

MHC II-Oberflächenproteine auf gesunden IECs dominieren im Ileum. Dort sind sie auf Zottenspitze, -basis und Kryptenepithel lokalisiert. Im Duodenum und Jejunum sind sie zahlenmäßig geringer vertreten und immunhistochemisch v.a. an der oberen Zottenspitze nachweisbar. IECs des Colon exprimieren gering MHC II. (53, 82) Im Gegensatz dazu bilden Oberflächen-IECs des Colons eine Reihe von nichtklassischen MHC Molekülen (CD1d, MICA/B und HLA-E) in höherer Zahl als IECs des Dünndarms aus (77). Die aufgeführten Daten zur distinkten Proteinexpression unterschiedlicher Darmabschnitte liefern einen weiteren Hinweis zur Möglichkeit einer differentiellen MR-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation. Wie bereits beschrieben (s. Kapitel 4.1.5 und 4.1.6), werden auch die o.g. Oberflächenmoleküle durch den Einfluss von Mediatoren moduliert. Die Zytokinfreisetzung z.B. von  $\text{IFN-}\gamma$  durch immunogene Zellen wird auch im gesunden Zustand von der kommensalen Flora moduliert. Zusammenfassend trägt die unterschiedliche Mikrobiotakolonisation entlang des Darms zu einer differentiellen Verteilung von immunologischen Strukturen bzw. Zellen bei. Ebenso wird

ihre Expression von Oberflächenmolekülen sowie die Sekretion von Signal- und Abwehrstoffen durch die bakterielle Besiedlung beeinflusst. Durch diese Interaktion der kommensalen Flora mit dem intestinalen Immunsystem weist der Darm nicht nur anatomisch, sondern auch immunologisch eine deutliche Kompartimentierung auf. Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlichen segmentalen Manifestation des MC und der CU sowie der charakteristischen Zytokinverteilungen dieser Erkrankungen (s. Kapitel 1.5.4).

Die scheinbar fehlende MR-Expression der IECs des Ileums könnte mit der Segmentierung des Darms in Zusammenhang stehen. Eine differente MR-Bildung der IECs in anderen Lokalisationen war in Zusammenschau mit den o.g. Daten denkbar. Aus diesem Grund wurden Immunfluoreszenzfärbungen weiterer Darmabschnitte durchgeführt.

## 4.6 Lokalisation des Mannoserezeptors in anderen Darmabschnitten

### 4.6.1 Fehlende Mannoserezeptorexpression durch Epithelzellen weiterer Darmabschnitte

Zur Eruiierung der MR-Bildung durch IECs anderer Segmente wurden folglich jeweils mindestens 5 Präparate aus Duodenum, Jejunum und Colon in physiologischem Zustand an zunächst einem genetischen Stamm (C57/129SvEv) getestet.

Jedoch war weiterhin in keinem der gefärbten Abschnitte eine MR-Expression durch IECs erkennbar. Hingegen zeigte sich in allen Teilen eine saubere, zellgebundene Markierung von Zellen der LP sowie Submukosa, Muskularis und Subserosa. Die negative IEC-Markierung, bei positiven Färbungen innerhalb der anderen genannten Wandschichten in allen Darmsegmenten, deutet darauf hin, dass die fehlende MR-Expression der IECs von ihrer Lokalisation im Darm unabhängig ist. Von der Spezifität und Eindeutigkeit der Markierung ist durch die zusätzlich durchgeführte Kernfärbung und die Auswertung am Konfokalmikroskop auszugehen. Dazu passend stellt sich auch die Negativ- und Isotypkontrollen dar, welche keine unspezifischen Färbungen erkennen ließen. Die Validität des Ergebnisses darf somit angenommen werden. Im nächsten Schritt sollte ausgeschlossen werden, dass die fehlende MR-Expression durch IECs durch die Genetik der eingesetzten C57/129SvEv- bzw. BL/6-Mäuse begründet ist. Daher erfolgten weitere Versuche, bei denen Darmgewebe von BALB/c-Mäusen verwendet wurde.

#### 4.7 Mannoserezeptorexpression in Abhängigkeit des genetischen Stammes

Die unterschiedliche genetische Abstammung verschiedener Mäuse kann Ursache differenter Ergebnisse innerhalb eines Experiments sein. So zeigen die *in vivo* Daten von Wende et al. beispielsweise, dass für BALB/c-Mäuse ein Beitrag des Komplementrezeptors C3a zur Colitistentstehung angenommen werden kann, während dies für C57BL/6 nicht gilt (92).

Obwohl sich in der Literatur keinerlei Hinweise auf eine MR-Expression in Abhängigkeit des genetischen Stammes ergaben, galt es, diesen Faktor als mögliche Ursache für die fehlende epitheliale Markierung in C57-Mäusen auszuschließen. Aus diesem Grund wurden auch Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon von je 5-6 verschiedenen BALB/c-Mäusen untersucht. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf Veränderungen des MR-Verteilungsmusters in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund. Die Markierungen zeigten sich äquivalent für C57/129SvEv- bzw. BL/6- und BALB/c-Mäuse im gesunden Zustand mit Färbungen von Zellen der LP, Submukosa, Muskularis und Subserosa in allen Darmsegmenten der untersuchten Stämme. Eine Epithelmarkierung war weiterhin nicht zu verzeichnen.

Die äquivalenten Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung in Darmgeweben unterschiedlicher C57- und BALB/c-Mäuse, sprechend daher für eine vom genetischen Stamm unabhängige Expression des MRs. Der genetische Hintergrund liefert somit keine Erklärung für die scheinbar fehlende MR-Bildung durch IECs.

Sowohl die C57- als auch die BALB/c-Mäuse wurden unter SPF Bedingungen gehalten. Eine mangelnde Stimulation der IECs durch Darmbakterien könnte daher als weitere mögliche Ursache für eine fehlende MR-Expression in Betracht. Die MHC II-Bildung durch IECs korreliert mit der physiologischen Stimulation der IECs durch die kommensale Flora. Eine Immunfluoreszenzmarkierung der MHC II-Moleküle kann daher Hinweise auf den Stimulationszustand des Epithels liefern.

#### 4.8 Einsatz der MHC II-Markierung

Der Einfluss der konstitutiven Entzündung durch die physiologische Kolonisierung mit kommensalen Bakterien ist essentiell für die Funktion der IECs als APZ (s.u.). Durch die spezifisch-pathogenfreie Haltung der bisher eingesetzten Tiere könnte eine unzureichende physiologische Stimulation durch kommensale Bakterien ein Fehlen der MR-Bildung bedingen. Die bakterielle Besiedlung des Darms ist u.a. Grundlage für die MHC II-Expression der IECs, welche eine Voraussetzung für die T-Zell-Stimulation darstellt. Murine neonatale IECs zeigen keine MHC II-Expression. Erst nach einigen Tagen lassen sich MHC II-Moleküle auf IECs nachweisen. Die MHC II-Bildung wird hauptsächlich durch IFN- $\gamma$  induziert und aufrechter-

halten, dessen Sekretion durch die bakterielle Kolonisation getriggert wird (53, 82). Die unterschiedliche Verteilung der MHC II-Expression, welche sich nach ihrer Initiation innerhalb der verschiedenen Darmabschnitte zeigt, lieferte einen weiteren Hinweis für die Bedeutung der kommensalen Flora für die IEC-Funktion (31).

In unseren Versuchen sollte eine unzureichende Stimulation durch die physiologische Darmflora als Ursache für die fehlende MR-Markierung ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund erfolgte die Durchführung der MHC II-Markierung. Dazu wurde das in allen vorhergehenden Färbungen verwendete Darmgewebe von adulten (8-12 Wochen) Mäusen eingesetzt. In diesem Alter ist im Regelfall das maximale Level der physiologischen MHC-Expression auf IECs erreicht (31). Die positiven Färbungen der MHC II-Komplexe in den verwendeten Präparaten gesunder Tiere, wiesen auf eine regelrechte Stimulation der IECs hin.

#### 4.8.1 Positive MHC II-Markierungen in allen verwendeten Präparaten

Eine positive MHC II-Markierung des Gewebes der bisher verwendeten C57- und BALB/c-Mäuse war in allen Darmetagen zu verzeichnen und lieferte äquivalente Ergebnisse für beide genetische Stämme.

Im Duodenum ergaben sich vornehmlich Färbungen der IECs im Bereich des oberen Zottenepithels, die zu den Krypten hin deutlich abnahmen und an dieser Lokalisation fehlten. Im Jejunum und Ileum konnten eindeutige MHC II-Markierungen in Zottenspitze sowie Zottenbasis und Krypten beobachtet werden, wobei im Ileum deutlich mehr Krypten MHC II<sup>+</sup> IECs enthielten. Das Colon wies nur vereinzelte Markierungen v.a. in kleinen Bereichen des Oberflächenepithels mit ausgereiften IECs auf.

Markierungen in der LP und Submukosa, welche vermutlich auf die dort lokalisierten Monozyten bzw. Makrophagen, DCs und B-Lymphozyten zurückgehen, waren erkennbar.

Die Muskelzellen waren von den Fluoreszenzmarkierungen durchweg ausgespart. Eine fehlende MHC II-Expression der Zellen in diesem Bereich wurde schon von anderen Autoren beschrieben und diente als gleichzeitige Kontrolle einer sauberen Markierung.

Die Ergebnisse der MHC II-Markierung decken sich gut mit der vorhandenen Literatur, welche für diese Spezies und Menschen ähnliche Expressionsmuster angibt (31, 53, 82).

Sie liefern einen Hinweis dafür, dass das verwendete Darmgewebe der SPF-gehaltenen Mäuse, einer physiologischen Stimulation unterlag. Dies ist als Ursache für die fehlende MR-Expression der IECs daher unwahrscheinlich. Möglicherweise beeinflussen jedoch andere Faktoren die MR-Expression, welche bei SPF-gehaltenen Tieren fehlen. Folglich sollte die MR-Bildung der IECs zusätzlich bei konventionell kolonisierten NMRI-Mäusen untersucht werden.

#### 4.9 Einfluss der intestinalen Mikrobiotakolonisation auf die Mannoserezeptorexpression

Die Besiedlung des Darms durch die kommensale Flora ist für die intestinale Homöostase und immunologische Kompetenz von immenser Bedeutung. Sie ist daher Gegenstand aktueller Forschungen, deren Erkenntnisse sich in kontinuierlichem Fluss befinden und zum Teil große Differenzen aufweisen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird angenommen, dass der menschliche Darm durch mindestens 1000 verschiedene Bakterienspezies besiedelt ist. Die meisten davon sind gram-negativ und anaerob. Bacterioides und Firmicutes repräsentieren einen Großteil der Gesamtheit. Weitere dominante Spezies sind u.a. Enterobacterium, Lactobacillus, Clostridium, Eubacterium, Bifidobacterium, Veillonella, Ruminococcus, Fusobacterium, Peptococcus und Peptostreptococcus (49,87). Die Menge und Art der Zusammensetzung der kommensalen Flora ist ein wichtiges Kriterium für die Aufrechterhaltung des intestinalen Gleichgewichts. Veränderungen der Zusammensetzung erhöhen das Risiko für atopische Erkrankungen wie z.B. Neurodermitis oder Rhinitis allergica und sind im Zusammenhang mit der Hygienehypothese auch für die Disposition zu CED beschrieben worden (49).

Physiologische Mikrobiota unterstützen nicht nur die Verdauung, indem sie zugeführte Polysaccharide zersetzen, sie tragen auch zur Entwicklung des Intestinaltraktes bei, indem sie die Epithel- und T-Zell-Entwicklung sowie Angiogenese stimulieren. Durch ihre Konkurrenz mit pathogenen Erregern um Nährstoffe sind sie in der Lage, deren Vermehrung zu inhibieren. Gleichzeitig fördern sie über die Aktivierung von DCs und epithelialen TLRs eine Immunantwort gegen diese Erreger und tragen so zum Schutz vor Infektionen bei (30).

Ebenso wichtig sind sie für die regelhafte Reifung des Immunsystems. Sie beeinflussen die B- und T-Zell-Entwicklung sowie -funktion und generieren Stimuli die u.a. für eine regelhafte Rezeptorexpression essentiell sind. Ein Beispiel dafür ist die Triggerung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung immunogener Zellen zur Initiation der MHC II-Expression (s. Kapitel 4.4.3). In diesem Zuge kommt den physiologischen Darmbakterien möglicherweise auch eine Bedeutung für die MR-Bildung zu.

4.9.1 Fehlende Mannoserezeptorbildung im Epithel konventionell kolonisierter Mäuse  
Durch den Vergleich von keimfreien mit kolonisierten Mäusen kann heute der Einfluss der Kolonisation auf die Entwicklung des Immunsystems genauer untersucht werden. Durch unseren Einsatz von keimfreien sowie kolonisierten NMRI-Mäusen wurde ein genetisches Modell aus demselben Haus untersucht. Der Einflussfaktor differenter Haltungen in verschiedenen Tierställen wurde somit ausgeschlossen und es konnte erstmals die Bedeutung der Kolonisation für die intestinale MR-Expression eruiert werden.

Initial sollte der Versuch den Einfluss der Mikrobiota auf die MR-Expression der IECs genauer beleuchten. Nach dem vorangegangenen Ergebnissen war jedoch weiterhin keine MR-Markierung des Epithels keimfreier Mäuse zu erwarten. Interessanter schien dennoch, die MR-Expression der extraepithelialen Zellen zu untersuchen.

Das Gewebe der keimfreien NMRI-Mäuse ließ in den Färbungen das gleiche Expressionsmuster des MRs erkennen, womit gleichzeitig ein weiterer genetischer Stamm untersucht wurde. Auch hier waren IECs ungefärbt, jedoch Zellen der LP, Submukosa und Subserosa markiert. Der Fakt, dass eine positive MR-Markierung zu verzeichnen war, spricht für eine konstitutive und Mikrobiota-unabhängige Expression des MRs durch diese Zellen.

Eine fehlende MHC II-Markierung der keimfreien IECs in Jejunum, Ileum und Colon bei positiven Färbungen von Zellen der LP, Submukosa und Subserosa stellte ein Indiz für die tatsächliche Keimfreiheit des Gewebes dar. Diese wurde ebenfalls durch die in Heidelberg durchgeführte mikroskopische Kontrolle des Blinddarminhalts im Nativpräparat und einer Gramfärbung überprüft und durch die Untersuchung des Blinddarminhalts in einer Bakterienkultur in Bouillon und Blutagar gewährleistet.

Die Immunfluoreszenzmarkierung der kolonisierten NMRI-Mäuse zeigte die auch in den anderen genetischen Stämmen gesehene Verteilung des MRs in allen Abschnitten. Auch bei diesen Tieren konnte immunhistochemisch kein Nachweis einer MR-Expression im Epithel erbracht werden. Markierungen in Zellen von LP, Submukosa und Subserosa waren erkennbar. Die Färbung innerhalb dieser Schichten sowohl in keimfreiem als auch kolonisiertem Gewebe ist, wie bereits zuvor erläutert, vermutlich auf die dort typischerweise lokalisierten Makrophagen, DCs und lymphatischen Endothelzellen zurückzuführen (s. Kapitel 4.3).

Die gleichzeitig durchgeführte MHC II-Färbung mit positiven Markierungen der IECs in Jejunum, Ileum und Colon sprach für den physiologischen Stimulationszustand der Tiere mit regelhafter epithelialer MHC II-Expression.

Zusammengefasst zeigt die IECs konventionell kolonisierter sowie keimfreier NMRI-Mäuse zeigten keine Markierung bei positiven Färbungen der LP, Submukosa und Subserosa. Daher

scheint auch die unterschiedliche Haltung der eingesetzten Tiere (C57, BALB/c und NMRI) sowie deren Kolonisationszustand nicht ursächlich für eine fehlende MR-Expression durch IECs zu sein.

Der MR wird unter physiologischen Bedingungen vermutlich nicht durch IECs gebildet. Der Einfluss von Mediatoren auf die MR-Expression anderer Zellen wurde zuvor bereits beschrieben. Es wird daher denkbar, dass der MR unter entzündlichen Bedingungen durch IECs gebildet wird.

#### 4.10 Einsatz verschiedener Entzündungsmodelle

Die vorangegangenen Daten auf Basis der Immunfluoreszenz deutend darauf hin, dass der MR von IECs der Maus nicht konstitutiv exprimiert wird.

Unter Entzündungsbedingungen wie bei MC und CU werden proinflammatorische Zytokine durch immunogene Zellen vermehrt ausgeschüttet, welche auch die IECs in ihrer Funktion als APZ stimulieren. Die Folge ist eine Hochregulation diverser Oberflächenmoleküle auf IECs. Im Zuge dessen wäre auch eine Hochregulation des MRs plausibel.

Da sich die Zytokinprofile von MC und CU trotz vorhandener Gemeinsamkeiten unterscheiden, wurden in unserer Arbeit zwei verschiedene Entzündungsmodelle untersucht (s. Kapitel 1.5.4). Durch die Verwendung der Mäuse mit TNF-Ileitis und cDSS-Colitis konnten unterschiedliche Zytokinmuster sowie beide Hauptmanifestationsorte der CED abgebildet werden.

##### 4.10.1 Entzündungsstatus im terminalen Ileum und Colon

Für die Untersuchung der MR-Expression im Darm unter entzündlichen Bedingungen der CED galt es primär, den Entzündungsstatus im Gewebe der TNF $\Delta$ ARE/WT- und C57BL/6-cDSS-Mäuse zu validieren. Dazu wurden die Tiere zunächst klinisch begutachtet. In beiden Modellen zeigt sich typische Symptome der Erkrankungen in Form von Durchfällen und Gewichtsverlust. Zudem wiesen die TNF $\Delta$ ARE/WT-Tiere des Ileitis-Modells typische Schwellungen der Gelenke an Vorder- sowie Hinterpfoten sowie damit verbundene Bewegungseinschränkungen auf. Diese Zeichen sprechen für eine Arthritis als häufige extraintestinale Manifestation der CED und geben zusätzliche klinische Hinweise auf eine statthafte Ileitis. Bei den Mäusen des Colitis-Modells konnten zusätzlich Darmblutungen, welche auch bei CU charakteristisch sind, beobachtet werden. Sie stellen ein klinisches Indiz für die entzündlich veränderte Darmschleimhaut des distalen Colons dar, was in den durchgeführten Endoskopien bestätigt werden konnte. Der für die C57BL/6-cDSS-Mäuse erhobene mDA fasst die Colitis-Symptome Darmblutungen und Gewichtsverlust zusammen. Er zeigt somit ebenfalls eine erhöhte Krankheitsaktivität. Passend zu den makroskopischen Zeichen der Inflammation ließen sich auch histologisch

sowohl im Ileitis- als auch im Colitismodell eindeutige, entzündliche Veränderungen darstellen. Diese erschienen in Form von Infiltrationen durch Entzündungszellen. Eine Abflachung und Verplumpung der Ileumzotten sowie der Epithelverlust mit Ulzerationen im Colon zeigt sich als morphologische Korrelate der Inflammation. Die Veränderungen des Colons begründeten dabei die erhöhte Punktzahl im erhobenen histologischen Index der Colitis (11).

Die MHC II-Färbung zeigte Epithelmarkierungen des Ileums an Zottenspitze, Zottenbasis und in den Krypten. Im Colon konnten Färbungen des Oberflächenepithels der Krypten sowie teilweise auch an der Kryptenbasis gegenüber den gesunden Kontrollen vermehrt registriert werden. Insgesamt deutet die Markierung daher auf eine Hochregulation der MHC II-Expression im terminalen Ileum und Colon hin.

Zusammengenommen sprechen alle makroskopischen, mikroskopischen sowie immunhistochemischen Zeichen für eine eindeutig statthafte, der CED entsprechenden Inflammation im verwendeten Dünn- und Dickdarmgewebe. Von einer folglich verstärkten Stimulation der IECs durch kommensale Bakterien sowie dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine ist daher auszugehen. Die Voraussetzung für eine Hochregulation der MR-Expression unter entzündlichem Einfluss wäre somit gegeben.

#### 4.10.2 Einfluss der Inflammation auf die Mannoserezeptorexpression

Unter den entzündlichen Bedingungen der CED wird eine Reihe von Zytokinen vermehrt ausgeschüttet. Sie sind für eine Kommunikation zwischen immunogenen und nicht-immunogenen Zellen von enormer Bedeutung und daher Gegenstand aktueller Forschungen hinsichtlich Pathogenese und Therapiemöglichkeiten der CED.

In unseren Experimenten konnte eine statthafte Inflammation im verwendeten Gewebe angenommen werden. Dieser Fakt macht es wahrscheinlich, dass das Gewebe somit auch dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine, darunter auch IL-4 und IL-13 als bekannte Aktivatoren der MR-Expression, unterlag. Unveröffentlichte Daten der Forschungsgruppe konnten dies für die TNF $\Delta$ ARE/WT-Tiere bereits bestätigen.

Trotz allem zeigten die Immunfluoreszenzmarkierungen in beiden Modellen keine MR-Expression der IECs. Eine zellgebundene MR-Markierung war hingegen wie zuvor auch im gesunden Gewebe in Zellen der LP, Submukosa und Subserosa eruiert. Die durchgeführten Negativkontrollen ließen keine unspezifischen Markierungen erkennen und sprachen somit für die Spezifität der Expression des MRs durch die genannten Zellen.

In unseren Versuchen wurden zwei Entzündungsmodelle eingesetzt, welches sowohl MC als auch CU abbildeten. Eine statthafte Inflammation wurde mittels verschiedener Kriterien gesichert.

Trotz der Erfüllung der erforderlichen Voraussetzungen für eine potentielle MR-Expression durch IECs konnte selbige unter entzündlichen Bedingungen mittels Immunfluoreszenzfärbungen weder im Dünndarm noch im Dickdarm nachgewiesen werden. Die Entzündung scheint folglich nicht entscheidend für eine MR-Expression der IECs.

#### 4.11 Schlussfolgerung

Durch unsere Arbeit gab es sich, entgegen der anfänglich aufgestellten Hypothese, keinerlei Hinweise für eine MR-Expression durch IECs. Um die Validität des Ergebnisses zu gewährleisten, wurden mögliche Fehlerquellen im Rahmen unserer Versuche ausgeschlossen. Ein Funktionieren des Antikörpers wurde sichergestellt, verschiedene Lokalisationen untersucht, unterschiedliche genetische Stämme verwendet, eine regelrechte Stimulation des Epithels überprüft, Gewebe von SPF-gehaltenen sowie konventionell kolonisierten Tieren eingesetzt und der Einfluss der Entzündung eruiert. Ein falsch negatives Ergebnis wäre trotz dessen möglich. So könnte beispielsweise der MR in zu geringer Konzentration für einen immunhistochemischen Nachweis vorliegen oder das epitheliale Epitop maskiert und damit die Antikörperbindung unmöglich sein.

Unsere Versuche liefern in vivo Daten der Maus für eine sehr großen Fallzahl von Tieren dreier unterschiedlicher genetischer Stämme. Trotz einer eindeutigen, spezifischen sowie zellgebundenen Markierung extraepithelialer Zellen fehlte der Nachweis des MRs in jedem der 4 untersuchten Darmabschnitte unabhängig von der Kolonisierung und vom Entzündungsstatus des Darmgewebes. Eine konstitutive, Mikrobiota-unabhängige Rezeptorexpression extraepithelialer Zellen konnte hingegen erstmalig gezeigt werden.

Demnach ergibt sich die Hypothese, dass der MR von IECs des Darms nicht exprimiert wird und dieser Rezeptor folglich keine funktionelle Relevanz für die Antigenpräsentation durch IECs besitzt.

Auf Grund der sowohl qualitativ als auch quantitativ eingeschränkten Aussagekraft der Immunfluoreszenz hinsichtlich der MR-Expression bedarf es dabei einer Überprüfung der Aussage mittels weiterer Nachweismethoden.

Dazu wären Experimente mit isolierten Zellen nötig, deren Untersuchungen in Anbetracht des Umfangs nicht Schwerpunkt der Arbeit waren. Die Methode der Immunfluoreszenz lässt demnach keine abschließende Aussage über das tatsächliche Expressionsverhalten der IECs zu und dient damit der Hypothesengenerierung.

## 5 AUSBLICK

Zukünftige Experimente könnten sich auf drei Schwerpunkte konzentrieren. Zunächst sollten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse technisch validiert werden. Dazu könnten z.B. aus Mäusen ex-vivo isolierte IECs mittels FACS, Western Blot und PCR hinsichtlich ihrer MR-Expression auch auf Protein- und RNA-Ebene untersucht werden. Wichtig ist zudem die Untersuchung von humanen IECs, da sich das Repertoire ihrer Oberflächenrezeptoren möglicherweise von dem muriner IECs unterscheidet.

Weiterhin gilt es zu klären, über welche anderen Mechanismen die proinflammatorische Präsentationskompetenz der IECs bedingt wird. Dazu kämen z.B. weitere Rezeptoren oder costimulatorische Moleküle in Betracht. Der DEC-205 könnte dahingehend beispielsweise untersucht werden. Er ist ein Rezeptor der MR-Familie. Auf DCs dient er der Direktionierung von Antigenen in MIIcs, welche über diesen Aufnahmewege effektiver präsentiert werden können (49). Unveröffentlichte Daten der eigenen Forschungsgruppe zeigen eine Expression des DEC-205 durch IECs sowie seine Kollokalisation mit MHC II- und MHC I-Molekülen in MVBs der IECs. Ein Zusammenhang mit der gesteigerten CD8<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation der CED wäre daher denkbar.

Auch das costimulatorische Molekül CD40 beispielsweise könnte maßgeblich an der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation durch IECs beteiligt sein. Seine Expression durch IECs und Bedeutung für die Inflammation konnte bereits gezeigt werden. Die Funktion von CD40 für die Antigenpräsentation und Interaktion von IECs mit T<sub>eff</sub> sollte daher genauer beleuchtet werden.

Ein weiterer Fokus könnte auf die Rolle extraepithelialer Zellen in diesem Zusammenhang gelegt werden. Zunächst sollte die MR-exprimierenden Zellen der anderen Darmschichten mittels Mehrfachmarkierungen identifiziert werden. Es wäre u.a. denkbar, dass IECs vornehmlich die Antigenprozessierung übernehmen, während DCs die eigentlichen APZ für die CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>-Stimulation sind. Sie könnten die verarbeiteten Antigene aus Exosomen der IECs oder aber auch aus apoptotischen IECs aufnehmen und präsentieren und darüber zu einer T-Zell-Aktivierung führen.

In jedem Fall sollten weitere Untersuchungen folgen, welche ihren Beitrag zum besseren Verständnis des Gesamtzusammenhangs zwischen der proinflammatorischen Kompetenz der IECs und der Entwicklung einer Barrierestörung innerhalb der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa liefern.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen liegt ein multifaktorieller Entstehungsmechanismus zugrunde. Dieser führt zu einem Toleranzverlust gegenüber nicht pathogenen Antigenen und mündet in einer Inflammation. Die u.a. gesteigerte Stimulation CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen durch intestinale Epithelzellen ist dabei charakteristisch. Eine vermehrte „cross-presentation“ durch intestinale Epithelzellen als nichtklassische Antigen-präsentierende Zellen, könnte ursächlich dafür sein. Der Mannoserezeptor erwies sich als essentiell für die „cross-presentation“ durch einige klassische Antigen-präsentierende Zellen. Zielsetzung der Arbeit war daher die Untersuchung seiner Expression durch intestinale Epithelzellen. In unseren Experimenten wurden Immunfluoreszenzfärbungen des Mannoserezeptors und der MHCII-Moleküle mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Darmgewebe von insgesamt 82 Mäusen dreier unterschiedlicher Genfamilien (C57/129SvEv bzw. BL/6, BALB/c und NMRI) in verschiedenen Lokalisationen (Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon) wurde verwendet. Durch die Gegenüberstellung von keimfreien mit konventionell kolonisierten NMRI-Mäusen konnte der Einfluss der Darmkolonisierung auf die Mannoserezeptor-Expression eruiert werden. Es erfolgte zudem ein Vergleich von TNFΔARE/WT-Mäusen mit terminaler Ileitis bzw. cDSS-C57BL/6-Mäusen mit chronischer Colitis und gesunden Kontrollen, um den Stellenwert einer, für chronisch entzündliche Darmerkrankungen spezifischen Entzündung, zu untersuchen. Für intestinale Epithelzellen ließ sich immunhistochemisch keine Mannoserezeptor-Markierung darstellen. Dieses Ergebnis erschien äquivalent in jedem Darmsegment, in allen drei verwendeten genetischen Stämmen, in jedem Kolonisierungszustand sowohl für gesunde als auch für entzündete Mäuse. Eindeutige, zellgebundene Markierungen des Mannoserezeptors zeigt sich in der Lamina propria, Submukosa, Muskularis sowie Subserosa und sind vermutlich auf dort lokalisierte Makrophagen und dendritische Zellen zurückzuführen. MHCII-Komplexe konnten in allen Schichten der Darmwand markiert werden.

Unsere *in vivo* Daten liefern folglich Hinweise darauf, dass der Mannoserezeptor unabhängig von der Lokalisation, dem genetischen Hintergrund sowie des Entzündungszustandes trotz ausreichender epithelialer Stimulation durch die mikrobielle Flora, von intestinalen Epithelzellen nicht exprimiert wird. Eine konstitutive Bildung durch Makrophagen und dendritische Zellen anderer Schicht darf vermutet werden. Eine weitere Validierung der Ergebnisse mittels anderer Nachweismethoden wäre sinnvoll. Zusätzlich sollte die funktionelle Relevanz der fehlenden Mannoserezeptor-Expression für die „cross-presentation“ eruiert werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Allez, M., Tieng, V., Nakazawa, A., Treton, X., Pacault, V., Dulphy, N., Caillat-Zucman, S., Paul, P., Gornet, J.-M., Douay, C., Ravet, S., Tamouza, R., Charron, D., Lémann, M., Mayer, L., Toubert, A., 2007. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology* 132, 2346–2358.
- (2) Arosa, F.A., Irwin, C., Mayer, L., de Sousa, M., Posnett, D.N., 1998. Interactions between peripheral blood CD8 T lymphocytes and intestinal epithelial cells (iEC). *Clin. Exp. Immunol.* 112, 226–236.
- (3) Bär, F., Sina, C., Hundorfean, G., Pagel, R., Lehnert, H., Fellermann, K., Büning, J., 2013. Inflammatory bowel diseases influence major histocompatibility complex class I (MHC I) and II compartments in intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 172, 280–289.
- (4) Bisping, G., Lügering, N., Lütke-Brintrup, S., Pauels, H.G., Schürmann, G., Domschke, W., Kucharzik, T., 2001. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 123, 15–22.
- (5) Blokzijl, H., van Steenpaal, A., Vander Borght, S., Bok, L.I.H., Libbrecht, L., Tamminga, M., Geuken, M., Roskams, T.A.D., Dijkstra, G., Moshage, H., Jansen, P.L.M., Faber, K.N., 2008. Up-regulation and cytoprotective role of epithelial multidrug resistance-associated protein 1 in inflammatory bowel disease. *J. Biol. Chem.* 283, 35630–35637.
- (6) Boenisch, T., 2003. *Handbuch immunhistochemische Färbemethoden*, 3. Auflage. ed. DakoCytomation GmbH, Hamburg.
- (7) Borcherding, F., Nitschke, M., Hundorfean, G., Rupp, J., von Smolinski, D., Bieber, K., van Kooten, C., Lehnert, H., Fellermann, K., Büning, J., 2010. The CD40-CD40L pathway contributes to the proinflammatory function of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* 176, 1816–1827.
- (8) Boskovic, J., Arnold, J.N., Stilion, R., Gordon, S., Sim, R.B., Rivera-Calzada, A., Wienke, D., Isacke, C.M., Martinez-Pomares, L., Llorca, O., 2006. Structural model for the mannosereceptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 8780–8787.

- (9) Bouguen, G., Chevaux, J.-B., Peyrin-Biroulet, L., 2011. Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 17, 547–556.
- (10) Brimnes, J., Allez, M., Dotan, I., Shao, L., Nakazawa, A., Mayer, L., 2005. Defects in CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* 174, 5814–5822.
- (11) Büning, J., von Smolinski, D., Tafazzoli, K., Zimmer, K.-P., Strobel, S., Apostolaki, M., Kollias, G., Heath, J.K., Ludwig, D., Gebert, A., 2008. Multivesicular bodies in intestinal epithelial cells: responsible for MHC class II-restricted antigen processing and origin of exosomes. *Immunology* 125, 510–521.
- (12) Büning, Jürgen, 2010. Molekulare Mechanismen der adaptiven Immunregulation durch Intestinale Epithelzellen (Med. Habil. Schr.). Lübeck.
- (13) Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P.A., Kurts, C., 2007. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612–616.
- (14) Burgdorf, S., Kurts, C., 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 89–95.
- (15) Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., Kurts, C., 2006. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol.* 176, 6770–6776.
- (16) Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., Kurts, C., 2008. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* 9, 558–566.
- (17) Chung, Y., Ko, S.-Y., Ko, H.-J., Kang, C.-Y., 2005. Split peripheral tolerance: CD40 ligation blocks tolerance induction for CD8 T cells but not for CD4 T cells in response to intestinal antigens. *Eur. J. Immunol.* 35, 1381–1390.
- (18) Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., Cortot, A., 2011. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.
- (19) Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R., Wearsch, P.A., 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* 207, 145–157.
- (20) Cruickshank, S.M., McVay, L.D., Baumgart, D.C., Felsburg, P.J., Carding, S.R., 2004. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* 53, 678–684.

- (21) Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W., Geuze, H.J., 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 19, 3365–3374.
- (22) Doyle, A.G., Herbein, G., Montaner, L.J., Minty, A.J., Caput, D., Ferrara, P., Gordon, S., 1994. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* 24, 1441–1445.
- (23) Geuze, H.J., 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* 19, 282–287.
- (24) Gröger, M., Holnthoner, W., Maurer, D., Lechleitner, S., Wolff, K., Mayr, B.B., Lubitz, W., Petzelbauer, P., 2000. Dermal microvascular endothelial cells express the 180-kDa macrophage mannose receptor in situ and in vitro. *J. Immunol.* 165, 5428–5434.
- (25) Hänninen, A., Martinez, N.R., Davey, G.M., Heath, W.R., Harrison, L.C., 2002. Transient blockade of CD40 ligand dissociates pathogenic from protective mucosal immunity. *J. Clin. Invest.* 109, 261–267.
- (26) Harel, E., Rubinstein, A., Nissan, A., Khazanov, E., Nadler Milbauer, M., Barenholz, Y., Tirosh, B., 2011. Enhanced transferrin receptor expression by proinflammatory cytokines in enterocytes as a means for local delivery of drug to inflamed gut mucosa. *PLoS ONE* 6, e24202.
- (27) Hassan, M.F., Zhang, Y., Engwerda, C.R., Kaye, P.M., Sharp, H., Bickle, Q.D., 2006. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am. J. Pathol.* 169, 943–953.
- (28) Henderson, P., van Limbergen, J.E., Schwarze, J., Wilson, D.C., 2011. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 382–395.
- (29) Hershberg, R.M., Mayer, L.F., 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol. Today* 21, 123–128.
- (30) Hooper, L.V., Macpherson, A.J., 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169.
- (31) Hughes, A., Bloch, K.J., Bhan, A.K., Gillen, D., Giovino, V.C., Harmatz, P.R., 1991. Expression of MHC class II (Ia) antigen by the neonatal enterocyte: the effect of treatment with interferon-gamma. *Immunology* 72, 491–496.

- (32) Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599–603.
- (33) Hundorfean, G., Zimmer, K.-P., Strobel, S., Gebert, A., Ludwig, D., Büning, J., 2007. Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G798–808.
- (34) Kaiserlian, D., Lachaux, A., Grosjean, I., Graber, P., Bonnefoy, J.Y., 1993. Intestinal epithelial cells express the CD23/Fc epsilon RII molecule: enhanced expression in enteropathies. *Immunology* 80, 90–95.
- (35) Kappeler, A., Mueller, C., 2000. The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease. *Histol. Histopathol.* 15, 167–172.
- (36) Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R.S., 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621.
- (37) Kleijmeer, M.J., Escola, J.M., UytdeHaag, F.G., Jakobson, E., Griffith, J.M., Osterhaus, A.D., Stoorvogel, W., Melief, C.J., Rabouille, C., Geuze, H.J., 2001. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* 2, 124–137.
- (38) Klotz, L., Hucke, S., Thimm, D., Classen, S., Gaarz, A., Schultze, J., Edenhofer, F., Kurts, C., Klockgether, T., Limmer, A., Knolle, P., Burgdorf, S., 2009. Increased antigen cross-presentation but impaired cross-priming after activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is mediated by up-regulation of B7H1. *J. Immunol.* 183, 129–136.
- (39) Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., Kollias, G., 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10, 387–398.
- (40) Kugathasan, S., Amre, D., 2006. Inflammatory bowel disease—environmental modification and genetic determinants. *Pediatr. Clin. North Am.* 53, 727–749.
- (41) Kyd, J.M., Cripps, A.W., 2008. Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine* 26, 6221–6224.
- (42) Li, J., Jiang, H., Wen, W., Zheng, J., Xu, G., 2010. The dendritic cell mannose receptor mediates allergen internalization and maturation involving notch 1 signalling. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 251–261.

- (43) Linehan, S.A., Martínez-Pomares, L., Stahl, P.D., Gordon, S., 1999. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189, 1961–1972.
- (44) Llorca, O., 2008. Extended and bent conformations of the mannose receptor family. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1302–1310.
- (45) Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (Hrsg) 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*. Kapitel 34, 8. Auflage Springer, Heidelberg.
- (46) Lüllmann-Rauch, R., 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Thieme, Stuttgart; New York.
- (47) Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., Steinman, R.M., 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 151, 673–684.
- (48) Mallegol, J., van Niel, G., Heyman, M., 2005. Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 11–16.
- (49) Martin, R., Nauta, A.J., Ben Amor, K., Knippels, L.M.J., Knol, J., Garssen, J., 2010. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes* 1, 367–382.
- (50) Martinez-Pomares, L., 2012. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 92, 1177–1186.
- (51) Martinez-Pomares, L., Reid, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S., Wong, S.Y.C., 2003. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* 73, 604–613.
- (52) Mayer, L., Eisenhardt, D., Salomon, P., Bauer, W., Plous, R., Piccinini, L., 1991. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100, 3–12.
- (53) Mayrhofer, G., Spargo, L.D., 1989. Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine. *Immunol. Cell Biol.* 67 ( Pt 4), 251–260.
- (54) McKenzie, E.J., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Lucas, A.D., Harris, J., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2007. Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J. Immunol.* 178, 4975–4983.

- (55) Miron, N., Cristea, V., 2012. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 405–412.
- (56) Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341.
- (57) Mueller, M., 2005. *Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy*, 2. Auflage, Spie, Washington.
- (58) Mulisch, M., Welsch, U. (Hrsg.) 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*. Kapitel 13, 18. Auflage, Springer, Heidelberg.
- (59) Müller, S., Lory, J., Corazza, N., Griffiths, G.M., Z'graggen, K., Mazzucchelli, L., Kappeler, A., Mueller, C., 1998. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* 152, 261–268.
- (60) Nakazawa, A., Watanabe, M., Kanai, T., Yajima, T., Yamazaki, M., Ogata, H., Ishii, H., Azuma, M., Hibi, T., 1999. Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa. *Gastroenterology* 117, 536–545.
- (61) Nancey, S., Holvöet, S., Graber, I., Joubert, G., Philippe, D., Martin, S., Nicolas, J.-F., Desreumaux, P., Flourié, B., Kaiserlian, D., 2006. CD8+ cytotoxic T cells induce relapsing colitis in normal mice. *Gastroenterology* 131, 485–496.
- (62) Ni, J., Chen, S.F., Hollander, D., 1996. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 39, 234–241.
- (63) Niedergang, F., Kweon, M.-N., 2005. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol.* 13, 485–490.
- (64) Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.
- (65) Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R., 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98, 694–702.
- (66) Østvik, A.E., Granlund, A.V.B., Torp, S.H., Flatberg, A., Beisvåg, V., Waldum, H.L., Flo, T.H., Espevik, T., Damås, J.K., Sandvik, A.K., 2013. Expression of Toll-like receptor-3 is enhanced in active inflammatory bowel disease and mediates the excessive release of lipocalin 2. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 502–511.

- (67) Otte, J.-M., Cario, E., Podolsky, D.K., 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1054–1070.
- (68) Pabst, O., Mowat, A.M., 2012. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 5, 232–239.
- (69) Perera, L., Shao, L., Patel, A., Evans, K., Meresse, B., Blumberg, R., Geraghty, D., Groh, V., Spies, T., Jabri, B., Mayer, L., 2007. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 298–307.
- (70) Renz-Polster, H., Krauzig, S. (Hrsg.), 2008. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer, München; Jena.
- (71) Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., Rescigno, M., 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6, 507–514.
- (72) Rock, K.L., Shen, L., 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* 207, 166–183.
- (73) Royer, P.-J., Emara, M., Yang, C., Al-Ghouleh, A., Tighe, P., Jones, N., Sewell, H.F., Shakib, F., Martinez-Pomares, L., Ghaemmaghami, A.M., 2010. The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J. Immunol.* 185, 1522–1531.
- (74) Schachtschneider, K.M., Yeoman, C.J., Isaacson, R.E., White, B.A., Schook, L.B., Pieters, M., 2013. Modulation of systemic immune responses through commensal gastrointestinal microbiota. *PLoS ONE* 8, e53969.
- (75) Schmidt, R.F., Lang, F. (Hrsg.) 2007. *Physiologie des Menschen*, Kapitel 9, 30. Auflage, Springer, Heidelberg.
- (76) Schünke, S., Schulte, E., Schumacher, U. (Hrsg.) *Prometheus Lernatlas der Anatomie*. Georg Thieme, Stuttgart, New York
- (77) Shao, L., Kamalu, O., Mayer, L., 2005. Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. *Immunol. Rev.* 206, 160–176.
- (78) Siegmund, B., Lehr, H.A., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., 2001. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13249–13254.

- (79) Silva, M.A., 2009. Intestinal dendritic cells and epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 436–453.
- (80) Stahl, P.D., Rodman, J.S., Miller, M.J., Schlesinger, P.H., 1978. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1399–1403.
- (81) Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S., 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
- (82) Steiniger, B., Falk, P., Lohmüller, M., van der Meide, P.H., 1989. Class II MHC antigens in the rat digestive system. Normal distribution and induced expression after interferon-gamma treatment in vivo. *Immunology* 68, 507–513.
- (83) Stern, L.J., Potolicchio, I., Santambrogio, L., 2006. MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 64–69.
- (84) Stockinger, B., Veldhoen, M., Martin, B., 2007. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 19, 353–361
- (85) Takahashi, K., Donovan, M.J., Rogers, R.A., Ezekowitz, R.A., 1998. Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell Tissue Res.* 292, 311–323.
- (86) Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 26, 104–110. (veränderte Abbildung des Mannoserezeptors aus dieser Quelle auf dem Buchdeckel verwendet)
- (87) Tlaskalová-Hogenová, H., Stepánková, R., Hudcovic, T., Tucková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Zádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovská, D., Reháková, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., Kokesová, A., 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93, 97–108.
- (88) Van Kooten, C., Banchereau, J., 2000. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67, 2–17.
- (89) Van Niel, G., Heyman, M., 2002. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. II. Intestinal epithelial cell exosomes: perspectives on their structure and function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G251–255.
- (90) Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337–349.

- (91) Vidal, K., Samarut, C., Magaud, J.P., Revillard, J.P., Kaiserlian, D., 1993. Unexpected lack of reactivity of allogeneic anti-Ia monoclonal antibodies with MHC class II molecules expressed by mouse intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 151, 4642–4650.
- (92) Wende, E., Laudeley, R., Bleich, A., Bleich, E., Wetsel, R.A., Glage, S., Klos, A., 2013. The complement anaphylatoxin C3a receptor (C3aR) contributes to the inflammatory response in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *PLoS ONE* 8, e62257.
- (93) Westendorf, A.M., Fleissner, D., Hansen, W., Buer, J., 2010. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 11–18.
- (94) Wileman Thomas E., n.d. Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein.
- (95) Wiman, K., Curman, B., Forsum, U., Klareskog, L., Malmnäs-Tjernlund, U., Rask, L., Trägårdh, L., Peterson, P.A., 1978. Occurrence of Ia antigens on tissues of non-lymphoid origin. *Nature* 276, 711–713.
- (96) Wollenberg, A., Mommaas, M., Opiel, T., Schottdorf, E.-M., Günther, S., Moderer, M., 2002. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J. Invest. Dermatol.* 118, 327–334.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AJ	Adherens junction
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
CED	Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
EDB	Elektronendichtes Körperchen (electron-dense body)
EE	frühes Endosom (early endosom)
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IEC	Intestinale Epithelzelle (intestinal epithelial cell)
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laserscanmikroskop
MC	Morbus Crohn
mDAI	modified Disease Activity Index
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIIC	„MHC II-enriched compartment“
MLB	Multilamelläres Körperchen (multilamellar body)
mLK	mesenterische Lymphknoten
MR	Mannoserezeptor
MVB	Multivesikuläres Körperchen (multivesicular body)
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
PP	Peyer-Plaques
SPF	spezifisch-pathogenfrei
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>eff</sub>	Effektor T-Zelle
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
TJ	Tight junction
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
T <sub>reg</sub>	Regulator T-Zelle

## 9 ANHANG

Tabelle 8: Materialien der Immunfluoreszenzfärbung

Material	Hersteller
Glaskolben 2l	
Objekträger mit Gewebe	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Fettstift	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Objekträgerhalterung	
Glasküvetten 2	
Pinzette	Bochem, Weilburg, Deutschland
Zellstoff	Igefa, Ahrensfelde, Deutschland
Eppendorfgefäße	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorfgefäßständer	Rudi Müller Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Feuchte Kammer	
Stoppuhr	Oregon Scientific, Rom, Italien
Glasstab	
Deckgläschen 24x50mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 9: Reagenzien der Immunfluoreszenzfärbung

Reagenz	Hersteller
PBS-Waschpuffer**	
destilliertes Wasser	
NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aceton/Methanol-Fixierung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antikörper Isotypkontrolle	
IgG2a Ratte-anti-Maus	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
IgG1 Ratte-anti-Maus	eBioscience, Aachen, Deutschland
primäre Antikörper	AbD Serotec, Oxford, Groß Britannien
sekundäre Antikörper	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
3% Normalserum der Maus	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Hoechst-Farbstoff	Camplex, Wiesbaden, Deutschland
Moviol	Polysciences, Warrington, Groß Britannien

\*\*Zur Herstellung einer fünffach konzentrierten Stammlösung des PBS wurden 90g Natriumchlorid (NaCl), 3,085g Natriumhydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und 14,24g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in 1800ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 1N Natronlauge auf 7,4 eingestellt und mit Aqua dest. auf 2000ml aufgefüllt. Bei der immunhistochemischen Färbung wurde eine 1:5 verdünnte Lösung des Puffers verwendet.

Tabelle 10: Material und Reagenzien anderer Methoden

Material	Hersteller
Dextran Sodium Sulfat (DSS)	TdB Consultancy, Uppsala, Schweden
Hämocult Test	Beckmann Coulter, Krefeld-Fischeln, Deutschland
Skalpell	Feather Industries, Toronto, Kanada
Einbettkapseln	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cryo Tubes	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Gefriermedium	Tissue Tec, Miles, Elkhart, USA
Kryostatmesser	Feather Industries, Toronto, Kanada
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Erythrosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eukitt-Einbettmedium	Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Entelan-Einbettmedium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 11: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Koloskop Aida-Vet™ Videoendoskopie	Storz, Tuttlingen, Deutschland
Kryostat CM30505	Leica, Nussloch, Deutschland
Auflichtmikroskop Laborlux 11	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Serienschnittmikrotom, Jung Autocut 2055	Leica, Nussloch, Deutschland
Wasserbad	Medizin-und Labortechnik GmbH, Schnakenberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Zeiss 2 plus Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Laserscanmikroskop LSM 510 meta	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

## 10 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. med. habil. Jürgen Büning für die Einführung in dieses interessante Forschungsthema, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und große Unterstützung. Nicht nur seine fachliche Kompetenz und Gründlichkeit sondern auch seine Leidenschaft für den Arztberuf machen ihn für mich heute zu einem Vorbild. Von ihm lernen zu dürfen hat mich in vielerlei Hinsicht für meine berufliche Zukunft geprägt.

Bei Heidi Schlichtig, Dipl. biol. René Pagel und Harry Manfeldt möchte ich mich für das Bereitstellen von Materialien, die geduldige Unterstützung beim Erlernen der Methoden und der Bedienung der Geräte sowie die freundliche und vertrauensvolle Begleitung und Hilfestellung bedanken. Sie haben mir meine Zeit im Labor sehr angenehm gemacht.

Gina Lilienthal und Rebecca Heier gilt mein Dank für die Korrektur und die konstruktive Kritik der Arbeit.

Ph. D. George Kollias aus dem Alexander Fleming Institut in Athen danke ich für das Zurverfügungstellen von Gewebe und Informationen zu den NMRI-Mäusen.

Dr. Werner Niklas aus dem DKFZ Heidelberg möchte ich für die Überlassung des Gewebes der TNF-Mäuse und ihrer gesunden Kontrollen danken.

Bei PD Dr. med. Christian Sina und Dr. med. Florian Bär bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung des Gewebes und der Daten der Colitis-Mäuse.

Prof. Dr. med. J. Westermann danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und der erforderlichen Materialien und Geräte zur Durchführung meiner experimentellen Versuche im Institut für Anatomie.

Herrn Prof. Dr. med. H. Lehnert gilt mein Dank für die Möglichkeit meine Promotion in der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck erlangen zu können.

Von Herzen Dankesagen möchte ich auch meiner Familie. Meine Eltern und Schwiegereltern haben mich bei der Betreuung unserer Kinder unterstützt. Mein Mann Martin hat mich durch seinen liebevollen und verständnisvollen Rückhalt stets hochgehalten und mir zudem bei der Erstellung des Designs der Arbeit sehr geholfen. Meinen beiden kleinen Töchtern danke ich dafür, dass sie alle Entbehrungen vorwurfslos hingenommen haben und ich danke ihnen auch für die positive Energie, die sie mir jeden Tag geschenkt.

## 11 LEBENS LAUF



## Persönliche Daten:

Name Henrike Hacker  
 Geburtsdatum 14.12.1988  
 Nationalität deutsch

## Schulbildung/Ausbildung:

08/1999 - 07/2007 Gymnasium Sanitz  
 07/2007 - 09/2007 Ausbildung Rettungssanitäter

## Hochschulstudium:

seit 10/2007 Studium der Humanmedizin an der  
 Universität zu Lübeck

## Zeitraum der Dissertation:

08/2010 - 09/2012 Durchführung der experimentellen Arbeit

mitzwischenzeitlicher Unterbrechung von bis zu 4 Monaten wegen Geburt und Betreuung der ersten Tochter sowie Praktika und Vorbereitung auf Klausuren des regulären Studiums

09/2012 – 03/2014 Verfassen der Dissertationsschrift

mitzwischenzeitlicher Unterbrechung von mehreren Wochen wegen Geburt und Betreuung der zweiten Tochter sowie Vorbereitung auf Klausuren des regulären Studiums

Lübeck, den 15.07.2014