

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr., Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. [Melbourne])

**Expression des kostimulatorischen Moleküls B7h (ICOS-Ligand) auf
intestinalen Epithelzellen von Patienten mit chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen**

Thorsten Wachs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. I. Förster, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf (schriftl. Beurteilung)
1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker (mündl. Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne)
3. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 26.01.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Einführung in das Immunsystem.....	1
1.2 B7h als Mitglied der B7-Familie	3
1.2.1 B7h – Genlokalisierung und molekulare Struktur.....	3
1.2.2 B7h – Expressionsmuster	4
1.2.3 ICOS (inducible costimulator) als Rezeptor für B7h.....	5
1.2.4 Rolle des B7h/ICOS-Signalweges in der Immunantwort	6
1.3 Überblick über die restlichen B7-Familienmitglieder und deren Rezeptoren	9
1.4 Intestinales Immunsystem	11
1.4.1 Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT).....	11
1.4.2 Allgemeiner Aufbau und Funktion der intestinalen Epithelzelle.....	12
1.4.3 Immunologische Rolle der intestinalen Epithelzelle.....	13
1.4.4 Erzeugung einer lokalen und systemischen Immunität durch das Zusammen- spiel von GALT und follikelassoziiertem Epithel im Darm	16
1.5 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	17
1.5.1 Epidemiologie	17
1.5.2 Ätiologie und Pathogenese.....	18
1.5.3 Pathologie und Klinik.....	20
1.5.4 Behandlung und Prognose.....	22
2. ZIEL DER ARBEIT.....	25
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Material.....	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung	28
3.1.3 Enzyme.....	30
3.1.4 Antikörper und Detektionssysteme	30

3.1.5	Primer und Sonden	31
3.1.6	Gewebeproben.....	32
3.1.6.1	Gewebeproben für die Laser-Capture-Microdissection	32
3.1.6.2	Gewebeproben für die Immunhistochemie	35
3.1.7	Verbrauchsmaterial	35
3.1.8	Geräte	36
3.2	Methoden.....	37
3.2.1	Immunhistochemische Färbungen.....	37
3.2.1.1	Gewebsasservierung	39
3.2.1.2	Herstellung und Lagerung von Kryo- und Paraffinschnitten	39
3.2.1.3	Erstellen eines Färbeprotokolls unter Verwendung eines Antikörpers gegen B7h.....	40
3.2.1.3.1	Austestung für Gefriergewebe	40
3.2.1.3.2	Austestung für Paraffingewebe	42
3.2.1.4	Beschreibung verwendeter Detektionssysteme	43
3.2.1.5	Lichtmikroskopische Auswertung.....	45
3.2.2	Untersuchung der B7h-Expression mittels Laser-Capture-Microdissection (LCM) und anschließender RT-PCR.....	46
3.2.2.1	Auswahl des verwendeten Gewebematerials für die LCM.....	46
3.2.2.2	Funktionsprinzip der LCM.....	47
3.2.2.3	LCM-Apparatur.....	48
3.2.2.4	Vorbereitungen zur LCM	49
3.2.2.5	Dissektionsvorgang	50
3.2.2.6	Zelllyse und RNA-Extraktion	51
3.2.2.7	Reverse Transkription	52
3.2.2.8	Funktionsprinzip des TaqMan [®] -PCR Assays	53
3.2.2.9	Konstruierung von Primern und Sonden für die TaqMan [®] -PCR.....	54
3.2.2.10	Durchführung des TaqMan [®] -PCR Assays	55
3.2.2.11	Das ABI PRISM [™] 7700 Detection System.....	57
3.2.2.12	Datenauswertung mittels einer relativen Quantifizierungsstrategie	57
3.2.2.12.1	Prinzip der Methodik ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode).....	57
3.2.2.12.2	Voraussetzungen für ihre Anwendung	58
3.2.2.13	Statistische Analysen	59

3.2.3	Experimente mit humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL).....	59
3.2.3.1	Isolation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut	59
3.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	60
3.2.3.3	Stimulation der PBL.....	61
3.2.3.4	Oberflächenfärbung der PBL und deren Analyse mittels eines Fluoreszenz- aktivierten Zellsortierers (FACS).....	61
3.2.3.5	Separierung CD19-negativer und CD19-positiver Zellen aus PBL.....	62
3.2.3.6	RNA-Extraktion	63
3.2.3.7	Reverse Transkription und Real-Time PCR.....	63
4.	ERGEBNISSE	64
4.1	Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen B7h.....	64
4.1.1	Gefrierschnitte – Erstellung eines Färbeprotokolls.....	64
4.1.1.1	Rachen- und Gaumenmandel	67
4.1.1.2	Dickdarm.....	71
4.1.2	Paraffinschnitte – Erstellung eines Färbeprotokolls.....	71
4.1.2.1	Gaumenmandel.....	73
4.1.2.2	Dickdarm.....	75
4.1.3	Zusammenfassung immunhistochemischer Ergebnisse	77
4.2	Laser-Capture-Microdissection und Real-Time RT-PCR	78
4.2.1	Bilddokumentation des Dissektionsvorgangs	78
4.2.2	Voraussetzungen für die Anwendung der relativen Quantifizierung.....	81
4.2.3	Primäranalyse der TaqMan-Daten	84
4.2.4	B7h-Expression der CD19-negativen und CD19-positiven PBL.....	86
4.2.5	B7h-Expression im Tonsillenepithel und in der Lamina propria mucosae des Dickdarms	87
4.2.6	B7h-Expression auf intestinalen Epithelzellen	88
4.2.6.1	Bei Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung	88
4.2.6.2	Bei Patienten mit Colitis Ulcerosa	89
4.2.6.3	Bei Patienten mit Morbus Crohn.....	90
4.2.7	Zusammenfassender Vergleich der untersuchten Gewebe.....	91
4.2.8	Validitätskontrollen.....	94

5. DISKUSSION	95
5.1 Expression von B7h auf intestinalen Epithelzellen	96
5.2 Unterschied in der B7h-Expression intestinaler Epithelzellen zwischen entzündeter und nicht entzündeter Mukosa von CED-Patienten.....	98
5.3 Unterschied in der B7h-Expression intestinaler Epithelzellen zwischen gesunden Menschen und CED-Patienten.....	100
5.4 Neuartige therapeutische Optionen bei CED mit B7h als Zielstruktur	105
6. ZUSAMMENFASSUNG	106
7. VERZEICHNIS DER TABELLEN.....	108
8. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....	109
9. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	113
10. LITERATURVERZEICHNIS	116
DANKSAGUNG	136

1. Einleitung

1.1 Einführung in das Immunsystem

Um eine Immunantwort des Organismus auf ein Pathogen oder Fremdmaterial auszulösen, muss dieses zuerst als Antigen (Ag) erkannt werden, ehe es dann effektiv bekämpft werden kann. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Immunantworten, die jedoch zumeist im engen Zusammenspiel miteinander agieren. Zum einen ist hier die *angeborene* oder *innate* Immunantwort zu nennen, die sich aus zellulären Komponenten wie den natürlichen Killerzellen oder den Phagozyten und aus Effektormolekülen wie z. B. Lysozym, Komplementfaktoren oder weiteren enzymatischen Bestandteilen in den Schleimhautsekreten zusammensetzt. Zum anderen gibt es die *erworbene* oder *adaptive* Immunantwort, deren Bestandteil die Lymphozyten sind sowie deren sezernierte Produkte – Antikörper und Zytokine. Die innate Immunität bietet den ersten Schutz gegen Pathogene, reagiert jedoch antigenunspezifisch; dies bedeutet, dass nur eine begrenzte Anzahl an Molekülen zur Verfügung steht, die bestimmte, für bakterielle oder virale Pathogene typische Antigene erkennen. Ein immunologisches Gedächtnis oder eine Anpassung an bestimmte Pathogene entsteht nicht. Im Gegensatz dazu zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch eine Ag-spezifische Reaktion aus, die zwar beim ersten Antigenkontakt mit zeitlicher Verzögerung eintritt, jedoch bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen infolge der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses schneller und sehr spezifisch und dadurch effektiver wirkt.

Die zelluläre Komponente der adaptiven Immunität lässt sich in die sog. B- und T-Lymphozyten (-Zellen) untergliedern. Beide Zellarten stammen von den lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks ab und begeben sich nach einem Reifungsprozess in den primär lymphatischen Organen (Knochenmark im Falle der B-Zellen und Thymus im Falle der T-Zellen) auf eine fortwährende Zirkulation zwischen Blut und den sekundär lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Milz und MALT). Bei Antigenkontakt beginnen die Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen zu proliferieren und sich zu Effektor- oder Gedächtniszellen weiter zu differenzieren. Die B-Zellen entwickeln sich nach Aktivierung über den antigenbindenden B-Zellrezeptor (BZR) sowie über zusätzlich unterstützende Signale durch aktivierte T-Zellen zu Plasmazellen. Diese sezernieren monoklonale antigenspezifische Antikörper, die das extrazelluläre Pathogen entweder über

mehrere mögliche Wege zur Abtötung oder zur Neutralisation bringen. Die Effektorzellen der T-Lymphozyten werden durch $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen repräsentiert. Die $CD8^+$ -T-Lymphozyten – oder auch zytotoxische T-Zellen genannt – erkennen mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) intrazelluläre Antigene, die über das Oberflächenmolekül aller kernhaltigen Zellen, namens MHC I, dargeboten werden. Ihre Hauptaufgabe liegt in dem Abtöten virusinfizierter Zellen. Die $CD4$ tragenden T-Lymphozyten lassen sich nochmals in Th1- und Th2-Zellen unterscheiden, wobei nun intra- und extrazelluläre Antigene über das MHC-Klasse-II-Molekül dem TZR präsentiert werden. Das MHC II wird z.T. durch hochspezialisierte Zellen wie z.B. dendritische Zellen exprimiert, diese werden als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen eine Vielzahl von Zellen in der Lage ist, MHC II zu exprimieren und extern aufgenommenes Antigen zu präsentieren. Die Einleitung einer bestimmten Th-Zell-Immunantwort entscheidet darüber, ob es eher zu einer zellvermittelten entzündlichen Reaktion durch Aktivierung von Makrophagen (Th1-Zellen) oder eher zu einer humoralen Immunität durch Aktivierung von B-Zellen (Th2-Zellen) kommt (Janeway et al. 2002, S. 1-36; 340-343).

Hinsichtlich einer erfolgreichen T-Zell-Aktivierung, -Differenzierung und -Effektorphase hat sich ein Modell der „zwei Signale“ etabliert. Dieses besagt, dass hierfür neben einer spezifischen Antigenerkennung durch den TZR (= Signal 1), noch weitere akzessorische Signale (= Signal 2) durch kostimulatorische Moleküle notwendig sind (Lenschow et al. 1996, McAdam et al. 1998, Bretscher 1999, Chambers & Allison 1999, Chambers 2001, Sharpe & Freeman 2002). Bleibt nach Antigenkontakt eine solche Kostimulation aus, hat dies ein gezieltes Absterben (Apoptose) oder einen anergen Zustand der T-Zelle zur Folge. Dieser Fall bedeutet, dass die T-Zelle die Fähigkeit verliert zu proliferieren und ihre Effektorfunktion auszuführen (Jenkins & Schwartz 1987, Quill & Schwartz 1987, Schwartz 1997).

1.2 B7h als Mitglied der B7-Familie

Einige der wichtigsten kostimulatorischen Moleküle sind in zwei Superfamilien zusammengefasst, nämlich in der B7- und der CD28-Familie. Während die CD28-Familie eine Vielzahl kostimulatorischer Rezeptoren beinhaltet, umfasst die B7-Gruppe die Liganden. Sie weisen bezüglich ihrer Aminosäuren-Sequenz im Menschen untereinander eine Homologie von 23 – 41% (B7-Familie) bzw. 13 – 33% (CD28-Familie) auf und zeigen in ihrer Tertiärstruktur jeweils eine ähnliche Faltung (Henry et al. 1999, Mueller 2000, Carreno & Collins 2002). Die Liganden bestehen bis auf zwei Ausnahmen (B7-H3 u. B7S1) aus einer zytoplasmatischen, transmembranären und einer extrazellulären Komponente, die wiederum in eine Immunglobulin-ähnliche variable (distal) und konstante (proximal) Domäne aufgeteilt ist. Die Rezeptoren werden jeweils als disulfidgebundene Homodimere exprimiert, wobei jede Kette (Dimer) ebenfalls aus einer zytoplasmatischen, transmembranären, aber nur aus einer variablen Domäne zusammengesetzt ist (s. Abb. 1.1). Dennoch sind sowohl die Proteine der Liganden als auch die der Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie zuzuordnen (Ling et al. 2000, Mueller 2000).

B7h (B7 homologous protein) – das im Zentrum der vorliegenden Untersuchung steht – wurde erstmals 1999 von Swallow et al. als homologes Protein zu den beiden bereits bekannten, kostimulatorischen Molekülen B7-1 und B7-2 beschrieben und damit der B7-Familie zugeordnet. In weiteren Studien findet man es auch unter den Namen B7RP-1 (B7-related protein 1: Yoshinaga et al. 1999), hGL50 (human GL50: Ling et al. 2000), B7-H2 (B7 homologue 2: Wang et al. 2000) und LICOS (ligand of ICOS: Brodie et al. 2000).

1.2.1 B7h – Genlokalisierung und molekulare Struktur

Als Mitglied der B7-Familie besitzt B7h auch ihren typischen Proteinaufbau (s. 1.2). Humanes und murines B7h weisen eine Übereinstimmung von 48% auf. Seine Identität mit B7-1 und B7-2 beläuft sich auf ungefähr 25% (Carreno & Collins 2002).

Lokalisiert ist es beim Menschen auf Chromosom 21 und bei der Maus wahrscheinlich auf Chromosom 10 (Carreno & Collins 2002).

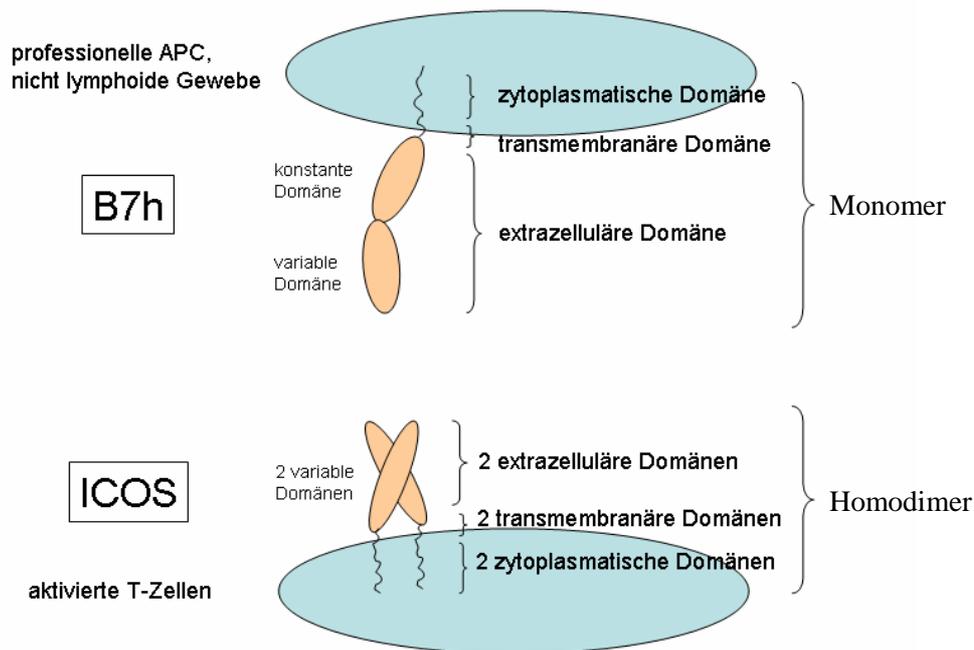


Abbildung 1.1: Proteinstruktur von B7h und seinem Rezeptor ICOS mit Angabe der B7h- und ICOS-exprimierenden Zellen

1.2.2 B7h – Expressionsmuster

Mittels Untersuchungen auf mRNA-Ebene (Ling et al. 2001) konnten beim Menschen zwei relevante Splice-Varianten nachgewiesen werden, die sich in der Sequenz (Exon 6) der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden. Ob dies zugleich eine mögliche Variante für eine alternative Signal-Transduktion darstellt, ist noch ungeklärt. Während die eine – hGL50 genannt – ausschließlich in Milz, Lymphknoten und Leukozyten nachgewiesen wurde, zeigt die andere – B7h, B7-H2, LICOS oder B7RP-1 genannt – hingegen eine zusätzliche Expression in allen bisher untersuchten Geweben, wie Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Plazenta, Skelettmuskel, Knochenmark, Kolon, Ovar, Prostata, Hoden, Thymus, Tonsille (Ling et al. 2001). Die mRNA-Level liegen zwar in diesen Geweben deutlich unter denen in lymphoiden Organen, die meisten können aber durch LPS-Behandlung, die zu einer Erhöhung des TNF α -Spiegels führt, induziert bzw. gesteigert werden (Swallow et al. 1999). Während bei einer Stimulation mit TNF α die B7h-Expression auf der Oberfläche von B-Zellen und Monozyten ebenfalls hochreguliert werden kann, führt diese Art der Behandlung auf dendritischen Zellen zu einer Herunterregulierung (Yoshinaga et al. 2000). Swallow und

Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass die Expression von B7h-mRNA nach einem systemischen LPS-Stimulus in der Milz herunter-, in vielen nichtlymphatischen Geweben und auch auf Fibroblasten allerdings aufreguliert wird. Analysen mittels ICOS-Fusionsproteinen, die direkt das an der Zelloberfläche exprimierte B7h-Molekül detektieren können, zeigen im Menschen eine konstitutive B7h-Präsenz auf ruhenden B-Zellen, Monozyten und einigen dendritischen Zellen (Aicher et al. 2000). Diese Expression lässt sich mit $\text{IFN}\gamma$ noch weiter steigern (Swallow et al. 1999, Aicher et al. 2000). Wie B7-1 und B7-2 lässt sich auch B7h auf einer kleinen Subpopulation von CD3^+ -T-Zellen nachweisen (Ling et al. 2000).

Liang et al. (2002) entwickelten ein Modell für die Regulierung der B7h-Expression auf naiven und aktivierten B-Zellen, in dem die folgenden drei Faktoren eine wichtige Rolle spielen: der BZR, IL-4 und CD40. Dabei führt sowohl die Aktivierung des BZR als auch die des IL-4-Rezeptors allein und in Kombination zu einer Herunterregulierung der B7h-Expression. Eine Kostimulation über CD40 hingegen erwies sich als effektiver Gegenspieler zu den beiden zuvor erwähnten negativen Modulatoren. Eine Interaktion von CD40 mit CD40L war im Stande, die oben beschriebene Herunterregulierung nach B-Zell-Aktivierung vollständig zu verhindern.

Immunhistochemisch konnte bisweilen eine B7h-Expression auf Endothelzellen (Khayyamian et al. 2002), Keratinozyten, Langerhanszellen und einigen Untergruppen dendritischer Zellen (Witsch et al. 2002), sowie auf tubulären Epithelzellen (Wahl et al. 2002) und Makrophagen (Totsuka et al. 2003) nachgewiesen werden. Im Vergleich des humanen B7h-Expressionsmusters mit dem einer Maus scheinen sich bezüglich Lokalisation und Stärke geringe Unterschiede abzuzeichnen.

1.2.3 ICOS (inducible costimulator) als Rezeptor für B7h

Als Bindungspartner für B7h konnte der Rezeptor ICOS identifiziert werden (Hutloff et al. 1999), der auch unter den Namen H4 (Buonfiglio et al. 2000), ALIM (Tamatani et al. 2000) oder CRP-1 (Yoshinaga et al. 1999) in der Literatur zu finden ist. ICOS wird nicht auf ruhenden, sondern nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert (Hutloff et al. 1999). Diese Expression wird hauptsächlich durch Signale beeinflusst, die durch den TZR und durch das kostimulatorische Molekül CD28 vermittelt werden (Coyle et al. 2000, McAdam et al. 2000). Zusätzlich wurde auch eine Expression auf natürlichen Killerzellen (NK) nachgewiesen (Ogasawara et al. 2002).

1.2.4 Rolle des B7h/ICOS-Signalweges in der Immunantwort

Da ICOS sowohl auf kürzlich aktivierten T-Zellen als auch auf T-Gedächtniszellen nachzuweisen ist, scheint es nicht nur in der primären, sondern auch in der sekundären Immunantwort eine Rolle zu spielen. Nach TZR-Stimulation wird ICOS auf zuvor noch naiven T-Zellen nach ungefähr 12 Stunden hochreguliert und erreicht nach weiteren 36 Stunden sein Maximum (Mages et al. 2000). Verglichen mit CD28 leistet ICOS während der initialen T-Zellaktivierung in Bezug auf die IL-2-Ausschüttung und die damit verbundene T-Zellproliferation einen nur sehr geringen Beitrag (Yoshinaga et al. 1999, McAdam et al. 2000, Wang et al. 2000, Yoshinaga et al. 2000). Es ist zwar imstande, über die niedrige Produktion von IL-2 eine anfängliche T-Zellexpansion einzuleiten, sie jedoch aber nicht aufrechtzuerhalten. Vielmehr scheinen andere durch ICOS-Stimulation sezernierte Zytokine im späteren Verlauf der T-Zellantwort eine tragende Rolle zu spielen. Neben der Produktion von IL-4, IL-5, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF (Hutloff et al. 1999, McAdam et al. 2000) kommt vor allem der Sekretion von IL-10 eine besondere Bedeutung zu, da sie sich stark in Menge und Effektivität von der durch CD28 vermittelten Sekretion unterscheidet (Yokochi et al. 1982, Linsley et al. 1996). Somit lässt sich jeweils trotz einiger sich überlappender und ergänzender Funktionen eine dominierende Stellung der kostimulatorischen Moleküle CD28 und ICOS zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Immunantwort erkennen. Während CD28 seine Wichtigkeit in der Initiierung einer Immunantwort besitzt, indem es u.a. durch IL-2 die klonale T-Zellproliferation herbeiführt, übernimmt ICOS u.a. durch Erhöhung des IL-10-Spiegels eher Funktionen in der weiteren Th-Zelldifferenzierung und der Effektorphase.

Mit Hilfe von Untersuchungen an verschiedenen Infektionsmodellen (Kopf et al. 2000, Bonhagen et al. 2003), Autoimmunerkrankungen, Transplantationsmodellen (Özkaynak et al. 2001) und sonstigen Krankheitsmodellen (allergische Atemwegserkrankungen [Tesciuba et al. 2001, Gonzalo et al. 2001], rheumatoide Arthritis [Iwai et al. 2002]) konnte gezeigt werden, dass ICOS, welches zwar auf beiden Th-Zelllinien (Th1 und Th2) induziert werden kann, aber nur auf Th2-Zellen nach wiederholter Stimulation auch länger exprimiert bleibt, wesentlich zur Regulation beider Th-Antworten beiträgt. Unter manchen Umständen scheint es jedoch wie CD28 die Th2-Antwort durch Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 besonders zu fördern. Die Sekretion Th2- oder Th1-typischer Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ und die daraus resultierende Effektorfunktion hängt dabei anscheinend von verschiedenen

Faktoren ab, wie z.B. der Art des Antigens, Lokalisation der Entzündungsreaktion und der Chronizität der Immunantwort (Bonhagen et al. 2003).

Die Komplexität der verschiedenen Funktionen soll am Beispiel der experimentellen Autoimmunenkephalomyelitis (EAE) verdeutlicht werden. Die EAE ist eine Th1-vermittelte Autoimmunkrankheit, die durch MOG (Myelin Oligodendrozyt Glykoprotein) -spezifische CD4⁺-T-Zellen ausgelöst wird. Dabei führt interessanterweise die Blockade des ICOS/B7h-Signalweges während der Anfangsphase der Immunantwort, die der erstmaligen Antigenpräsentation von APCs gegenüber den T-Zellen (= Priming) gleichkommt, zu einem schwereren Krankheitsverlauf der EAE (Rottman et al. 2001). Auch ICOS-defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Empfänglichkeit für die EAE auf (Dong et al. 2001 a). Beide Fälle gehen mit einer erhöhten Produktion von IFN γ einher. Schaltet man jedoch den ICOS/B7h-Signalweg zu einem späteren Zeitpunkt aus, der ungefähr der T-Zell-Migration in das zentrale Nervensystem entspricht, so ist damit eine eindeutige Verbesserung des Krankheitszustandes zu erzielen (Rottman et al. 2001). Während die Reduzierung des EAE-Schweregrades über die sonst proinflammatorische Wirkung von ICOS in der Effektorphase zu erklären ist, liefert die nun fehlende Unterstützung einer protektiven Th2-Antwort – die normalerweise mitunter durch ICOS geleistet wird – und die daraus folgende verstärkte Th1-Antwort die wahrscheinlichste Erklärung für die Verschlechterung in der Initiationsphase. Andererseits wäre auch die Beeinträchtigung regulatorischer T-Zellen (T_R) auf Grund einer gestörten IL-10-Produktion eine mögliche Ursache (Carreno & Collins 2002). Diese These wird durch Akbari et al. (2002) in einem Asthma-ähnlichen Mausmodell bekräftigt, in dem die Entwicklung und die inhibitorische Funktion von T_R-Zellen nicht nur von IL-10, sondern auch von der Interaktion zwischen ICOS und B7h abhängig sind.

Im Gegensatz dazu ist bei einer fehlenden Interaktion von CD28 mit B7-1 und B7-2 z.B. in CD28-defizienten Mäusen (Perrin et al. 1999) keine EAE zu induzieren, da hier von vornherein keine klonale T-Zellproliferation mehr zu erreichen ist.

Eine weitere wichtige Rolle kommt dem ICOS/B7h-Signalweg in der T-Zell-abhängigen B-Zell-Hilfe und der daraus resultierenden humoralen Immunantwort zu. Besonders gut verdeutlicht wird dies an ICOS-knock-out-Mäusen. Auffällig dabei ist vor allem ein Defekt in der Formierung von lymphoiden Keimzentren, die demnach kleiner und in der Anzahl reduziert sind, und im Wechsel der Immunglobulin-Isotypklassen nach einer primären oder sekundären Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen (McAdam et al. 2001, Dong et al. 2001 a, Dong et al. 2001 b). Die Immunreaktion auf T-Zell-unabhängigen Antigenen ist

frei von den oben geschilderten Defekten (Tafari et al. 2001). Weiterhin lassen sich diese Fehlfunktionen durch sehr starke entzündliche Reize oder einer Kostimulation mit CD40 überbrücken, was möglicherweise auf eine Ausführung dieser Funktionen über eine Regulation der ICOS-induzierten CD40-Expression schließen lässt (McAdam et al. 2001). Manche Beobachtungen an diesen Mäusen unterscheiden sich von denen, die an ICOS^{-/-}-Mutanten beim Menschen gemacht wurden. Während in jungen Mäusen die Anzahl und der Reifegrad der B-Zellen sowie der Spiegel an IgM im normalen Bereich liegen, ist beim Menschen sowohl eine stark reduzierte Menge an B-Zellen und IgM als auch eine Reifungsstörung von B-Zellen feststellbar (Grimbacher et al. 2003). In beiden Spezies sind jedoch Anzahl, Funktion und Differenzierung der T-Zellen unbeeinflusst. Obwohl die Interaktion von ICOS mit B7h zur Hochregulierung einiger Chemokinrezeptoren beiträgt (Gonzalo et al. 2001), die wiederum auf die gerichtete Migration von T-Zellen wirken, ist ein solcher Defekt als Ursache für die vorliegende fehlende B-Zell-Hilfe auszuschließen (Smith et al. 2003). Trotzdem lässt die enge örtliche Beziehung von ICOS⁺-Th-Zellen (bevorzugt Keimzentren und umgebende T-Zellzone) zu B7h⁺-B-Zellen (verstreut über den ganzen Follikel) in den sekundär lymphatischen Geweben eine sonstige durch ICOS-exprimierende T-Zellen geleistete B-Zell-Hilfe vermuten (Yoshinaga et al. 1999, Mages et al. 2000).

Zusammenfassend kann man nun die Rolle von ICOS⁺CD4⁺-T-Zellen in der Regulation der Immunantwort in folgenden Gesamtkontext bringen (Coyle & Gutierrez-Ramos 2001). Wenn gereifte, Antigen beladene dendritische Zellen in sekundär lymphatischen Organen in Kontakt mit antigenspezifischen T-Zellen treten, entwickeln sich nach Stimulation über den TZR (interagiert mit MHC II auf DC's) und nach Kostimulation über CD28 (interagiert mit B7-1 und B7-2 auf DC's) geprägte T-Helferzellen. Kurz nach Aktivierung wird auf den Th-Zellen eine Menge von Molekülen hochreguliert, wie u.a. das proinflammatorisch wirkende ICOS und die inhibitorisch wirkenden CTLA-4 und PD-1. Über die Interaktion von ICOS mit B7h auf B-Zellen wird – teils direkt, teils indirekt – einerseits die Reifung antigenspezifischer B-Zellen zu Plasmazellen und Gedächtniszellen gefördert und andererseits die weitere Differenzierung der Th-Zellen zu Th1-/Th2-Effektor- oder Gedächtniszellen veranlasst. Kommt es hingegen zu einer Bindung von CTLA-4 mit B7-1 oder B7-2, die eine etwa 20- bis 100fach höhere Affinität besitzt als mit CD28 (Linsley et al. 1994), bzw. von PD-1 mit PD-L1 oder PD-L2, wird die Entwicklung einer effektiven Immunantwort unterdrückt.

Neben all diesen wichtigen Funktionen von ICOS/B7h hinsichtlich CD4⁺-T-Zellen beeinflusst jener Signalweg auch die CD8⁺-T-Zellantwort. Vor allem in der sekundären Immunantwort

beweist sich ICOS/B7h in der Zerstörung von Tumorzellen als effektiv. Dies wird jedoch nicht durch eine Erhöhung der zytotoxischen Aktivität, sondern durch eine gesteigerte Produktion von Zytokinen wie IL-2 und IFN γ erreicht (Liu et al. 2001, Wallin et al. 2001). Ebenfalls diskutiert wird eine eventuelle negative Regulation der zellvermittelten Immunantwort durch diesen Signalweg, da erhöhte Spiegel von ICOS und B7h in Tumorgewebe gefunden wurden. Eine mögliche Erklärung wäre die daraus resultierende Bevorzugung einer Th2-Antwort, was zusätzlich durch den Nachweis einer gesteigerten Sekretion von IL-10 bekräftigt wird (Chen et al. 2003).

Ogasawara et al. (2002) konnten zeigen, dass auch natürliche Killerzellen in ihrem aktivierten Zustand ICOS exprimieren und dadurch zur Tumorabwehr beitragen. Hierbei liegt sowohl eine Erhöhung der zytotoxischen Aktivität als auch der Zytokinproduktion wie z.B. von IFN γ vor.

Im Gegensatz zur B7h-Expression auf APCs ist die Funktion der ubiquitären Expression auf peripheren Geweben noch nicht verstanden.

1.3 Überblick über die restlichen B7-Familienmitglieder und deren Rezeptoren

Die mit Sicherheit am besten untersuchten Moleküle sind der Rezeptor CD28 zusammen mit seinen Bindungspartnern B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Während CD28 konstitutiv auf naiven und aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Lenschow et al. 1996), sind seine Liganden teils konstitutiv (B7-2), teils nach Induktion (B7-1) ausschließlich auf lymphoiden Geweben vorzufinden (Freeman et al. 1991, Freeman et al. 1993). Eine Interaktion dieser Bindungspartner führt beispielsweise über eine erhöhte Zytokinausschüttung, v.a. IL-2, (Thompson et al. 1989) oder über eine Induzierung anti-apoptischer Gene (Boise et al. 1995, Lanzavecchia et al. 1999) zu einer T-Zell-Aktivierung. Die meisten T-Zell-abhängigen Immunantworten benötigen zwingend diesen stimulierenden Signalweg, und nur wenige sind davon unabhängig (Shahinian et al. 1993, Watts & Benedetto 1999). Kommt es jedoch zu einer Bindung der B7-1/-2-Moleküle mit dem für sie ebenfalls als Rezeptor fungierenden Protein CTLA-4 (cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4), resultiert daraus eine immunsuppressive Wirkung, die über eine Inhibierung der T-Zell-Aktivierung vermittelt

wird. Die immunregulatorische Notwendigkeit von CTLA-4, das nur auf bereits induzierten T-Zellen exprimiert wird (Chambers et al. 2001, Egen et al. 2002), wird am Phänotyp CTLA-4-defizienter Mäuse verdeutlicht. Diese Mäuse sterben einige Wochen nach Geburt auf Grund einer lymphoproliferativen Erkrankung mit anschließender Organdestruktion (Tivol et al. 1995, Waterhouse et al. 1995).

Die bisher erwähnten Rezeptoren mit ihren Liganden werden zu den klassischen kostimulierenden Molekülen gezählt. Diesen stehen zusätzlich relativ neu entdeckte Proteine gegenüber, deren Untersuchungen auf die Existenz noch weiterer Familienmitglieder schließen lassen. Eines von ihnen ist der Rezeptor PD-1 (programmed death-1). Er konnte bisher auf aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen (Agata et al. 1996, Nishimura & Honjo 2001) und einem Teil doppelt negativer Thymozyten (Nishimura et al. 1996) nachgewiesen werden. Er interagiert mit den Liganden PD-L1 und PD-L2, die ein wesentlich breiteres Expressionsmuster zeigen und somit nicht nur auf stimulierten APCs und lymphoiden Organen (Milz, Lymphknoten, Thymus), sondern auch teils in einer viel größeren Ausprägung in der immunologischen Peripherie (Plazenta, Lunge, Herz, usw.) vorhanden sind. Werden die erwähnten Moleküle nach Stimulation (z.B. $\text{IFN}\gamma$) in ihrer Expression hochreguliert, führt dies ähnlich der Funktion von CTLA-4 zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation, Zytokinproduktion und des Zellzyklus (Freeman et al. 2000, Latchman et al. 2001). Auf Grund des ubiquitären Vorkommens von PD-L1 und -L2 und der negativ immunregulatorischen Wirkung bei Interaktion mit PD-1 scheint dieser Signalweg eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zu spielen (Carreno & Collins 2002). Diese Hypothese lässt sich durch das Auftreten von Autoimmunerkrankungen (Nishimura et al. 1999, Nishimura et al. 2001) und starker Lymphozytenproliferation in PD-1-defizienten Mäusen unterstützen.

Das erst 2001 entdeckte Mitglied der B7-Familie B7-H3 (Chapoval et al. 2001) scheint hingegen wie all die neueren B7-Mitglieder wiederum ein sehr breit gestreutes Expressionsmuster zu besitzen, das von aktivierten Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen über lymphoide Gewebe bis hin zu allen möglichen nicht lymphoiden Organen reicht. Der entsprechende Rezeptor, der noch nicht identifiziert ist, aktiviert das Immunsystem über T-Zell-Proliferation (CD4^+ und CD8^+), Zytokinproduktion ($\text{IFN}\gamma$) und Steigerung der zytotoxischen Aktivität der CD8^+ -T-Zellen.

Die beiden erst 2003 entdeckten B7-Mitglieder B7-H4 (Sica et al. 2003) und B7S1 (Prasad et al. 2003), deren Rezeptoren jeweils noch nicht bestimmt werden konnten, zeigen bezüglich der T-Zell-Immunität einen inhibitorischen Effekt (z.B. Abschwächung von Proliferation u. zytotoxischer Aktivität). Mittels RNA-Analysen wurde im Gegensatz zu manchen FACS-Untersuchungen eine breite Expression sowohl in lymphoiden als auch nichtlymphoiden Organen beider Moleküle nachgewiesen.

1.4 Intestinales Immunsystem

1.4.1 Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT)

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT = gut associated lymphoid tissue) gehört zu einem der spezifischen Immunsystemkompartimente, die in direktem örtlichen und funktionellen Zusammenhang mit verschiedenen Schleimhäuten stehen und zusammenfassend auch MALT (mucosa associated lymphoid tissue) genannt werden. Verglichen mit peripheren Lymphknoten und der Milz unterscheidet sich das schleimhautassoziierte Immunsystem zum einen durch eine weitgehende Beschränkung der Immunantwort auf eines der speziellen Kompartimente, in dem sie auch ausgelöst wurde, und zum anderen durch eine auf Grund von spezifischen Rezeptor-Liganden-Interaktionen bestehende Begrenzung einzelner Lymphozyten auf ein bestimmtes Kompartiment. Weiterhin wird dieses Abwehrsystem hauptsächlich mit Antigenen konfrontiert, die direkt über die Schleimhaut ins Innere gelangen und nicht erst über den Blut- oder Lymphweg antransportiert werden (Janeway et al. 2002, S. 432-433).

Betrachtet man das GALT genauer, so lässt es sich anatomisch gesehen in weitere Untereinheiten untergliedern. Beginnend an der hinteren Mundhöhle besteht es aus einem Komplex aus Rachen-, Gaumen-, Zungen- und Tubenmandel (Wadeyerscher Rachenring), aus den sog. Peyerschen Plaques (PP) im Dün- und Blinddarm und aus vereinzelt Lymphfollikeln im Dick- und Mastdarm (Pabst et al. 1994; Janeway et al. 2002, S. 433). Neben diesen organisierten lymphatischen Strukturen gibt es auch einzelne, verstreut sitzende Lymphozyten, die entweder in der Lamina propria (LP) der Darmwand oder in deren Epithel lokalisiert sind. Die einen – als „Lamina propria Lymphozyten (LPL)“ bezeichnet – haben ihren Ursprung wohl in den PP, aus denen sie nach Antigenkontakt über efferente

Lymphbahnen auswandern und letztendlich dem Blutweg folgend über hochendotheliale Venolen in der LP wieder einwandern. Diese Population setzt sich aus T-Effektorzellen, die meistens den Oberflächenmarker CD4 tragen, und Plasmazellen zusammen, die für den hohen IgA-Spiegel im sezernierten Darmschleim (Mucus) verantwortlich sind (Tlaskalova-Hogenova et al. 2002). Die anderen – als intraepitheliale Lymphozyten (IEL) bezeichnet – stellen meist CD8⁺-T-Zellen dar, die neben dem häufig vertretenen α : β -TZR zum Teil einen ungewöhnlichen Oberflächenphänotyp wie einen γ : δ -TZR aufweisen. Diese Zellen mit dem zuletzt genannten Rezeptor scheinen über einen direkten Zellkontakt mit dem Epithel zur Instandhaltung der Epithelzellbarriere bei Infektion oder Verletzung der Enterozyten mitzuwirken (Janeway et al. 2002, S. 434-436). Im Gegensatz zu den LPL sind die IEL wahrscheinlich eine eigen- und darmständige Zellpopulation, die den Thymus nicht durchlaufen hat (Rocha et al. 1994).

Während die eben beschriebenen Zellen (LPL und IEL) somit vorwiegend mit effektorischen Aufgaben betraut sind, wird die Induktion einer Immunantwort in den organisierten Strukturen der solitären Lymphfollikel und der Peyerschen Plaques hervorgerufen. Letztere gleichen einem breitflächigen Zusammenschluss einzelner Follikel, deren Gesamtzahl sich pro PP bis auf ca. 25 Stück belaufen kann. Zwischen den Follikeln, die dem Hauptansammlungsort von B-Zellen entsprechen, liegt die sog. Interfollikularregion mit ihren T-Zellen und den hochendothelialen Venolen, die als Aus- und Eintrittspunkt für die dort lokalisierten Lymphozyten dienen. Über den Follikeln befindet sich ein spezifisches ins Lumen vorgewölbtes, gemischtes B- und T-Zellkompartiment (= Domregion), das mit einem eigens charakteristischen Epithel überdeckt ist (Pabst et al. 1994, Otto 2001).

1.4.2 Allgemeiner Aufbau und Funktion der intestinalen Epithelzelle

Das intestinale Epithel lässt sich hinsichtlich Aufbau und Funktion grob in zwei Formen aufteilen, nämlich in ein follikelassoziertes (FAE) und ein restliches, nicht follikelassoziertes Epithel (NFAE). Diese zuletzt erwähnte Epithelart ist aus mikrovillitragenden Enterozyten, schleimsezernierenden Becherzellen und enteroendokrinen Zellen zusammengesetzt. Auf diese Weise ist es optimal an seine Hauptaufgaben der weiteren Nahrungsverdauung und der Resorption angepasst. Im Gegensatz dazu besteht das FAE hauptsächlich aus Enterozyten, die jedoch mit hochspezialisierten sog. M-Zellen ergänzt sind. Jenen M-Zellen fehlt an ihrer

apikalen Membran der sonst übliche Bürstensaum. Stattdessen sind sie dort vielfach klein gefaltet, was ihnen den Namen der „Mikrofaltenzelle“ gab. Nicht nur diese hochspezialisierten M-Zellen, sondern auch die Enterozyten des FAE sind mit Hilfe einiger struktureller und funktioneller Unterschiede gegenüber dem NFAE eng in immunologische Prozesse eingebunden (Pabst et al. 1994, Sierro et al. 2000).

1.4.3 Immunologische Rolle der intestinalen Epithelzelle

Trotz der oben beschriebenen spezielleren Aufgaben des follikelassoziierten Epithels wurde in den letzten Jahren immer mehr die immunologische Bedeutung aller Enterozyten bekannt. Dies zeigt sich allein schon im Beitrag der intestinalen Epithelzellen zur angeborenen, unspezifischen Immunantwort. Die Basis hierbei bildet die Barrierefunktion des einschichtigen Zylinderepithels, welches mit seinen interzellulärverbindenden sog. „tight junctions“ eine selektiv permeable Schicht darstellt und über die Freisetzung bestimmter Mediatoren zur eigenen Integrität beiträgt (Nusrat et al. 1994). Wichtig dabei ist die dadurch entstehende Zellpolarität, die einen gerichteten Transport oder Membraneinbau verschiedener Moleküle wie z.B. von Rezeptoren erlaubt. Auf diese Weise ist auch die Transzytose der massenhaft von Plasmazellen in der Lamina propria gebildeten dimerischen IgA-Antikörper (in geringen Maßen auch IgM) möglich, die potentiell pathogene Antigene erkennen und durch Bindung neutralisieren können. Weiterhin werden durch Sekretion eines zähen Mucus Bakterien eingehüllt und eine anschließende Interaktion oder Infektion der Epithelzelle erschwert. Diese Schleimproduktion kann sogar durch verschiedene potentielle Darmnoxe angeregt werden (Epple et al. 1997). Hinzu kommen weitere unspezifische Faktoren in Form von Enzymen und anderen Proteinen, die für das Abtöten von Bakterien zuständig sind. Dazu zählen beispielsweise das Lysozym (verdaut die Zellwand einiger Bakterien), Komplementfaktoren und sog. Defensine (werden aus den Paneth'schen Körnerzellen am Grund der Krypten konstitutiv oder nach Stimulation sezerniert) und die Laktoperoxidase (bildet freie Radikale) oder das Protein Laktoferrin (fängt das für ein Bakterienwachstum essentielle Eisen ab) (Tlaskalova-Hogenova et al. 2002).

Im Gegensatz hierzu zeichnet sich das erworbene Immunsystem durch eine spezifische, gezielte Immunantwort gegen bestimmte Antigene aus. Inzwischen wird es immer deutlicher, dass die intestinalen Epithelzellen nicht etwa nur passive Mitspieler darstellen, sondern

vielmehr eine äußerst zentrale Rolle in einem Netzwerk von Botenstoffen und Rezeptor/Liganden-Interaktionen einnehmen. Interessant dabei ist, dass sie neben dem auf fast allen Körperzellen exprimierten MHC-I-Molekül, das die jeweils vorhandenen intrazellulären Proteine den CD8⁺-T-Zellen präsentiert, auch das früher sonst nur von professionell antigenpräsentierenden Zellen (pAPCs) her bekannte MHC II exprimieren. In vivo ist seine Präsenz vor allem im Epithel des Magens und in den follikelassoziierten Stellen des Darmes in Form einer basolateral restringierten Membranexpression nachgewiesen (Hirata et al. 1986, Hershberg et al. 1998). Auf diese Weise könnten Antigene nach einer apikalen Einschleusung in die Zelle am gegenüberliegenden Ende mittels MHC II den immunologischen Effektorzellen dargeboten werden, die eine Positivität für den Oberflächenmarker CD4 aufweisen (Pitman & Blumberg 2000). Die Effektivität der Antigenprozessierung und -präsentation kann durch proinflammatorische Stimuli wie IFN γ noch weiter gesteigert werden beziehungsweise werden ohne stattfindende Aktivierung wesentlich höhere Mengen von Antigen für eine MHC II-Prozessierung benötigt (Hershberg et al. 1997). Hinzu kommt ein weiterer, Klasse-I-ähnlicher, antigenpräsentierender Komplex, der zu der Familie der nicht klassischen MHC-Moleküle gehört, nämlich CD1d. Seine zwei bisweilen beschriebenen Isoformen werden auf der apikalen bzw. auf sowohl apikaler als auch basolateraler Membran der Epithelzellen exprimiert (Kim et al. 1999, Somnay-Wadgaonkar et al. 1999, Kim et al. 2000, van de Wal et al. 2003), wobei die zuletzt erwähnte Form eine Interaktion mit einer bestimmten Subpopulation der NK-T-Zellen einzugehen scheint. Während die von diesen Zellen nach Stimulation in großen Mengen produzierten Zytokine IL-4 und IFN γ eine Aktivierung des Immunsystems bewirken, würde die nach CD1d-Bindung bei intestinalen Epithelzellen beobachtete Sezernierung von IL-10 hingegen eine immunsuppressive Wirkung zeigen (Colgan et al. 1999).

Zuzüglich zu jenen antigenpräsentierenden Komplexen verleihen einige auf den intestinalen Epithelzellen exprimierten Moleküle diesen Zellen auch die Fähigkeit, T-Zellen über eine Kostimulation zu einer Proliferation anzuregen. CD86 ist eines dieser Proteine, von denen gezeigt wurde, dass es als eines der wichtigsten kostimulatorischen Moleküle auf APCs zwar nicht konstitutiv, aber nach Induktion in einem entzündlichen Milieu auf Darmepithel exprimiert werden kann (Nakazawa et al. 1999). Ebenfalls in einer Entzündung hochreguliert wird das sog. Lymphocyte function associated antigen (LFA-3), welches anscheinend selektiv T-Helferzellen zu aktivieren vermag (Framson et al. 1999). Demgegenüber steht ein anderes

Protein namens gp180, dessen Ziel wiederum nur CD8⁺-T-Zellen darstellen. Hierbei scheint es mehr regulatorische als zytotoxische Effekte zu entwickeln (Campbell et al. 2002). Neben diesen stimulierend wirkenden Molekülen gibt es auch solche wie das „biliary Glykoprotein“ (BGP), die eine inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem entfalten. Dieses Protein wird auf intestinalen IEL exprimiert, wobei man seinen noch nicht identifizierten Bindungspartner auf den intestinalen Epithelzellen vermutet (Pitman & Blumberg 2000).

Ein anderer Ansatzpunkt von Seiten des Epithels zum immunologischen Geschehen beizutragen, ist die Rekrutierung von Entzündungszellen über eine Sekretion von Botenstoffen (Chemokine) oder eine Expression von sog. Adhäsionsmolekülen. Als solch ein Protein wäre beispielsweise ICAM-1 zu nennen, das nach Infektion oder Zytokinstimulation nochmals in dessen örtlicher Beziehung hochreguliert wird und eine Anheftung von neutrophilen Granulozyten zur Folge hat. IL-8 und das „macrophage-inflammatory-protein-1 α “ (MIP-1 α) gehören hingegen zur großen Gruppe der Chemokine, die verletzungs- und infektionsspezifisch sezerniert werden können. In beiden erwähnten Fällen führt dies zu einer auserwählten Anlockung von Neutrophilen bzw. von Makrophagen an den Ort des Geschehens (Mac Dermott et al. 1998).

Ein noch viel komplizierteres Netzwerk zur Beeinflussung einer Immunantwort liefert das Zusammenspiel aus bestimmten Mediatoren, sog. Zytokinen, und deren Rezeptoren. Durch das äußerst breitflächige Muster der Zytokinsekretion der intestinalen Epithelzelle kann unter anderem gezielt Einfluss auf den funktionellen Zustand verschiedener Immunzellen genommen werden. Das Wirkspektrum reicht damit von der Regulation des Aktivierungsgrades bestimmter Lymphozytenpopulationen (IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-7, IL-10, IL-15, TGF β , SCF, TSH) über die Steigerung der sekretorischen IgA-Produktion (IL-6) bis hin zur Beeinflussung der intestinalen Barrierefunktion durch das Epithel (IL-10, IFN γ , TNF α) oder der intestinalen Flüssigkeitssekretion (PGE₂) (Schuerer-Maly et al. 1994, Reinecker et al. 1996, Eckmann et al. 1997, Schmitz et al. 1999 b).

Das Darmepithel ist jedoch in der Lage, solche Botenstoffe nicht nur zu produzieren, sondern auch selber über die Expression verschiedenster Zytokinrezeptoren (Reinecker & Podolsky 1995, Panja et al. 1998) die Signale dieser Mediatoren zu empfangen. Dabei werden die Zytokine hauptsächlich von Entzündungszellen aus der näheren Umgebung freigesetzt. Sie bewirken eine Veränderung des Enterozytenphänotyps, indem sie z.B. die Oberflächenexpression einiger Moleküle, wie das kostimulierende Molekül CD86, das

antigenpräsentierende Protein MHC II oder den polymeren Ig-Rezeptor hochregulieren. Auf diese Weise werden wieder neue Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Zellen geschaffen oder aber nur ein Beitrag zur angeborenen Immunantwort geleistet (z.B. über eine Sekretion von Komplementfaktoren) (Pitman & Blumberg 2000).

1.4.4 Erzeugung einer lokalen und systemischen Immunität durch das Zusammenspiel von GALT und follikelassoziertem Epithel im Darm

Da die Zusammenhänge in diesem Bereich noch sehr unzureichend verstanden sind, kann man nur ein grobes, zum Teil hypothetisches Modell, zur Entstehung einer im Darm ausgelösten Immunantwort skizzieren (Neutra et al. 2001; Janeway et al. 2002, S. 432-442). Zu Beginn werden allerlei Makromoleküle und Mikroorganismen in die M-Zellen des follikelassozierten Epithels aufgenommen und anschließend entweder im subepithelialen Raum wieder ausgeschleust, um dort von dendritischen Zellen internalisiert zu werden, oder es findet eine direkte Interaktion der M-Zellen mit B-Gedächtniszellen statt. Daraufhin können in beiden Fällen die prozessierten Antigene lokal oder nach Migration in die interfollikuläre Zone beziehungsweise in die mesenterialen Lymphknoten den T-Zellen präsentiert werden. Diese, zu Effektorzellen gereift, erreichen über den Lymph- und letztendlich über den Blutweg die Schleimhaut verschiedenster Organsysteme (MALT). Die Auswanderung wird durch das Mukosa-spezifische Adhäsionsmolekül MAdCAM-1 gesteuert. Auf diese Weise ist nicht nur eine effektive lokale Bekämpfung von Pathogenen im Darm, sondern auch eine protektive Prägung des regionalen Immunsystems anderenorts möglich.

Dabei muss im Darm eine schwierige Balance eingehalten werden, einerseits gefährliche Antigene schnell und kraftvoll abzuwehren, andererseits jedoch gegen harmlose Antigene keine Immunreaktion auszulösen (orale Toleranz). Bezogen auf die sich bietende enorme Angriffsfläche von 200 – 300 m² oder auf die Kontaktierung mit einer unvorstellbaren Menge harmloser Nahrungsantigene sowie einer physiologischen Besiedlung von 10¹⁴ Bakterien ist diese Leistung ein erstaunliches Kunstwerk.

1.5 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Unter dem Sammelbegriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)“ versteht man eine Gruppe von idiopathischen chronischen Entzündungen des Darmes. Der Ausdruck „idiopathisch“ bedeutet, dass deren genaue Pathogenese noch nicht geklärt werden konnte. Üblicherweise verbindet man aber mit CED nur die beiden wichtigsten Vertreter dieser Gruppe, nämlich die Erkrankungen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Letztere wurde schon 1875 von Wilks und Moxon als separates Krankheitsbild entdeckt. Knapp 60 Jahre später wurde die Darmerkrankung Morbus Crohn erstmals von Crohn, Ginsberg und Oppenheimer (1932) als Ileitis terminalis bzw. I. regionalis beschrieben.

(Wenn nicht zusätzliche Literatur angegeben ist, wurde als Hauptquelle Friedman & Blumberg in Harrisons Innere Medizin 2, 2003 verwendet.)

1.5.1 Epidemiologie

Obwohl beide Erkrankungen vor allem hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes und des histopathologischen Befundes einige Unterschiede aufweisen, ähneln sich ihre epidemiologischen Daten. Die Häufigkeit (Prävalenz) in Deutschland wird für MC ungefähr auf 20 – 40 pro 100 000 Einwohnern geschätzt und für CU auf ca. 40 – 90 (Otto 2001). Die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen (Inzidenz) von MC liegt in den Vereinigten Staaten von Amerika pro 100 000 Einwohnern bei 7 Erkrankungen und von CU bei 11. Beide Werte sind ungefähr mit den Inzidenzraten in Mitteleuropa vergleichbar (Köhne & Stallmach 1999). Während die Prävalenz von CU über die letzten Jahren relativ stabil geblieben ist, steigt diejenige von MC noch in erheblichem Maße weiter an (Otto 2001), so dass sich das ursprüngliche Inzidenzverhältnis von 5:1 heute mittlerweile zu 2:1 verschoben hat (Karlinger et al. 2000). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Auftrittswahrscheinlichkeit von CED nicht gleichmäßig unter der Weltbevölkerung verteilt ist, sondern eine starke Abhängigkeit von regionalen, ethnischen und sozioökonomischen Gesichtspunkten festzustellen ist. So besteht z.B. ein eindeutiges Nord-Südgefälle, an dessen Spitze 24,5 CU-Erkrankungen pro 100 000 Einwohnern in Island stehen (Loftus et al. 1998), jedoch nur 0,5 pro 100 000 in Asien und Südamerika zu verzeichnen sind. Auch innerhalb eines Landes erkranken weiße Bevölkerungsgruppen, vor allem Juden, wesentlich häufiger als schwarze oder asiatische

(Karlinger et al. 2000). Ein weiterer geographischer Unterschied besteht in der Häufigkeitsverteilung zwischen Stadt und Land, wobei Bewohner ländlicher Gegenden weitaus seltener besonders an MC leiden. Auch unter Mitgliedern sozial schwächer gestellter Bevölkerungsschichten tritt CED nicht so häufig auf wie unter sozial stärkeren (Karlinger et al. 2000). In den letzten Jahren konnten einige mögliche Faktoren bestimmt werden, die das Erkrankungsrisiko zu beeinflussen scheinen. So besitzt z.B. Rauchen bezüglich CU eine protektive, hingegen im Bezug auf MC eine initiierende Wirkung (Lindberg et al. 1988). Ebenfalls vorbeugend im Hinblick auf CU scheint sich – im Gegensatz zu MC (Andersson et al. 2003) – eine frühe Entfernung des Appendix auszuwirken (Andersson et al. 2001), während die Einnahme von Kontrazeptiva das Risiko, an MC zu erkranken, in etwa verdoppelt. CED kommt bei Männern und Frauen gleich häufig vor, möglicherweise mit einer minimalen Bevorzugung des männlichen Geschlechts bei MC, und zwar hauptsächlich in der Altersgruppe von 15 bis 30 Jahren, wobei ein späterer zweiter Gipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr auffällt. Als sicher erweist sich in der Ätiologie eine genetische Komponente, die sich zum einen in der Assoziation mit genetisch bedingten Syndromen wie dem Ullrich-Turner Syndrom oder einigen Immunschwächeerkrankungen und zum anderen in der familiären Häufung niederschlägt. Dabei zeigen eineiige Zwillinge im Falle von MC eine 67%ige und im Falle von CU immerhin noch eine 8%ige Konkordanz. Bei zweieiigen Zwillingen ist nur noch bei MC eine Konkordanz festzustellen, die sich auf 20% beläuft. Interessanterweise lassen sich sogar oft Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Lokalisation des Befalls und des klinischen Verlaufs in von MC betroffenen Familien finden.

1.5.2 Ätiologie und Pathogenese

Wie schon die Definition von CED besagt (s. 1.5), konnte die Ätiologie von MC und CU bis zum heutigen Zeitpunkt noch immer nicht geklärt werden. Es scheinen sich aber drei Hauptsäulen in der Krankheitsentstehung abzuzeichnen, die sich aus einer genetischen, endogenen (wirtsspezifische Faktoren) und einer exogenen (Umwelteinflüsse) Komponente individuell mit jeweils unterschiedlicher prozentualer Beteiligung zusammensetzen (Ardizzone & Porro 2002). Allein die epidemiologischen Daten (s. 1.5.1) belegen zwar ein genetisches Mitwirken, zeigen zugleich jedoch auch durch die nur unvollständige Konkordanz monozygoter Zwillinge, dass noch weitere exogene Faktoren eine Rolle spielen

müssen (Podolsky 2002, Shanahan 2002, Bonen & Cho 2003). Mittels genomweiter Untersuchungen konnten mögliche krankheitsassoziierte Loci aufgezeigt werden, deren für eine erhöhte CED-Empfänglichkeit verantwortlichen Gene – abgesehen von einer Ausnahme – bis jetzt noch nicht erforscht sind.

Im Gegensatz dazu existiert eine Reihe von exogenen Faktoren, von deren Einfluss auf Entwicklung und Persistenz der Krankheit man überzeugt ist. Neben den bereits unter epidemiologischen Gesichtspunkten erwähnten Faktoren (s. 1.5.1) wird ebenfalls ein ungünstiger Effekt von Seiten eines negativen Stresses (Hart & Kamm 2002) sowie von Medikamenten beispielsweise den entzündungshemmenden nicht-steroidalen Antiphlogistika (Evans et al. 1997) prognostiziert. Weiterhin scheinen der Industrialisierungsstatus eines Landes, möglicherweise durch Unterschiede in Nahrungsmitteln, Hygiene, Infektionen und Impfungen (Ardizzone & Porro 2002), und die intestinale Darmflora eine Rolle zu spielen. Von den genannten Faktoren nimmt die mikrobielle Besiedlung des Darmes möglicherweise die zentrale Stellung ein. So konnte in einem Kolitis-Modell der Maus, bei dem ein Teil der Mäuse seit Geburt unter sterilen Bedingungen gehalten wird, gezeigt werden, dass nur diejenigen Tiere eine spontane Kolitis entwickeln, die unter nicht sterilen Verhältnissen aufgewachsen waren (Rath et al. 2001). Weiterhin würden sowohl das Kolon mit seinem hohen Bakteriengehalt als häufigste Lokalisation der Entzündung (Sartor 1997) als auch das positive Ansprechen der Krankheit auf Antibiotika bzw. Probiotika (s. 1.5.4) nebst vielen anderen Beweisen für diese These sprechen (Shanahan 2000).

Die dritte Säule in der Ätiologie stellen wirtsspezifische Faktoren dar, wie z.B. eine Veränderung der Barrierefunktion des intestinalen Epithels (Schmitz et al. 1999 a, Teller & Beaulieu 2001) oder der Mikrozirkulation (Laroux & Grisham 2001). Manche Autoren sehen in der CED auch klassische psychosomatische Erkrankungen, denen ein ungelöster psychischer Konflikt (z.B. Verlust einer wichtigen Beziehungsperson) zugrunde gelegt wird. Dies ist jedoch von anderer Seite heftig bestritten, da die oft vorzufindenden sich ähnelnden Persönlichkeitsstrukturen von CED-Patienten auch als Resultat und nicht als Ursache zu werten sind (Köhne & Stallmach 1999).

Das Zusammenspiel all dieser Faktoren hat bei genetisch prädisponierten Menschen zur Folge, dass das intestinale Immunsystem über einen längeren Zeitraum in hohem Aktivitätszustand verbleibt. Dies geschieht im Gegensatz zu einer „physiologischen Entzündung“, bei der die Immunantwort nach einer kurzen Aktivierungsphase rasch wieder herunterreguliert wird, um Regenerationsvorgänge einleiten zu können. Eine mögliche

Erklärung für jene „pathologische Entzündung“ liefert ein intrinsischer Defekt, der primär entweder in einer kontinuierlichen Aktivierung oder in den herunterregulierenden Mechanismen liegt, und damit zu einer inadäquaten Antwort auf einen kurzzeitigen Stimulus führt. Die andere Möglichkeit besteht in einer adäquaten Antwort auf einen chronischen Stimulus, der entweder in der normalen luminalen Flora bei vorhandener Fehlfunktion der intestinalen Barriere oder aber in einem spezifischen infektiösen Agens begründet ist (Podolsky 2002). Solch ein Agens konnte jedoch bis jetzt trotz ausgiebiger Untersuchungen und vorübergehender Verdächtigungen einiger Viren und Bakterien wie dem Mycobakterium paratuberculosis nicht gefunden werden (Rowbotham et al. 1995, Frank & Cook 1996, Sechi et al. 2001).

Auf immunologischer Ebene bedeutet dieses, dass eine Imbalance zwischen pro- (z.B. IL-2, IL-4, IL-12, TNF α) und anti-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-10, TGF β) bestehen muss. So konnte für MC eine Th1-lastige Immunantwort nachgewiesen werden, die es ihr über einen Entzündungskreislauf im Verbund mit Makrophagen durch gegenseitige Erhöhung Th1-spezifischer Zytokine (IL-2, IL-12, IL-18, TNF α , IFN γ) ermöglicht, eine transmurale, granulomatöse Entzündung zu erzeugen (Monteleone et al. 1997, Parronchi et al. 1997, Pizarro et al. 1999). Die oberflächliche Entzündung bei CU-Patienten würde eher mit der prognostizierten Th2-lastigen Immunantwort übereinstimmen. Dafür spricht das nachgewiesene Zytokinprofil aus IL-4 und IL-5 (Fuss et al. 1996) und die gesteigerte Produktion von proinflammatorisch wirkenden IgG-Antikörpern, anstatt der sonst üblichen IgA-Moleküle (Otto 2001).

1.5.3 Pathologie und Klinik

Die *Colitis ulcerosa* beginnt meist distal im Rektum und kann sich dann in einer kontinuierlichen Weise nach proximal über das gesamte Kolon ausbreiten. Hierbei bleibt die Entzündung bis auf wenige Ausnahmen, bei denen sie einige Millimeter in das terminale Ileum hineindringt (= Backwash-Ileitis), auf den Dickdarm beschränkt. 40 – 50% zeigen einen ausschließlich rektalen oder rektosigmoidalen Befall. Bei weiteren 30 – 40% hat sich die Erkrankung über das Sigma hinaus ausgedehnt und erscheint in ca. 20% der Fälle als eine Entzündung des gesamten Kolons (= Pankolitis).

Makroskopisch reicht das Erscheinungsbild der Schleimhaut bei einer milden Entzündung von einem Komplex aus ödematöser Schwellung, Rötung und feiner Granulierung bis zu flachen punktförmigen Ulzerationen hin, die im schweren akuten Schub breitflächig konfluieren können und eitrige Auflagerungen bilden. Bei Chronifizierung der Erkrankung und häufigen rezidivierenden Ulzerationen verflacht das Faltenrelief der Dickdarmschleimhaut zunehmend, und es entsteht das typische Bild eines glatten, starren Fahrradschlauches. Darüber hinaus imponieren zwischen den Ulzerationen restliche Schleimhautinseln durch fortwährende Regenerationsvorgänge, die letztendlich auch zu einer Verkürzung und Verengung des Kolons führen, als sog. Pseudopolypen. Mikroskopisch ist eine Beschränkung der entzündlichen Aktivität auf die oberflächlichen Wandschichten (Mukosa und Submukosa) zu erkennen. Das dort liegende dichte Zellinfiltrat besteht aus Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen sowie eosinophilen und besonders neutrophilen Granulozyten. Letztere wandern in die Krypten ein, deren gewöhnliche Architektur sich allmählich in eine verzweigte und ungeordnetere Form verändert, und bilden die fast schon krankheitstypischen Kryptenabszesse. Ansonsten sind die mukosalen Gefäße meist prall gefüllt, und es zeigen sich je nach Schwere der Entzündung fokale sitzende Blutungen (Otto 2001).

Unter klinischen Gesichtspunkten betrachtet korreliert die Krankheitsaktivität im Gegensatz zu Morbus Crohn gut mit dem endoskopisch gewonnenen Bild. Im Vordergrund der Symptomatik stehen blutig-schleimige Durchfälle und krampfartige Abdominalschmerzen. Diese Beschwerden eines akuten Schubes nehmen zu 85% einen chronisch-rezidivierenden Verlauf mit zwischenzeitlich kompletten Remissionen, die selbst bei 10% der Erkrankten nicht mehr zu erreichen sind. Die übrigen 5% erleiden einen fulminanten Verlauf, dessen Mortalität mitunter durch die schwere Komplikation eines toxischen Megakolons relativ groß ist (Herold et al. 2002).

Von den soeben erwähnten klinischen und pathologischen Merkmalen für CU unterscheiden sich diejenigen des *Morbus Crohn* in einigen wichtigen Punkten, die die Differentialdiagnose erheblich erleichtern. So kann MC den gesamten Verdauungstrakt von Mund bis zum After befallen. Mit ca. 45% ist die häufigste Lokalisation in einem kombinierten Befall des terminalen Ileum und Kolon vorzufinden. Isoliert betrachtet ist der Dickdarm (15 – 25%), bei dem das Rektum dann oft ausgespart bleibt, ein wenig seltener betroffen als der Dünndarm (30 – 40%).

Makroskopisch gesehen ist seine diskontinuierliche, segmentale Ausbreitung bezeichnend. Auf diese Weise kommen befallene Schleimhautareale, die sich in Form von Aphthen und kleineren oberflächlichen Exulzerationen bis hin zu tiefen konfluierenden Fissuren zeigen, neben unbefallenen, nicht entzündeten Bereichen zu liegen, was in der Fachliteratur häufig mit einem Pflastersteinrelief verglichen wird. Ebenfalls typisch ist das Vorkommen von pararektalen Fisteln, Abszessen und Stenosen. Verursacht werden letztere meist durch eine ödematöse Verdickung und einer einsetzenden Fibrosierung der Darmwand.

In der Histologie findet man ein lymphoplasmazelluläres, granulozytäres und histiozytäres Infiltrat, welches sich im Gegensatz zur CU über alle Wandschichten hinaus bis zur Serosa ausbreitet. Während sich ein Teil der dort eingewanderten Immunzellen zu aktiven Lymphfollikeln und sog. nicht verkäsenden Granulomen zusammenschließen, bleibt die Kryptenarchitektur meist ungestört. Die makroskopisch beschriebenen Fissuren lassen sich in ihrer typischen Form oft gut darstellen (Otto 2001).

Klinisch dominieren nichtblutige Durchfälle und starke Abdominalschmerzen, sowie Komplikationen, die sich durch die vielseitigen mechanischen Veränderungen im Darm ergeben (z.B. Obstipation, Ileus). Die Krankheit verläuft meist schubweise oder erlangt eine chronische Manifestation (Herold et al. 2002).

Ist eine Einteilung in eines der beiden Krankheitsbilder trotzdem nicht möglich, wird diese nichtklassifizierbare Form der CED als *Colitis indeterminata* bezeichnet. Dazu zählen ungefähr 10% der Fälle (Podolsky 2002).

1.5.4 Behandlung und Prognose

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stehen meist zwei wesentliche Faktoren einer frühen und zielgerichteten Behandlung im Wege. Das eine Problem besteht darin, dass in der Regel ein längerer Zeitraum vom Auftreten erster Symptome bis hin zur Diagnosestellung verstreicht, da häufig zum einen eine relativ unspezifische und klinisch unaufdringliche Symptomatik vorliegt und zum anderen CED-begleitende extraintestinale Manifestationen überwiegen und so von den intestinalen Beschwerden ablenken (Roth & Bernhardt 2000). Die zweite Problematik findet sich in der Tatsache, dass die Ätiologie der CED noch heute weitgehend unverstanden ist, was eine direkte kausale Therapie unmöglich macht. Demnach existieren im Grunde genommen nur drei verschiedene, sich jedoch

ergänzende Behandlungsprinzipien, die allesamt symptomatischen Charakter besitzen. Dabei sind sie in der Lage, Schwere und Länge eines akuten oder chronischen Verlaufes zu reduzieren, Remissionsphasen zu stabilisieren und sekundäre Komplikationen wie Stenosen oder Fisteln zu verhindern beziehungsweise deren Entstehung hinauszuzögern. Diese drei Therapieformen setzen sich aus einer Ernährungstherapie, einer medikamentösen Therapie und einer chirurgischen Intervention zusammen. Die chirurgischen Maßnahmen obliegen einer strengen Indikation und kommen somit nur in lebensbedrohlichen Situationen (z.B. unbeherrschbare Blutungen, Perforation) oder elektiv bei Komplikationen (Stenosen, Fisteln), die bei langen chronischen Verläufen beobachtet werden, zum Einsatz. Auf Grund der Beschränkung der Entzündung auf das Kolon und der daraus resultierenden eventuellen Heilungschance, stellt das bevorzugte Verfahren bei CU-Patienten die Proktokolektomie, hingegen bei MC-Patienten eine streng nach Befallsmuster orientierte minimale Resektion dar (Poggioli et al. 2002). Mittels eines parenteralen oder auch enteralen z.T. speziellen Ernährungsschemas (Elementardiät) kann einerseits eine Korrektur von Mangelernährung und Wachstumsrückstand bei Kindern und andererseits auch eine beträchtliche Abschwächung der Entzündungsaktivität erreicht werden. Während der Einsatz vor allem zur Remissionsinduktion empfohlen wird, scheint er zur Remissionserhaltung eher ungeeignet zu sein. Zurzeit befinden sich mehrere Nahrungssubstanzen wie Glutamine oder kurzkettige Fettsäuren in der Austestung hinsichtlich ihrer Effektivität auf eine direkte Modulation der Immunantwort im Darm (Campos et al. 2002).

Somit bestimmt immer noch ein empirisch zusammengestelltes medikamentöses Stufenschema die CED-Behandlung. Dabei setzt sich dieses Therapiekonzept für beide Krankheitsentitäten aus ungefähr denselben Medikamenten zusammen, denen die meist unspezifische Hemmung der Entzündungsreaktion gemein ist (Karow & Lang-Roth 2003). Grundlage bilden bei milder und moderater Erkrankung, aber auch als Rezidivprophylaxe, die 5-Aminosalicylate (5-ASA). Sie sind relativ gut verträglich und zeigen unter anderem wahrscheinlich über eine Hemmung der Prostaglandin- und Leukotrien-Produktion, sowie der Neutrophilen- und Makrophagenchemotaxis oder der NF- κ B-Aktivierung eine durchaus effektive Wirkung (Nielsen et al. 1988, Podolsky 2002). Bei schweren Schüben ist jedoch eine Primärbehandlung mit Glukokortikoiden unverzichtbar. Ihr starkes anti-inflammatorisches Wirkprofil basiert auf einer inhibitorischen Interaktion mit NF- κ B, welche für die Transkription verschiedener proinflammatorischer Proteine verantwortlich ist, und einer sich ebenfalls auf Genebene gründenden Förderung entzündungshemmender Proteine

(Lüllman & Mohr 1999). Zusätzlich können vor allem in therapierefraktären Fällen einige altbewährte Arzneimittel aus der Gruppe der Immunsuppressiva herangezogen werden (z.B. Azathioprin, Methotrexat oder Ciclosporin). Auch sind neuere Substanzen wie Tacrolimus oder Mycophenolat Mofetil hinzugekommen, die zum Teil selektiv Lymphozytenpopulationen in ihrer Aktivierung oder Proliferation hemmen (Karow & Lang-Roth 2003). Einen ebenfalls positiven Einfluss, besonders bei MC-Patienten, scheinen Antibiotika mit einem Anaerobier einschließenden Wirkspektrum (Metronidazol, Ciprofloxacin) oder auch Probiotika wie *Lactobacillus* spp. zu besitzen (Podolsky 2002).

Hinsichtlich der CED-Therapie scheint der Forschungsschwerpunkt momentan auf einer ganz anderen Medikamentengruppe zu liegen. Ihr Protagonist ist ein Antikörper gegen TNF α (Infliximab[®] u. CDP571), der sowohl lösliches als auch zellgebundenes TNF α bindet und dadurch besonders effektiv ist. Seine Anwendung hat sich besonders in therapieresistenten Fällen und in der Behandlung von Fisteln bei MC bewährt (Present et al. 1999, Rutgeerts 2002). Viele weitere Antikörper oder auch Antisense-Oligonukleotide gegen die meist in CED erhöhten proinflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ (Neurath et al. 1995, Ten Hove et al. 2001, Shand & Forbes 2002), gegen spezifische Oberflächenmarker von Lymphozyten wie CD4 oder gegen Adressine bzw. Adhäsionsmoleküle wie $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und ICAM-1, die das Einwandern von Entzündungszellen in die Mukosa verhindern sollen, befinden sich in Phase 2- oder 3-Studien. Diese zeigen an Kolitis-Modellen der Maus allesamt viel versprechende Ergebnisse, die jedoch keine direkten Rückschlüsse auf die Wirksamkeit im Menschen zulassen (Shand & Forbes 2002). Die einzigen vier „biologischen Substanzen“, die bei CED-Patienten bereits getestet wurden, sind die inhibitorisch wirkenden Zytokine IL-10 und IL-11 (Sands et al. 1999, Schreiber et al. 2000), sowie Antikörper gegen $\alpha_4\beta_7$ und Antisense-Oligonukleotide gegen ICAM-1 (Yacyshyn et al. 1998, Gordon et al. 2001). Ihre Effektivität reicht zwar bei weitem nicht an die von TNF α heran, sie kann aber im Falle von Interleukin möglicherweise durch direkte Applikation in den Darm zum Beispiel mittels gentransferierten *Lactobacillen* oder Adenoviren erhöht werden, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte (Wirtz & Neurath 2003).

Mit einer nach dem heutigen Stand optimalen Therapie hat die Mehrzahl der Patienten eine normale Lebenserwartung. Wegen des erhöhten Risikos für kolorektale Karzinome sind jedoch regelmäßige Kontrollendoskopien notwendig (Herold et al. 2002). Trotzdem sind die Mortalitätsraten laut einer schwedischen Studie für MC-Patienten mit 1,51 bzw. für CU-Patienten mit 1,37 leicht erhöht.

2. Ziel der Arbeit

Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass intestinale Epithelzellen in der Lage sind, Antigen zu prozessieren und anschließend über MHC II zu präsentieren. Auf diesem Wege ist es ihnen ermöglicht, beispielsweise mit T-Zellen zu interagieren und jene auch zu stimulieren. Für eine effektive T-Zell-Stimulation ist jedoch neben dem antigenspezifischen Signal, welches über die Interaktion von einem MHC-gebundenen Peptid mit dem TZR vermittelt wird, auch ein kostimulatorisches Signal erforderlich. Diesbezüglich ist den klassischen kostimulatorischen Molekülen B7-1 und B7-2 anscheinend keine größere Bedeutung in der lokalen Immunregulation des Darmes beizumessen, obwohl sich in der Fachliteratur nur sehr unterschiedliche Angaben über deren Expression auf intestinalen Epithelzellen finden lassen. Fehlt einer antigenpräsentierenden Zelle die Möglichkeit, ein effektives kostimulierendes Signal an die gebundene T-Zelle weiterzuleiten, wird die betroffene T-Zelle anerg. Dieser Vorgang der Anergie-Induktion konnte aber in vitro zwischen den intestinalen Epithelzellen und den mit ihnen interagierenden Zellen wie z.B. den T-Lymphozyten nicht beobachtet werden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Expression von B7h, eines erst kürzlich entdeckten Mitgliedes der B7-Familie, deren Moleküle die nötige Kostimulation liefern können, auf humanen intestinalen Epithelzellen zu untersuchen. Speziell wurde in diesem Rahmen Dickdarmgewebe (Kolon) von CED- (aufgeteilt in eine Morbus-Crohn- und eine Colitis-ulcerosa-Gruppe) und Nicht-CED-Patienten begutachtet, da die genaue Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen noch weitgehend ungeklärt ist. Jedoch scheinen verschiedene genetische Faktoren bei deren Entstehung eine Rolle zu spielen.

Zu diesem Zweck mussten folgende Aufgaben bewerkstelligt werden:

- Immunhistochemische Färbungen von Dickdarmgewebe mit anti-B7h-Antikörpern
- Laser-Capture-Microdissection von intestinalem Epithel und Bestimmung der daraus isolierten B7h-RNA mittels Real-Time RT-PCR zur Bestimmung der exakten Expressionsstärke

Diese Untersuchungen dienen zur Klärung folgender Fragen:

- Wird B7h auf humanen intestinalen Epithelzellen exprimiert und obliegt es dann einer Kinetik bei proinflammatorischen Stimuli?
- Gibt es Unterschiede in der Expressionsstärke von B7h auf intestinalen Epithelzellen aus befallenen und nicht befallenen Darmarealen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen?
- Gibt es Unterschiede in der Expressionsstärke von B7h auf intestinalen Epithelzellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Allgemeinen verglichen mit Epithelzellen gesunder Patienten?

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend sind die verwendeten Materialien nach ihrer Zusammengehörigkeit aufgelistet.

3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, TU München
Aqua ad injectabilia	Delta-Pharma, Pfullingen
BSA	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dako ChemMate™ Antibody Diluent	Dako, Hamburg
Desoxynukleotide	Sigma, Taufkirchen
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Groningen, NL
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Eosin	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
5x First-Strand Buffer	Invitrogen, Groningen, NL
FKS	Biochrom, Berlin
Glykogen (20 mg/ml)	Roche, Penzberg
Hämatoxylin	Dako, Hamburg
HCl	Roth, Karlsruhe
Isopropanol, reinst	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, TU München
Levamisol	Vector, Burlingame, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Methylbutan	Sigma, Taufkirchen
Methyl®Green	Vector, Burlingame, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin
Phenol (wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe

RNase Erase	ICN, Aurora, USA
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Trisma-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl (10 mM, pH 8)	Sigma, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen, Groningen, NL
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Water	Sigma, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.2 Puffer, Lösungen und deren Zusammensetzung

10 x Tris Puffer (0,01 M / pH 7,6)

- 60,5 g Trisma-Base in 800 ml H₂O_{dest} lösen
- x ml HCl (12 N und anschließend 1 N) hinzugeben und pH 7,6 einstellen
- x ml H₂O_{dest} zugeben bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml
- 90 g NaCl zugeben

Bem.: - Lagerung bei RT

- für Tris-Gebrauchslösung Tris (10x) 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnen und anschließend nur kurze Zeit (1-3 Tage) bei 4°C lagern

10 x PBS Puffer

- 95,5 g PBS
- x ml H₂O_{dest} zugeben bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml

Bem.: - Lagerung bei RT

- für PBS-Gebrauchslösung PBS (10x) 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnen, sterilfiltrieren und anschließend bei 4°C lagern

Zellyse-Puffer

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
0,1 mM	EDTA (pH 8,0)
2 %	SDS (pH 7,3)
500 µg/ml	Proteinase K

Formalin (4%, gepuffert)

100 ml	Formalin (37%)
6,5 g	Na ₂ HPO ₄
4 g	NaH ₂ PO ₄
x ml	H ₂ O _{dest} zugeben bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml
x ml	NaOH (10M) zugeben und auf pH 7,4 einstellen

Proteaselösung (0,1%)

50 ml	Tris-Puffer
0,05 g	Protease

Citrat-Puffer (0,01 M / pH 6,0)

21,01 g	Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O)	}	<u>Stammlösung A</u>
1000 ml	H ₂ O _{dest}		

29,41 g	Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x H ₂ O)	}	<u>Stammlösung B</u>
1000 ml	H ₂ O _{dest}		

18 ml	Stammlösung A	}	<u>Gebrauchslösung</u>
82 ml	Stammlösung B		
900 ml	H ₂ O _{dest}		
x ml	NaOH (2 N) zugeben und auf pH 6,0 einstellen		

FACS-Puffer

99,5 %	PBS
0,5 %	BSA

MACS-Puffer

	PBS
2 mM	EDTA
0,1 %	NaN ₃
0,01 %	BSA

3.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K (Protease)	Sigma, Taufkirchen
RNase OUT TM	Invitrogen, Groningen, NL
SuperScript TM II	Invitrogen, Groningen, NL

3.1.4 Antikörper und Detektionssysteme**Tabelle 3.1:** Beschreibung und Verwendungszweck der eingesetzten Antikörper

Spezifität	Klon	Konjugation	Isotyp	Spezies	Bezugsquelle	Methode
h B7h	HIL-93	-----	IgG ₁	Maus	R. Kroczek, Robert-Koch Institut, Berlin	IHC
h B7h	HIL-131	-----	IgG ₁	Maus	R. Kroczek, Robert-Koch Institut, Berlin	IHC
h B7h	HIL-131	PE	IgG ₁	Maus	R. Kroczek, Robert-Koch Institut, Berlin	FACS
h CD3 / h CD19	Simulset IMK Plus	FITC / PE	IgG ₁ / IgG _{2a}	Maus	Becton Dickinson, San Jose, USA	FACS
h CD4	S3.5	R-PE	IgG _{2a}	Maus	Caltag, San Francisco, USA	FACS
h CD8	3B5	TriColor	IgG _{2a}	Maus	Caltag, San Francisco, USA	FACS
h CD19	-----	MicroBeats	IgG ₁	Maus	Miltenyi, Bergisch-Gladbach	MACS
h CD20	B-Ly1	Biotin	IgG _{1κ}	Maus	Southern Biotech, Birmingham, USA	FACS
synth. Hapten	NCG02	-----	IgG ₁	Maus	Dianova, Hamburg	IHC (Isotypen- kontrolle)

Tabelle 3.2: Detektionssysteme und ihr Anwendungsbereich

Detektionssystem	Bezugsquelle	Methode
ABC-alkalische Phosphatase	Vector, Burlingame, USA	IHC
Dako Catalysed signal Amplification System (CSA)	Dako, Hamburg	IHC
Dako ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako, Hamburg	IHC
Dako EnVision+™, Peroxidase, Mouse	Dako, Hamburg	IHC
Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Dianova, Hamburg	IHC
Streptavidin-Peroxidase	Dako, Hamburg	FACS

Tabelle 3.3: Immunhistochemische Farbstoffe

Farbstoff	Bezugsquelle	Umsetzungsenzym
Vector® Blue	Vector, Burlingame, USA	Alkalische Phosphatase
DAB	Dako, Hamburg	Peroxidase
DAB + Nickel	Vector, Burlingame, USA	Peroxidase
Vector® Nova Red	Vector, Burlingame, USA	Peroxidase

3.1.5 Primer und Sonden

Tabelle 3.4: Charakterisierung der verwendeten Primer und Sonden

	Bezeichnung	Lokalisation	Sequenz (5'→3')	Zweck	Methode
B7h	Forward Primer	Position 34, Exon 1	GCAGTCCTGGAC TGCTCTTCCT	Teil-Amplifikation von h B7h - cDNA	TaqMan
	Reverse Primer	Position 112, Exon 3	CCTACCATCGCTC TGACTTCCTT		
	Sonde	Position 70, Exon 2	TCAGCAGCCTTC GAGCTGATACTC AGGAG	Nachweis von h B7h - cDNA	TaqMan
GAPDH	Forward Primer	Bezugsquelle: ABI, Foster City, Kalifornien, USA Lokalisation und Sequenzen nicht veröffentlicht		Teil-Amplifikation von GAPDH - cDNA	TaqMan
	Reverse Primer			Nachweis von GAPDH - cDNA	
	Sonde				

Die Sonde für den B7h-Nachweis wurde am 5'-Ende mit dem Farbstoff FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) und am 3'-Ende mit TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) als Quencher markiert.

Die Sonde für den GAPDH-Nachweis ist am 5'-Ende mit dem Farbstoff VIC und am 3'-Ende wiederum mit dem Quencher TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) markiert.

3.1.6 Gewebeproben

3.1.6.1 Gewebeproben für die Laser-Capture-Microdissection

Für die LCM wurden in Paraffin eingebettete Kolonresektate und –probeexzisionen von Patienten mit sowie ohne CED verwendet. Die Beurteilung des Entzündungsgrades in den Tabellen 3.5 und 3.6 orientiert sich nach den histopathologischen Routine-Befunden der Pathologie des Klinikums rechts der Isar in München, welches auch das Gewebematerial zur Verfügung stellte. Der Entzündungsgrad wurde in folgender Weise bewertet:

- + geringe Entzündung
- ++ mittelgradige Entzündung
- +++ deutlich ausgeprägte, starke Entzündung

Tabelle 3.5: Topographie und Pathologie der für die LCM verwendeten Gewebeproben und deren Patientendaten in der Morbus-Crohn-Gruppe

Morbus-Crohn-Fälle					
Patienten Nr.	Alter	Geschlecht	Gewebeprobe	Histologie des ausgewählten Gewebeblocks	Gruppen - zuordnung
Pat. 1	34	männlich	Coecum, Res.	regelrecht	nicht befallen
			PE C.ascendens	chronische (++) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 2	44	männlich	C.ascendens, Res.	regelrecht	nicht befallen
				chronische (+++) u. floride (+++) Entz.	befallen
Pat. 3	37	weiblich	C.ascendens, Res.	regelrecht	nicht befallen
			Coecum, Res.	chronische (+++) u. floride (++) Entz.	befallen

Pat. 4	44	weiblich	C.ascendens, Res.	regelrecht	nicht befallen
			Coecum, Res.	chronische (++) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 5	34	männlich	C.ascendens, Res.	chronische (+) Entz.	nicht befallen
				chronische (++) u. floride (+) Entz.	befallen
Pat. 6	35	weiblich	PE C.ascendens	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE Sigma	chronische (++) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 7	36	weiblich	PE Coecum	leicht hyperplastisch	nicht befallen
			PE C.descendens	chronische (+) u. floride (+++) Entz.	befallen
Pat. 8	24	weiblich	PE C.ascendens	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE C.transversum	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 9	26	weiblich	C.ascendens, Res.	regelrecht	nicht befallen
			Coecum, Res.	chronische (++) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 10	31	männlich	C.ascendens, Res.	regelrecht	nicht befallen
			Coecum, Res.	chronische (++) u. floride (+) Entz.	befallen
Pat. 11	23	weiblich	PE Sigma	leicht hyperplastisch	nicht befallen
			PE C.descendens	chronische (+) u. floride (+) Entz.	befallen
Pat. 12	21	weiblich	PE Sigma	regelrecht	nicht befallen
			PE Sigma	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 13	26	männlich	C.ascendens, Res.	regelrecht	nicht befallen
			Coecum, Res.	chronische (++) u. floride (+++) Entz.	befallen
Pat. 14	45	männlich	C.transversum, Res.	regelrecht	nicht befallen
				chronische (+++) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 15	44	weiblich	PE C.ascendens	regelrecht	nicht befallen
			PE Coecalklappe	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 16	29	männlich	PE C.transversum	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE C.descendens	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 17	39	männlich	PE Sigma	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE Coecalklappe	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 18	62	weiblich	PE C.descendens	regelrecht	nicht befallen
			PE C.transversum	chronische (++) u. floride (++) Entz.	befallen

Tabelle 3.6: Topographie und Pathologie der für die LCM verwendeten Gewebeproben und deren Patientendaten in der Colitis-ulcerosa-Gruppe

Colitis-ulcerosa-Fälle					
Patienten Nr.	Alter	Geschlecht	Gewebeprobe	Histologie des ausgewählten Gewebeblocks	Gruppen - zuordnung
Pat. 1	33	männlich	PE Rektum	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE C.ascendens	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 2	47	männlich	PE Coecum	postentz. Residuen	nicht befallen
			PE C.descendens	chronische (+) u. floride (++) Entz.	befallen
Pat. 3	25	weiblich	PE Coecum	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE Sigma	chronische (+) u. floride (+) Entz	befallen
Pat. 4	76	männlich	subtotales Colon	chronische (+) Entz.	nicht befallen
				chronische (++) u. floride (++) Entz	befallen
Pat. 5	49	weiblich	PE C.ascendens	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			subtotales Colon	chronische (+++) u. floride (+++) Entz	befallen
Pat. 6	56	männlich	PE rechte Flexur	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			subtotales Colon	chronische (++) u. floride (+++) Entz.	befallen
Pat. 7	52	weiblich	subtotales Colon	chronische (+) Entz.	nicht befallen
			PE Sigma (Polyp)	chronische (+++) u. floride (+) Entz.	befallen

Tabelle 3.7: Topographie und Pathologie der für die LCM verwendeten Gewebeproben und deren Patientendaten in der gesunden Kontrollgruppe (alle Proben sind Resektate von Patienten mit intestinalem Adenokarzinom)

Gesunde Kontrollgruppe					
Patienten Nr.	Alter	Geschlecht	Gewebeprobe	Histologie des ausgewählten Gewebeblocks	Gruppen - zuordnung
Pat. 1	52	männlich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 2	80	weiblich	Coecum	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 3	69	männlich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 4	84	weiblich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 5	67	weiblich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 6	74	männlich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 7	89	weiblich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund
Pat. 8	76	weiblich	rechtes Hemicolon	keine Neoplasie u. Entz.	gesund

3.1.6.2 Gewebeproben für die Immunhistochemie

Als Gewebeproben für die Immunhistochemie wurden Operationsresektate bzw. Probeexzisionen aus lymphatischem (Gaumen- und Rachenmandel) und aus Dickdarmgewebe (gesund und mit CED) verwendet. Dieses Material, welches entweder unter Schockfrieren in Tissue-Teck oder in Paraffin eingebettet wurde, stammte aus verschiedenen Krankenhäusern in München (s. Tab. 3.8).

Tabelle 3.8 : Art und Pathologie der für die Immunhistochemie verwendeten Gewebeproben. PKJ = Privatklinik Josephinum; KrdI = Klinikum rechts der Isar; KrB = Städtisches Krankenhaus Bogenhausen

Gewebeprobe	Diagnose	Einbettung	Bezugsquelle
Gaumenmandel	Tonsillitis	Tissue-Tek	PKJ
Gaumenmandel	Tonsillitis	Paraffin	KrdI
Rachenmandel	adenoide Vegetationen	Tissue-Tek	PKJ
Dickdarm	gesunder Darm	Tissue-Tek	KrdI
Dickdarm	Morbus Crohn	Tissue-Tek	KrdI
mehrere Dickdarm-PE's	Morbus Crohn, Colitis ulcerosa	Paraffin	KrB

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
CapSure™ LCM Caps	Arcturus, Mountain View, USA
Cryomold®	Miles, Elkhart, USA
Einwegklingen	Microm, Walldorf
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Optical Adhesive Cover Starter Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Objektträger, Super frost® (für IHC)	Roth, Karlsruhe
Objektträger (für LCM)	Merck, Darmstadt
Plastikwaren	Becton Dickinson, Heidelberg Biorad, München Eppendorf, Hamburg Falcon, New Jersey, USA NUNC, Wiesbaden
Post-it®	Scotch
Sterilfilter, Millex®	Millipore, Bedford, USA
96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA

3.1.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Entparaffinierungsautomat	Tissue Stainer COT 20; Medite, Burgdorf
Dampfdruckkochtopf	Perfect 2,5l; WMF, Geislingen/Steige
Heizplatte	Severin; Roth, Karlsruhe
Inkubator	OV3; Biometra, Göttingen
Kryostat	Jung CM 3000; Leica, Solms
Kühlzentrifugen	Biofuge fresco; Heraeus, Hanau Biofuge stratos; Heraeus, Hanau Varifuge 3. ORS; Heraeus, Hanau
LCM-Gerät	PXL-200 PixCell Laser Capture Microdissection System; Arcturus Engineering, Mountain View, USA
Mikroskope	DM RBE; Leica, Solms Axiovert 25; Zeiss, Jena Axiolab; Zeiss, Jena
PCR-Maschine	PTC-200; Biozym, Hess. Oldendorf
Rotationsmikrotom	HM 335 E; Microm, Walldorf
Sterilbank	Hera safe; HSP 18, Heraeus, Hanau
Wasserbecken (Streckbad)	TFB 35; Medite, Burgdorf
TaqMan-Apparatur	ABI PRISM™ 7700 Detection System; Applied Biosystems, Foster City, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Um mittels der Immunhistochemie die B7h-Expression von humanen intestinalen Epithelzellen bei Patienten mit CED und einer gesunden Kontrollgruppe untersuchen zu können, wurden Biopsien (PE) von CED-Patienten (jeweils 2 PE's aus makroskopisch befallenen und unbefallenen Darmarealen) gesammelt. Für eine möglichst exakte Interpretation immunhistochemischer Ergebnisse wurden weiterhin sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle benötigt. Letztere entspricht einer Inkubation gleicher Gewebeproben mit einem Antikörper gleichen Isotyps, der jedoch ein synthetisches, im Menschen nicht vorkommendes Hapten erkennt und somit eine falsch positive Färbung durch unspezifische Antikörperbindungen im Gewebe anzeigen kann. Als Positivkontrolle bezeichnet man in der IHC ein Gewebe, von dem man sicher weiß, dass dort das mit dem entsprechenden Antikörper zu detektierende Antigen vorhanden ist. Auf diese Weise ist es möglich, eventuell falsch negative Ergebnisse aufzudecken. Da B7h u.a. auf B-Zellen exprimiert wird (s. Einleitung, 1.2.2), bot sich eine Tonsille (Gaumenmandel) als lymphatisches und häufig ektomiertes Gewebe an. Ebenso wurden juvenile adenoide Vegetationen (hyperplastische Rachenmandel) dafür verwendet.

Im folgenden Schema (s. Abb. 3.1) sind die einzelnen Arbeitsschritte dieses Kapitels in ihrer Abfolge von der Gewebsservierung über die Erstellung eines Färbeprotokolls bis hin zur mikroskopischen Auswertung im Überblick dargestellt.

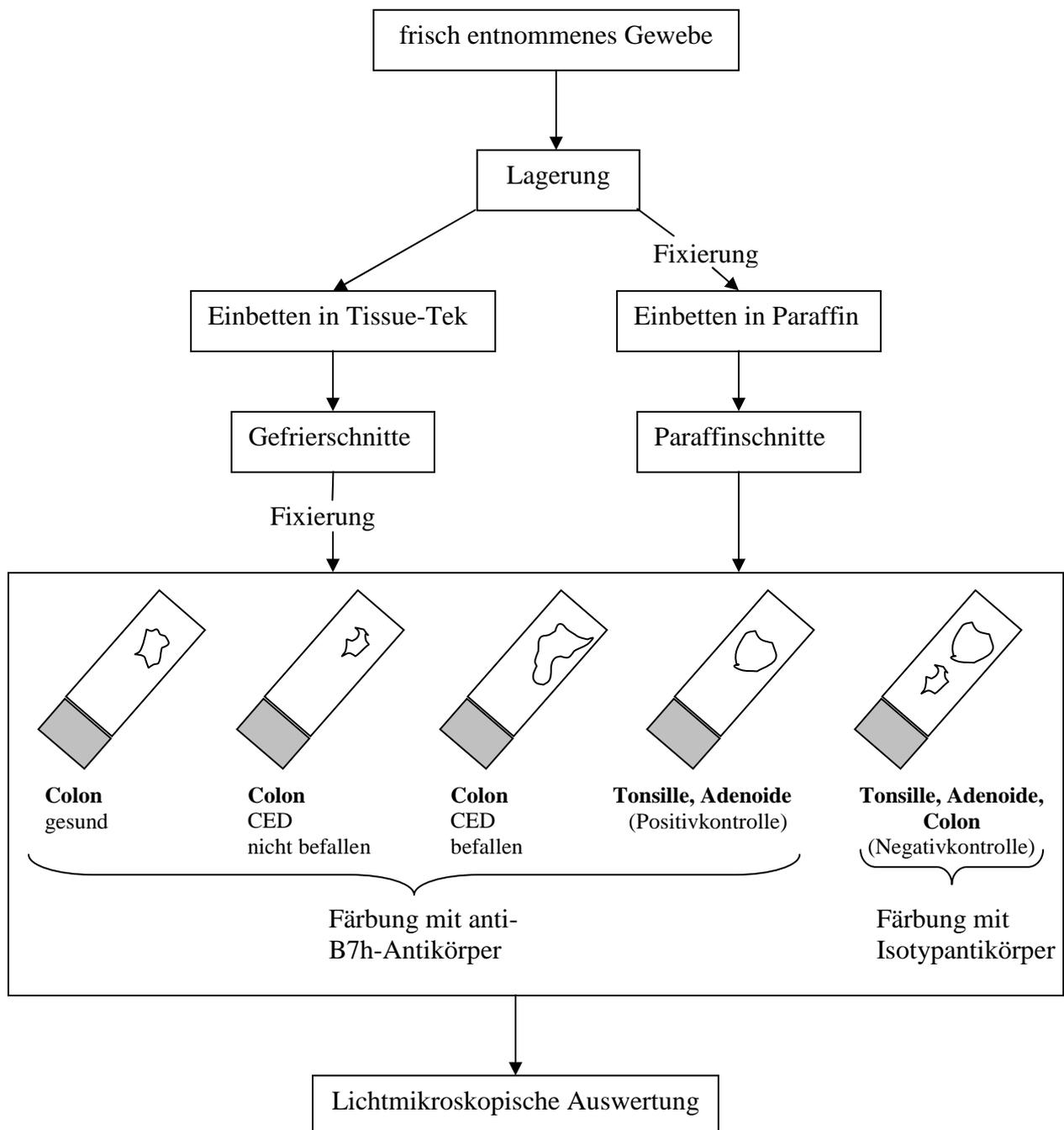


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der B7h-Expressionsstudie in der Immunhistochemie

3.2.1.1 Gewebsasservierung

Die Biopsien wurden sofort nach endoskopischer Entnahme in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführt und als Zwischenlagerung in einem Container (Air Liquide, Düsseldorf) mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die endgültige Lagerung fand in einem Gefrierschrank bei -80°C statt. Nachdem an Paraffin-Testmaterial zufriedenstellende immunhistochemische Ergebnisse erzielt worden waren, wurden daraufhin auch die Biopsien für eine Paraffin-Einbettung vorbereitet. Um das tiefgefrorene Gewebe möglichst schonend zu behandeln, wurde es zunächst in -20°C kaltes, gepuffertes 4%iges Formalin zur Fixierung eingelegt (Volumen der Fixierlösung : Volumen des eingelegten Gewebes $\geq 10 : 1$). Die Biopsien wurden anschließend ca. 24 Std. bei 4°C fixiert, dann in spezielle Histologie-Kassetten zwischen zwei Schaumstoffeinlagen überführt und von automatischen Einbettungsgeräten paraffiniert. Das Ausgießen der Blöcke mit Paraffin erfolgte in $10 \times 10 \text{ mm}$ kleinflächigen Formen, die sodann bei Raumtemperatur gelagert werden konnten.

Die lymphatischen Gewebeproben (Tonsille, Adenoide) wurden für den Transport direkt nach Entnahme in PBS eingelegt, ehe sie in mehrere kleine Stücke geschnitten luftfrei in Tissu-Tek eingebettet wurden ($15 \times 15 \times 5 \text{ mm}$ große Formen). Während des Schockgefrierens über 15 sec in Methylbutan, dessen Behälter in flüssigem Stickstoff steht, erhärtet das Medium. Die Proben wurden im Anschluss bis zum Schneiden bei -80°C gelagert.

3.2.1.2 Herstellung und Lagerung von Kryo- und Paraffinschnitten

Da die Morphologie von Gefrierschnitten durch häufig auftretende starke Temperaturschwankungen leicht beeinträchtigt werden kann, wurden diejenigen Gewebeproben, die nicht gerade zum Schneiden benötigt wurden, zwischenzeitlich auf Trockeneis gelagert. Angefertigt wurden die $5 \mu\text{m}$ dicken Schnitte an einem Rotationsmikrotom, welches sich in einer halb geschlossenen Gefrierkammer befindet (Kryostat). Die Kammer selber und der Träger, auf den das Probenmaterial aufgebracht wird, wurde auf ca. -21°C heruntergekühlt. Die jeweils mit zwei Schnitten versehenen Objektträger wurden daraufhin bis zu einer Stunde bei RT luftgetrocknet. Die folgende Fixierung fand für 10 min in -20°C kaltem Aceton statt. Nach einer weiteren 30minütigen Lufttrocknung

konnten die Schnitte direkt weiterverwendet werden oder in einer mit Parafilm[®] luftdicht verschlossenen Schachtel bei -80°C aufbewahrt werden.

Die Paraffinblöcke wurden für einen besseren Schneidevorgang ungefähr 1 Std. vor Beginn im -20°C Gefrierschrank gekühlt. Die mit einer $2\ \mu\text{m}$ Dicke angefertigten Schnitte wurden sogleich zur Streckung in das Wasserbad (ca. 46°C) überführt und – aus Gründen der Antikörperersparnis vier verschiedene Biopsien im Quadrat angeordnet – auf einen Objektträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte auf der neben dem Wasserbecken montierten Heizplatte nach kurzer Zeit angetrocknet waren, konnten sie bei RT für unbestimmte Zeit gelagert werden.

3.2.1.3 Erstellen eines Färbeprotokolls unter Verwendung eines Antikörpers gegen B7h

Ursprünglich war auf Grund fehlender kommerziell erwerblicher anti-B7h-Antikörper geplant, diese über eine Mausimmunisierung mit einem durch unsere Arbeitsgruppe hergestellten B7h-FP zu erlangen. Da jedoch zwischenzeitlich ein anti-B7h-Antikörper von einer anderen Forschergruppe zu beziehen war, wurde die weitere eigene Herstellung eingestellt und für die Durchführung immunhistochemischer Färbungen die erhaltenen Klone HIL-93 und HIL-131 verwendet. Wegen mangelnder Referenzen zu beiden Antikörpern mussten die Klone sowohl für Gefrier- als auch für Paraffinmaterial neu ausgetestet werden.

3.2.1.3.1 Austestung für Gefrierewebe

Wenn für die Färbungen nicht frisch angefertigte, sondern gelagerte Schnitte verwendet wurden, mussten diese, um morphologische Schäden möglichst gering zu halten, in der vorerst noch verschlossenen Box ca. 10 min lang bei RT aufgetaut werden. Danach konnte mit der Färbeprozedur begonnen werden. Die einzelnen Arbeitsschritte bestanden aus einer anfänglich kurzen Rehydrierung des Gewebes (um ein entsprechend gutes Milieu für folgende chemische Reaktionen zu schaffen), einem Blockungsschritt des endogenen Enzyms „Peroxidase“ (da dieses als Umsetzungsenzym für das Chromogen-Substrat auch zur Detektierung der spezifisch gebundenen Antikörper eingesetzt wurde und ansonsten zu falsch positiven Resultaten führen würde), einem Blockungsschritt für elektrostatische Ladungen der

Proteine (um deren unspezifische Bindungsfähigkeit zu reduzieren), den nachfolgenden Inkubationen mit einem Primärantikörper, Sekundärantikörper und falls nötig mit einem Tertiärkomplex, dem Auftragen des Chromogen-Substrats (welches das Endglied der Detektionskaskade darstellt und somit die Lokalisation des gebundenen Primärantikörpers farblich kennzeichnet) und letztendlich dem sog. Gegenfärben aller Zellen (um einen besseren morphologischen Gesamtüberblick zu erhalten).

Die Tabelle 3.9 zeigt im Überblick die Arbeitsschritte, in denen jeweils mehrere Methoden ausprobiert wurden.

Tabelle 3.9: Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte in der IHC von Gefriermaterial mit den verschiedenen ausgetesteten Variationsmöglichkeiten

Arbeitsschritt	Variation diverser Parameter	Zeitdauer
1) Rehydrierung	1. keine 2. in Tris oder PBS	10 min
2) Block endogener Peroxidase	1. H ₂ O ₂ (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3%) in H ₂ O _{dest} , PBS oder Tris	20 min
	2. H ₂ O ₂ (0,1 ; 0,2 ; 0,3%) in Methanol (100% ; 40% in PBS)	20 ; 30 min
	3. 0,180 g β-D(+) Glucose, 0,005 g Glucoseoxidase und 0,0065 g Natriumazid in 50 ml PBS Inkubation bei 37°C	60 min
Waschen	PBS ; Tris ; Tris + Tween (0,05%)	3 x 3 min
3) Block unspezifischer Bindungen	1. keiner	15 min
	2. Ziegen-Normalserum (NGS)(3%) in Tris	15 min
	3. Rinderserumalbumin (BSA)(1%) in PBS	15 min
	4. NGS (3%) + BSA (1%) in PBS	15 min
Flüssigkeit abklopfen		
4) Inkubation mit Primär-AK (HIL-93 ; HIL-131)	A. Temperatur u. Dauer: - bei RT - bei 37°C - bei 4°C	60 min 30 min über Nacht
	B. Konzentration: <u>HIL-93</u> : 61; 41; 31; 20; 15 µg/ml <u>HIL-131</u> : 143; 57; 29; 19; 14 µg/ml	
	C. AK-Verdünnungsmedium: - PBS/BSA 1% - Tris (pH 6,5 ; 7,6 ; 8,0) - Dako Antibody Diluent	
Waschen	PBS ; Tris ; Tris + Tween (0,05%)	3 x 3 min
5) Inkubation mit Sekundär-AK	1. anti IgG _{Maus} -Biotin (Kit)	30 min
	2. anti IgG _{Maus} -Peroxidase (4; 1,6; 1 µg/ml)	30 min
	3. anti IgG _{Maus} -Polymer-Peroxidase (Kit)	30 min

Waschen	PBS ; Tris ; Tris + Tween (0,05%)	3 x 3 min
6) Inkubation mit Tertiärkomplex (falls notwendig, s. 5.)	nur bei 5.1: Streptavidin-Peroxidase (Kit)	30 min
Waschen	PBS ; Tris ; Tris + Tween (0,05%)	3 x 3 min
7) Chromogen	1. DAB (+ Nickel) 2. Nova Red 3. Vector blue + Block endogener alkalischer Phosphatase mit Levamisol	15 min 6 – 10 min 20 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	5 min
8) Gegenfärbung	1. keine 2. Methyl Green 3. Hämatoxylin	5 sec
Bläuen (nur bei 8.3)	warmes H ₂ O _{dest}	2 min
Waschen	kaltes H ₂ O _{dest}	2 x 2 min

Abschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit Vector[®]Mount eingedeckt.

Alle wichtigen in der Tabelle 3.9 aufgeführten Alternativen wurden untereinander gekreuzt ausgetestet, um eine möglichst breite Aussagekraft zu erhalten. Primär wurden diese Färbeversuche an Tonsillen- und Adenoidmaterial durchgeführt. Nur zur Klärung gewebsspezifischer Fragen – wie z.B. hinsichtlich des Blockens endogener Enzyme – wurde Dickdarmmaterial hinzugezogen.

3.2.1.3.2 Austestung für Paraffingewebe

Die angefertigten Schnitte wurden für eine bessere Paraffinlösung im Gewebe über Nacht bei 56°C inkubiert und dann automatisch in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Da Antigene häufig durch Aldehydvernetzungen oder Veränderung der dreidimensionalen Struktur (Maskierung) während der Formalinfixierung für ihre Antikörper nicht mehr erkennbar sind, wurden zuerst verschiedene Demaskierungsmethoden ausprobiert (s. Tab. 3.10). Die weitere Abfolge der Arbeitsschritte ist dieselbe, wie bereits unter 3.2.1.3.1 beschrieben.

Tabelle 3.10: Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte in der IHC von Paraffinmaterial mit den verschiedenen ausgetesteten Variationsmöglichkeiten

Arbeitsschritt	Variation diverser Parameter	Zeitdauer
1) Antigendemaskierung (Retrieval-Methode)	1. keine 2. Hitzedemaskierung im Dampfdruckkochtopf mit Citrat-Puffer 3. Enzymatische Demaskierung mit Protease	7 min 20 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
2) Block endogener Peroxidase	1. H ₂ O ₂ (3%) in H ₂ O _{dest} 2. H ₂ O ₂ (3%) in Methanol	15 min 15 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
3) Block unspezifischer Bindungen	1. keiner 2. Ziegen-Normalserum (NGS)(3%) in Tris	15 min
Flüssigkeit abklopfen		
4) Inkubation mit Primär-AK (HIL-93 ; HIL-131)	A. Temperatur u. Dauer: - bei RT - bei 4°C B. Konzentration: <u>HIL-93</u> : 152; 76; 61; 50 µg/ml <u>HIL-131</u> : 286; 114; 57 µg/ml	60 min über Nacht
Waschen	Tris	3 x 3 min
5) Inkubation mit Sekundär-AK	1. anti IgG _{Maus} -Biotin (Kit) 2. anti IgG _{Maus} -Polymer-Peroxidase (Kit) 3. CSA-System (s. 3.2.2.4)	30 min 30 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
6) Inkubation mit Tertiärkomplex (falls notwendig, s. 5.)	nur bei 5.1: Streptavidin-Peroxidase (Kit)	30 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
7) Chromogen	DAB	15 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	5 min
8) Gegenfärbung	Hämatoxylin	5 sec
Bläuen	warmes H ₂ O _{dest}	2 min
Waschen	kaltes H ₂ O _{dest}	2 x 2 min

Nach Ende der Färbeprozedur wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und mit Vector[®]Mount eingedeckt.

3.2.1.4 Beschreibung verwendeter Detektionssysteme

Mit Hilfe dieser Systeme lassen sich die im Gewebe gebundenen Antikörper nicht nur sichtbar machen, sondern auch ihr Signal durch eingefügte Zwischenschritte um ein Vielfaches verstärken. Ihre meist signalamplifizierende Wirkung war einerseits zur

Reduzierung der eingesetzten Antikörpermenge und andererseits auf Grund der zu erwartenden geringen Antigenpräsenz sehr wünschenswert. Getestet wurden folgende Systeme:

- Direkte Detektierung des Primär-Ak über einen Peroxidase konjugierten Sekundär-AK; keine wesentliche Signalverstärkung

Reaktionskaskade: $B7h \rightarrow anti-B7h-AK \rightarrow anti-IgG-Peroxidase$

- Direkte Detektierung des Primär-Ak über einen Sekundär-AK, der mit einem mehrfach Peroxidase besetzten Polymer konjugiert ist; große Signalverstärkung

Reaktionskaskade: $B7h \rightarrow anti-B7h-AK \rightarrow anti-IgG-Polymer-Peroxidase$

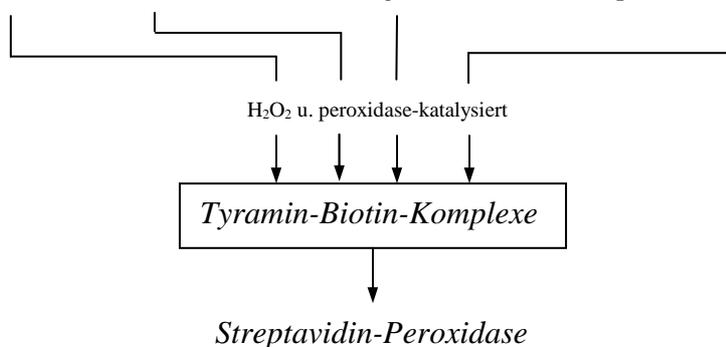
- Detektierung des Primär-Ak über einen biotinylierten Sekundär-AK, an den ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex binden kann (LSAB-Methode); große Signalverstärkung

Reaktionskaskade: $B7h \rightarrow anti-B7h-AK \rightarrow anti-IgG-Biotin \rightarrow Streptavidin-Peroxidase$

- Detektierung des Primär-Ak über einen biotinylierten Sekundär-AK, an den sich Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe anlagern können, die wiederum zusammen mit zusätzlich um die Antigenstelle geschaffenen Bindungsplätzen, die nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und biotinyliertem Tyramin peroxidase-katalysiert entstehen, Streptavidin-Peroxidase-Konjugate binden können (CSA-System); sehr große Signalverstärkung

Reaktionskaskade:

$B7h \rightarrow anti-B7h-AK \rightarrow anti-IgG-Biotin \rightarrow Streptavidin-Biotin-Peroxidase$



3.2.1.5 Lichtmikroskopische Auswertung

Hinsichtlich der Bewertung der Färbeergebnisse unter dem Lichtmikroskop spielten vor allem folgende drei Gesichtspunkte eine wesentliche Rolle:

- Ist eine spezifische Färbung festzustellen?
- Wie stark ist die Intensität der Färbung?
Dies würde Rückschlüsse auf die relative B7h-Expressionsstärke zulassen.
- Wo ist die Färbung lokalisiert?
Diese Region würde dem Ort der B7h-Expression entsprechen.

3.2.2 Untersuchung der B7h-Expression mittels Laser-Capture-Microdissection (LCM) und anschließender RT-PCR

Zur Korrelation immunhistochemischer Daten wurde zusätzlich eine weitere Methode für die Untersuchung der B7h-Expression angewendet. Hierbei handelt es sich um den Nachweis und die Quantifizierung von B7h-mRNA mittels Real-Time (Echtzeit) RT-PCR. Die intestinalen Epithelzellen, die es zu untersuchen galt und aus denen die RNA isoliert wurde, wurden mit Hilfe der Laser-Capture-Microdissection gewonnen. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in der Abb. 3.2 nochmals schematisch zusammengestellt.

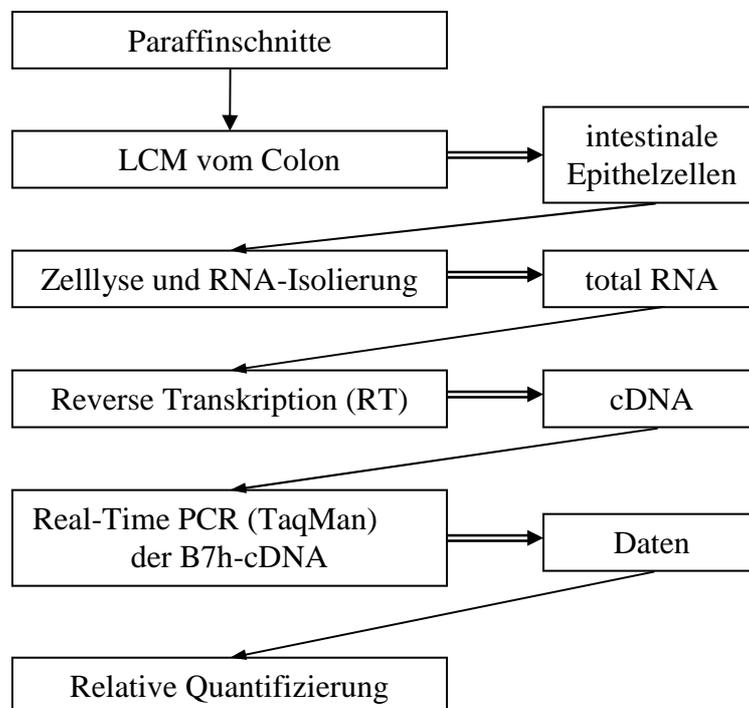


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der B7h-Expressionsstudie, durchgeführt mittels LCM und Real-Time RT-PCR

3.2.2.1 Auswahl des verwendeten Gewebematerials für die LCM

Das hierfür verwendete Paraffinmaterial stammte aus dem Archiv des Pathologischen Institutes der TU München (Klinikum rechts der Isar). Ausgewählt wurden Blöcke mit Kolonresektaten oder -probeexzisionen (PE = Biopsien) von Patienten mit CED (untergliedert

in eine Morbus-Crohn- und eine Colitis-Ulcerosa-Gruppe) einerseits und Kolonresektaten von Patienten mit intestinalem Adenokarzinom andererseits. Bei Letzteren wurden jeweils Gewebelöcke aus dem tumorfreien Resektionsrandbereich ausgesucht. Das CED-Material wurde an HE-gefärbten Schnitten mit freundlicher Unterstützung des Pathologen Herrn Prof. Dr. F. Fend vom Pathologischen Institut der TU München pro Patient in einen Gewebelöck mit befallener (meist chronische und floride Entzündung) und weitgehend unbefallener (keine oder kaum Entzündung) Schleimhaut eingeteilt (s. Tab. 3.5, 3.6, 3.7). Weiterhin wurde bei dieser Auswahl darauf geachtet, dass möglichst keine oder nur wenige Lymphozyten im Epithel zu sehen waren, relativ zahlreiche und gut erhaltene Epithelzellen vorhanden waren, und dass die Gewebelöcke nicht allzu alt waren (Paraffin Block RNA Isolation Kit, Manual Version 0306, Ambion).

3.2.2.2 Funktionsprinzip der LCM

Die Technik der LCM wurde erst kürzlich vom National Institute of Health (NIH) entwickelt und schließlich in Kooperation mit Arcturus Engineering (Mountain View, USA) kommerziell vertrieben. Hierbei handelt es sich um eine Methode, mit der man gezielt einzelne Zellen oder Zellareale mittels eines Lasers unter mikroskopischer Sicht von Gefrier- oder Paraffinschnitten isolieren kann. Auf diese Weise ist es möglich, molekulare Analysen in bestimmten Zellen aus einem heterologen Gewebe auf DNA-, mRNA- oder Proteinebene durchzuführen.

Ein aus durchsichtigem Kunststoff bestehendes Cap, welches mit der kleineren Seite einem 0,5 ml Eppendorfgefäß aufsetzbar ist und an dieser Seite mit einer 100 µm dicken thermoplastischen Membran aus Ethylenvinylacetat beschichtet ist, wird direkt auf einen vollkommen entwässerten Gewebeschnitt, der unter dem Mikroskop platziert wird, aufgelegt. Sind unter mikroskopischer Sicht die gewünschten Zellen zentral eingestellt, können diese nochmals exakt mit einem Laserpointer am Bildschirm fokussiert und dann mit einem Infrarotlaser beschossen werden. Durch dessen Absorption an der thermoplastischen Membran kommt es zu einer kurzfristigen (ca. 200 msec) Erwärmung mit Spitzentemperaturen von 90°C und zu einer gleichzeitigen Verschmelzung der anfokussierten Zellen mit der Kunststoffmembran. Auf Grund der nun höheren Adhäsionskräfte zwischen Gewebe und Membran als derjenigen zwischen Gewebe und Objektträger können die Zellen

mit dem Cap abgehoben und vom übrigen Gewebe separiert werden. Die Morphologie der gelaserten und der restlichen auf dem Schnitt verbliebenen Zellen bleibt gänzlich intakt (s. auch Ergebnisteil, Abb. 4.12 u. 4.13).

Verglichen mit herkömmlichen, manuellen Mikrodissektionsmethoden ist das lasergestützte Verfahren in Geschwindigkeit und Effizienz weitaus überlegen (Emmert-Buck et al. 1996; Bonner et al. 1997).

3.2.2.3 LCM-Apparatur

Die ganze LCM-Apparatur der Firma Arcturus (PXL-200 PixCell Laser Capture Microdissection System) ist aus folgenden Einzelkomponenten zusammengesetzt.

- Mikroskop: Einem konservativen Mikroskop entsprechend ist dieses invertierte Binokular (Olympus IX-50) mit zwei Okularen (10x), vier Objektiven (4x, 10x, 20x, 40x) und einem mit einem Joystick zweidimensional bewegbaren Objektisch ausgestattet. Die dortige Fixierung der Objektträger erfolgt jedoch mit Hilfe einer Vakuumeinheit. Seitlich davon befindet sich ein Transportschlitten, auf den die Objektträger mit jeweils fünf deponierten Caps aufgeschoben werden. Für ein möglichst steriles Vorgehen können die Caps von dort aus mit einem installierten Schwenkarm mechanisch transportiert und auf den Gewebeschnitt abgelassen werden. Direkt über dem Cap kann in den Schwenkarm ein Diffusionsfilter für eine bessere bildliche Darstellung der Gewebeschnitte oder ein Gewichtsstück zur Beschwerung des Caps eingebracht werden.
- Videoeinheit: Sie besteht aus einer CCD-Farbkamera (Panasonic GP-KR 222) und einem Farbmonitor (Sony PVM-114N2U).
- Lasereinheit: Hierbei handelt es sich um einen Infrarot-Diodenlaser, der in seiner Leistung und Pulsdauer zwischen 3 – 100 mW bzw. 0,1 – 1000 msec manuell variiert werden kann. Über diese beiden Parameter lässt sich die Übertragungseffizienz der gelaserten Zellen auf das Cap beeinflussen. Hinsichtlich der Fokusgröße sind drei verschiedene Einstellungen möglich (7,5 µm; 15 µm; 30 µm). Ausgelöst werden die Laserpulse über einen Handschalter, der mit der Lasereinheit verbunden ist.
- PC mit Bildschirm: Dem angeschlossenen Computer obliegt die Steuerung des Systems (ARC-200 PixCell Image Archiving Workstation), d.h. es lassen sich damit

eine Veränderung der Einstellungen vornehmen, am Bildschirm der Dissektionsvorgang direkt verfolgen sowie zugleich die einzelnen Arbeitsschritte der Microdissektion dokumentieren.

3.2.2.4 Vorbereitungen zur LCM

Da aus dem durch die LCM gewonnenen Zellmaterial RNA-Analysen durchgeführt werden sollten, mussten für das Arbeiten bestimmte Vorkehrungen getroffen werden. Dies bedeutete, dass alle Arbeitsschritte mit unsterilen Einmalhandschuhen durchgeführt wurden, und dass Arbeitsflächen inklusive der benutzten Geräte (Mikrotom, Laser-Mikroskop) mit 70% Ethanol und schließlich mit RNase-Erase-Spray behandelt wurden, um Kontaminationen mit Fremd-RNA zu verhindern bzw. ubiquitär vorkommende RNasen zu inaktivieren, welche die Fähigkeit besitzen, hocheffizient RNA abzubauen. Weiterhin wurden für jeden Schneidevorgang neue Einmalklingen und Objektträger benutzt. Die verwendeten Plastikwaren waren RNasen-frei hergestellt. Die frisch geöffneten oder angesetzten Lösungen waren allein für Arbeiten mit RNA bestimmt. Das Streckbad für Paraffinschnitte wurde mit Aqua ad injectabilia Delta Select gefüllt.

Für Resektatgewebe wurden je zwei, für Biopsien je sechs 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf einen unbeschichteten Objektträger gezogen. Anschließend wurden sie 1 Std. bei 40°C inkubiert und nach folgendem – von mir gering modifizierten – Protokoll vom National Cancer Institute (<http://cgap-mf.nih.gov/Protocols>) entparaffiniert, rehydriert, gegengefärbt und wieder dehydriert:

- | | |
|---|--------|
| ▪ frisches Xylol | 5 min |
| ▪ frisches Xylol | 5 min |
| ▪ 100% Ethanol | 15 sec |
| ▪ 95% Ethanol | 15 sec |
| ▪ 70% Ethanol | 15 sec |
| ▪ H ₂ O _{dest} (aqua ad injectabilia) | 15 sec |
| ▪ Mayer`s Hämatoxylin | 15 sec |
| ▪ H ₂ O _{dest} (aqua ad injectabilia) | 15 sec |
| ▪ H ₂ O _{dest} (aqua ad injectabilia) | 15 sec |
| ▪ 70% Ethanol | 15 sec |

- | | |
|------------------|---------|
| ▪ 95% Ethanol | 15 sec |
| ▪ 95% Ethanol | 15 sec |
| ▪ 100% Ethanol | 15 sec |
| ▪ 100% Ethanol | 15 sec |
| ▪ frisches Xylol | 1 min |
| ▪ Lufttrocknung | > 2 min |

Nach der Entparaffinierung mussten die Schnitte möglichst zügig weiterverarbeitet werden, da nun RNasen aktiv werden können.

3.2.2.5 Dissektionsvorgang

Während der Mikrodissektion wurde unter gleichen RNase-freien Bedingungen gearbeitet, wie unter 3.2.2.4 anfangs erläutert.

Zuerst wurden die gut getrockneten Schnitte mit einer Art Klebestreifen (Arcturus, Mountain View, USA) von Schmutzpartikeln oder eventuell lockeren Gewebeflocken durch leichtes Andrücken gesäubert. Da die morphologischen Verhältnisse auf Grund des fehlenden Deckglases und der einfachen Hämatoxylinfärbung unter dem Mikroskop manchmal schwierig zu beurteilen waren, wurde zu deren Klärung kurz vor der Dissektion der entsprechende eingedeckelte HE-Schnitt herangezogen. Wenn schließlich ein gut zu dissezierendes Areal gefunden war, wurde es zentral eingestellt, der Joystick in Neutralstellung gebracht und ein Cap mittels Schwenkarm vom Transportschlitten auf das Gewebe aufgesetzt. Innerhalb des vom Cap begrenzten Gebietes wurde nun ein gewebefreies Areal aufgesucht, um dort den Laserstrahl zu fokussieren. Da der Lasereffekt von Schnitt zu Schnitt variieren kann, wurden die Einstellungen am Laser individuell vorgenommen und an einer Stelle mit hoher Dichte der gewünschten Zellen ausgetestet. Die üblich eingestellten Werte betragen 40 – 58 mW Leistung, 7 msec Pulsdauer und 7,5 µm Spotgröße. Die einzelnen Laserspots, welche durch Schmelzen der Kunststoffmembran schwarze Ringe bilden und so die bereits gelaserten Areale kennzeichnen, wurden leicht überschneidend gesetzt, um eine fortlaufende Dissektion zu erreichen. Es wurden ca. 900 – 1000 Schüsse pro Objektträger abgegeben. Wegen der oft gering zu dissezierenden Zellmenge pro Biopsie musste dabei das Cap mehrmals umgesetzt werden, um mit der Dissektion auf den anderen

noch unbenutzten Serienschnitten fortzufahren. Nach deren Beendigung wurden die Caps jeweils auf den Klebestreifen einer frischen Post-it® -Seite leicht aufgedrückt, damit dort unspezifisch adhärentes Material heften bleibt. Zur Reinheitskontrolle wurde das Cap nochmals auf eine gewebefreie Stelle des Objektträgers niedergelassen und mikroskopisch begutachtet, ehe es dann einem 0,5 ml Eppendorfgefäß als Deckel aufgesteckt wurde. Ein Mikrodisektionsdurchlauf bestand durchschnittlich aus 10 verschiedenen Gewebeproben, was einer zeitlichen Länge von bis zu 9 Stunden seit der Entparaffinierung entspricht. Jeder beliebige Schritt des Dissektionsvorganges kann bildlich dokumentiert werden (s. Ergebnisteil, Abb. 4.11- 4.14).

3.2.2.6 Zellyse und RNA-Extraktion

Bei der sofortigen Weiterverarbeitung des dissezierten Gewebes richtete ich mich nach einem intern erstellten Protokoll des Pathologischen Institutes des Klinikums rechts der Isar. Während der Durchführung wurde durchweg auf Eis gearbeitet.

- RNA-Isolation:
 - Zugabe von 200 µl frisch angesetzttem Lyse-Puffer (Zusammensetzung s. 3.1.2) in jedes 0,5 ml Eppendorfgefäß und erneuter Verschluss durch Aufsetzen des Caps
 - das Eppendorfgefäß auf den Deckel (Cap) stellend, 12 Std. bei 60°C inkubieren
 - Hitze-Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C 5 min lang
 - in ein neues 0,5 ml Eppendorfgefäß umpipettieren
- RNA-Präzipitation:
 - Zugabe von 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4)
 - kurze Zeit gegen das Gefäß schnippen
 - Zugabe von 1 Volumen wassergesättigtem sauren Phenol und 1/5 Volumen Chloroform
 - 30 sec in der Hand schütteln und 45 sec vortexen
 - 15 min auf Eis stellen
 - 20 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugieren
 - Abnehmen der oberen wässrigen Phase und Überführung in ein neues 0,5 ml Eppendorfgefäß

- Zugabe von 1 μ l Glykogen (Stammkonzentration 20mg/ml) und 1 Volumen Isopropanol
- Inkubation bei -20°C 12 Std. lang
- 30 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugieren
- weißes Pellet ist am Boden erkennbar, Überstand abnehmen und verwerfen
- Waschen des Pellets:
 - Zugabe von 500 μ l Ethanol (70%) bei RT
 - 20 min bei 13000 U/min und RT zentrifugieren
 - Pellet trocknen lassen und in 20 μ l H_2O (Sigma) lösen

Die Lagerung der Proben fand über wenige Tage bei -80°C statt.

3.2.2.7 Reverse Transkription

Hierbei handelt es sich um die Umschreibung der RNA in cDNA. Dieser Vorgang wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase bewerkstelligt, die als Startbereich ein doppeltes Strangstück benötigt. Es wurden hierfür Random Hexamere verwendet, da sie bei fragmentierter oder nicht vollständig erhaltener RNA – die bei einer Isolation aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe zu erwarten ist (Goldsworthy et al. 1999, Lehmann & Kreipe 2001) – ein besseres Ergebnis liefern als Oligo-dT-Primer.

Reaktionsansatz (Endvolumen 20 μ l):

- 9 μ l Gesamt-RNA
- 1 μ l BSA (0,5 $\mu\text{g/ml}$)
- 1 μ l dNTP-Mix (10 mM)
- 1 μ l Random Hexamere (250 ng/ μ l)

Dieses Gemisch wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, danach schnell auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und mit folgenden Reagenzien versetzt:

- 4 μ l 5x First Strand Buffer (= Erststrang-Puffer)
- 2 μ l DTT (0,1 M)
- 1 μ l RNaseTM OUT (= RNase-Inhibitor)

Alle weiteren Inkubationen wurden in einem Thermocycler durchgeführt:

- 10 min bei 25°C (→ Anlagerung der Random Hexamere als Primer)
- 2 min bei 42°C (→ bringt die Probe auf die für die Polymerase optimale Arbeitstemp.)
- *Pause*: Zugabe von 1 µl SuperScript™ II (Reverse Transkriptase Enzym)
- 50 min bei 42°C (→ Erststrangsynthese)
- 15 min bei 70°C (→ Deaktivierung der Polymerase)
- Herunterkühlen auf 4°C.

Die cDNA wurde direkt nach der Umschreibung in die Real-Time PCR eingesetzt.

3.2.2.8 Funktionsprinzip des TaqMan®-PCR Assays

Der TaqMan ist eines der Systeme, mit denen sich eine quantitative Real-Time PCR durchführen lässt. Diese stellt eine Weiterentwicklung der klassischen PCR (Mullis & Faloona 1987) dar, indem sie nicht nur zu einer Amplifikation der PCR-Produkte führt, sondern gleichzeitig auch deren direkten Nachweis ermöglicht (Higuchi et al. 1992). Die PCR ist eine sehr schnelle und zugleich sensitive Methode, um kleinste Mengen spezifischer DNA-Abschnitte zu vervielfachen und nachträglich zu detektieren.

Für die Amplifikation werden zuerst durch Hitzedenaturierung einzelsträngige DNA (Template) hergestellt, an die sich nun für die zu amplifizierende Sequenz spezifische Oligonukleotide (Primer) sowohl am 5' (forward Primer) als auch 3' (Reverse Primer) Ende der Zielsequenz anlagern können (Annealing). Auf diese Weise wird ein Startpunkt für die Synthese (Extension) der zwischen den Primern liegenden Sequenz durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase geschaffen. Auf Grund der Komplementarität des neu entstandenen Stranges können nach Durchlaufen beliebig vieler Zyklen (Denaturierung, Annealing, Extension) entsprechend viele Kopien der Ausgangssequenz hergestellt werden.

Das Prinzip des gleichzeitigen quantitativen Nachweises einer spezifischen cDNA basiert zum einen auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der verwendeten AmpliTaq-Polymerase und zum anderen auf dem Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids (Sonde oder TaqMan-Probe). Diese Sonde, welche sich komplementär in einem Bereich zwischen den beiden Primern anlagern soll, ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) versehen. Im

Gegensatz zu einer intakten Sonde, bei der der Quencher die Reporterfluoreszenzemission durch räumliche Nähe und den daraus resultierenden Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt, wird bei einer Sondenfragmentierung der FET aufgelöst, und es kann ein Fluoreszenzsignal wahrgenommen werden. Dies ist nur dann der Fall, wenn die DNA-Polymerase mit ihrer Exonukleaseaktivität die an die Zielsequenz spezifisch gebundene Sonde während der Extensionsphase hydrolysiert (s. Abb. 3.3).

Auf diese Weise steigt die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzintensität proportional mit der Menge des amplifizierten cDNA-Templates an.

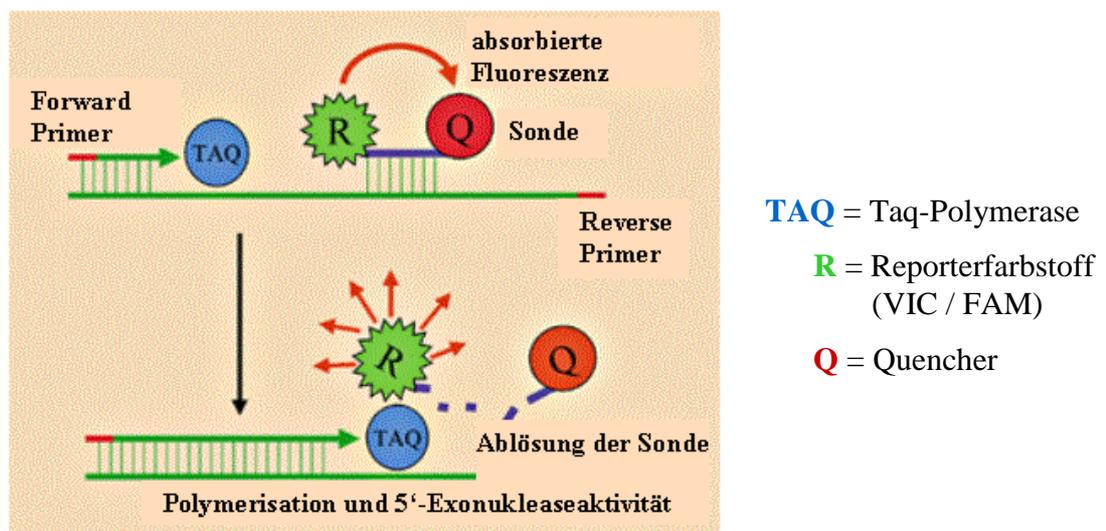


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des TaqMan[®]-PCR Assays (modifiziert nach Weller et al.)

3.2.2.9 Konstruierung von Primern und Sonden für die TaqMan[®]-PCR

Bei der Auswahl der Primer und Sonden wurden folgende Punkte berücksichtigt (Giulietti et al. 2001, User's Manual 1997):

- der Schmelzpunkt der Primer sollte sich zwischen 58°C und 60°C befinden
- der Schmelzpunkt (T_m) der Sonde sollte 10°C höher liegen als der der Primer
- die Größe des Amplikons sollte zwischen 50 und 150 Basenpaaren liegen
- am 5'-Ende der beiden Primer und der Sonde sollte nicht die Base Guanin sein

- die Primer und die Sonde sollten nicht komplementär zu sich selbst und zueinander sein
- die Länge der Primer und der Sonde sollte zwischen 20 und 30 Basenpaaren liegen
- der GC-Gehalt der Primer und der Sonde sollte 40-60% betragen
- es sollte in der Sequenz eine lange Abfolge von einer einzigen Base vermieden werden
- problematische Sekundärstrukturen wie sog. hairpin-loops sollten vermieden werden.

Weitere Informationen über Aufbau und Lokalisation sind der Tab. 3.4 zu entnehmen.

3.2.2.10 Durchführung des TaqMan[®]-PCR Assays

Es wurden die gewonnenen 20 µl cDNA mit 15 µl H₂O (Sigma) verdünnt, um schließlich 1/7 der ursprünglichen Template-Menge pro well einzusetzen.

Reaktionsansatz/well (Endvolumen 25 µl)

für den TaqMan der <u>B7h-cDNA</u> : <ul style="list-style-type: none"> - 5,00 µl cDNA einer bestimmten Probe - 12,50 µl TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (1x) - 0,75 µl forward Primer (300 nM) - 0,75 µl reverse Primer (300 nM) - 1,00 µl TaqMan-Probe (200 nM) - 5,00 µl H₂O (Sigma) 	für den TaqMan der <u>GAPDH-cDNA</u> : <ul style="list-style-type: none"> - 5,00 µl cDNA einer bestimmten Probe - 12,50 µl TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (1x) - 1,25 µl PDAR System control - 6,25 µl H₂O (Sigma)
---	---

Die Reagenzien wurden auf Eis in eine 96-well-Platte (MicroAmp[®] 96-Well Optical Reaction Plate) so pipettiert, dass je sechs wells mit der zu untersuchenden Probe (Template) versehen wurden, von denen wiederum die eine Hälfte (Triplikat) mit den restlichen notwendigen Reagenzien für den TaqMan der B7h-cDNA und die andere Hälfte (Triplikat) mit den Komponenten für den TaqMan der GAPDH-cDNA versetzt wurde. Das dabei verwendete PDAR System control entspricht einer voll optimierten, kommerziell erwerblichen Reagenz,

die sowohl die Primer als auch die Sonde (TaqMan-Probe) für die Real-Time PCR der GAPDH-cDNA beinhaltet.

Zusätzlich liefern bei jedem neuen Ansatz (d.h. pro Platte) eine Positivkontrolle mit, die aus einer synthetisch hergestellten B7h-cDNA (Konzentration: 10^4 Kopien/ μ l) in einer Verdünnung von 1:1 und 1:100 bestand, sowie eine Negativkontrolle, bei der das Template durch Wasser ersetzt wurde, und einem Kalibrator, dessen cDNA aus CD19-negativen PBL gewonnen wurde und dessen detektierte cDNA-Menge als allgemeiner Referenzwert dienen sollte. Das verwendete Pipettierschema verdeutlicht die Abb. 3.4.

Die fertig pipettierte Platte wurde mit einer durchsichtigen Klebefolie (Optical Adhesive Cover Starter Kit) und einer gummiähnlichen Lochmatte, die bei der Fluoreszenzmessung Streuungsartefakte verhindern soll, abgedeckt, anschließend 1 min bei 1000 U/min und 4°C zentrifugiert und zur Analyse in das ABI PRISM™ 7700 Detection System überführt.

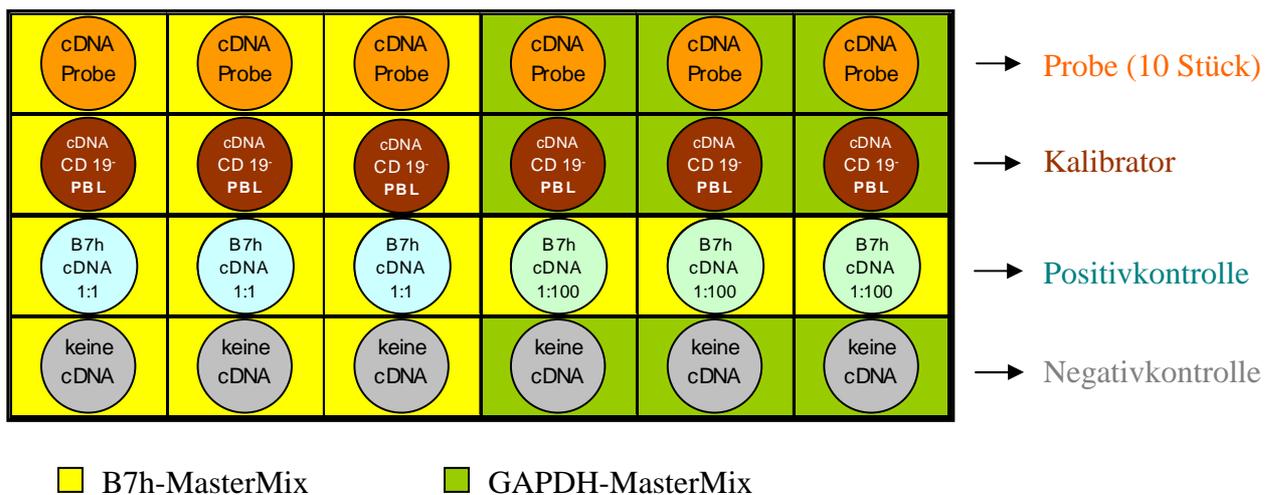


Abbildung 3.4: Ausschnitt des Pipettierschemas einer 96-Well-Platte für die B7h-Expressionsuntersuchung mittels TaqMan. Die einzelnen Kreise symbolisieren die Reaktionsgefäße mit Inhalt (= Art des Templates). Die jeweiligen Rechtecke um die Kreise kennzeichnen die Füllung der Reaktionsgefäße mit dem entsprechenden MasterMix für eine Amplifikation von B7h oder GAPDH

3.2.2.11 Das ABI PRISM™ 7700 Detection System

Dieses Gerät (Applied Biosystems, Foster City, USA) ist mit einem internen Thermocycler ausgestattet, in den die 96-Well-Platte hineingesteckt wird. Er wurde auf folgende Inkubationsschritte programmiert:

50°C	-	2 min	
95°C	-	10 min	
95°C	-	15 sec	} 50 Zyklen
60°C	-	1 min	

Die in jedem Well durch einen Argon-Laser hervorgerufenen Fluoreszenzemissionen werden über ein System von optischen Leitern, Spiegel, Filter und Linsen zu einem Spektrographen mit einer dahinter angeschlossenen CCD-Kamera weitergeleitet und dort für jedes einzelne Well aufgenommen. Die Verarbeitung dieser Daten zusammen mit der gesamten Steuerung des Systems (7700 SDS, Applied Biosystems) übernimmt ein Power Macintosh 7200/120.

3.2.2.12 Datenauswertung mittels einer relativen Quantifizierungsstrategie

3.2.2.12.1 Prinzip der Methodik ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode)

Bevor man an Zahlenwerte gelangt, die jeweils Ausgangspunkt für die Berechnung der mRNA-Menge sind, müssen in der graphischen Darstellung der Amplifikationswerte (amplification plot), die für jedes Reaktionsgefäß erstellt werden, eine Basislinie und eine Grenzlinie (threshold) gesetzt werden. Dies wurde gemäß den Richtlinien des User Bulletin #2 des ABI PRISM™ 7700 Detection System (Perkin-Elmer, 1997) durchgeführt. Um einen gültigen Vergleich der aus verschiedenen Platten (Ansätze an unterschiedlichen Tagen) gewonnenen Daten anstellen zu können, wurde zur Analyse des *amplification plot* bei allen TaqMan-Läufen sowohl für die B7h-Auswertung als auch für die GAPDH-Auswertung jeweils immer der gleiche Threshold-Wert gesetzt. Dessen Schnittpunkt mit der individuellen Amplifikationskurve legt den sog. C_T -Wert (threshold cycle) für jedes einzelne Well fest. In Abbildung 4.18 (Ergebnisteil) ist ein Beispiel für solch einen *amplification plot* mit gesetztem *threshold* zu sehen.

Im Gegensatz zu einer absoluten Quantifizierung, die über eine Erstellung der Standardkurve zu absoluten mRNA-Mengen führt, kann man bei einer relativen Quantifizierung nur Vergleichswerte erreichen. Diese werden hauptsächlich über drei Rechnungsschritte erzielt (Giulietti et al. 2001, Livak & Schmittgen 2001):

1. Um die divergenten cDNA-Mengen auszugleichen, die auf Grund der unterschiedlich dissezierten Zellzahlen in den jeweiligen Proben vorkommen, wird die Menge des Zielgens (B7h) auf die eines relativ konstant exprimierten Housekeeping-Gens normalisiert. Es wurde dafür ein Enzym aus dem Glukosestoffwechsel namens GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

Die Gleichung hierfür lautet: $C_{T,B7h} - C_{T,GAPDH} = \Delta C_T$

2. Der normalisierte C_T -Wert (ΔC_T) einer zu untersuchenden Probe wird auf den ΔC_T eines Vergleichskollektivs (Kalibrator) bezogen. Als solcher wurden CD19-negative PBL verwendet.

Die Gleichung hierfür lautet: $\Delta C_T(\text{Probe}) - \Delta C_T(\text{CD19-neg. PBL}) = -\Delta \Delta C_T$

3. Über Einbeziehung TaqMan-spezifischer Parameter und Voraussetzungen gelangt man zu einer Formel, die die normalisierte Expression des Zielgens (B7h) aus einer zu untersuchenden Probe ausdrückt, und zwar relativ zu der normalisierten Expression des Kalibrators (CD19-neg. PBL).

Die Gleichung hierfür lautet: $2^{-\Delta \Delta C_T}$

3.2.2.12.2 Voraussetzungen für ihre Anwendung

Damit die $2^{-\Delta \Delta C_T}$ -Methode für die Auswertung der Daten herangezogen werden darf, müssen zwingend folgende drei Punkte erfüllt sein:

- Die Amplifikationseffizienz muss sowohl für das Zielgen als auch für das Housekeeping-Gen unabhängig von der eingesetzten cDNA-Menge sein.
- Die Amplifikationseffizienz des Zielgens und die des Housekeeping-Gens müssen ungefähr gleich sein.

- Die Expression des Housekeeping-Gens muss unter allen Umständen konstant sein; das bedeutet für die vorliegende Arbeit, dass vor allem der Entzündungsstatus keinen Einfluss auf den Expressionslevel des Hauskeeping-Gens besitzen darf.

Diese Punkte wurden alle auf ihre Richtigkeit hin überprüft (s. Ergebnisteil, Abb. 4.15 u. 4.16).

3.2.2.13 Statistische Analysen

Falls mehrere Datensätze für ein untersuchtes Gewebe verfügbar waren, wurden sie als Mittelwert zusammen mit dessen Standardfehler angegeben. Außerdem wurden die Ergebnisse der gesunden und der an CED erkrankten Patienten untereinander auf einen signifikanten Unterschied hin überprüft. Durchgeführt wurde dies mit dem Student'schen T-Test, wobei das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ festgelegt und bei dessen Zutreffen mit einem bzw. mit zwei „*“ versehen wurde.

3.2.3 Experimente mit humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL)

Die PBL wurden als Vergleichszellen in der mRNA-Expressionsanalyse mittels TaqMan benötigt.

3.2.3.1 Isolation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Die Isolation der PBL wurde über einen Dichtegradienten durchgeführt (Ficoll-Methode):

- venöse Blutentnahme (je nach Verwendungszweck zwischen 15 und 40 ml) mit einer heparinisierten Spritze
- Umfüllen in 50 ml-Falcon-Röhrchen
- Zugabe von 37°C-erwärmtem PBS-Puffer im Verhältnis von 1:1, mischen
- Überführung einer auf 37°C temperierten Ficoll-Lösung in frische 50 ml-Falcon-Röhrchen
- die Ficoll-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 mit dem Blut-BPS-Gemisch überschichten, indem man es langsam an der Gefäßwand herabfließen lässt

- 20 min zentrifugieren bei 1200 U/min (langsames Andrehen!) und 4°C
- oberste gelbliche Schicht (Serum) absaugen und verwerfen, nächste weißlich trübe Schicht (Lymphozyten) mit einer 20-ml-Pipette in kreisenden Bewegungen abnehmen und in ein neues 50-ml-Röhrchen geben
- Auffüllen des Röhrchens mit PBS, um das zellschädigende Ficoll herauszuwaschen
- 7 min zentrifugieren bei 1200 U/min und 4°C
- Überstand absaugen und verwerfen; Pellet in gewünschter Lösung und Zellkonzentration aufnehmen.

3.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet. Sie besteht aus vier großen Außenquadranten, die nochmals in jeweils 16 kleinere Quadrate unterteilt sind. Zu Beginn der Messung wird als erstes ein Deckglas auf den speziellen, leicht angefeuchteten Träger mit leichtem Anpressdruck so positioniert, dass sich über den seitlichen Kontaktstellen Newton'sche Ringe ausbilden. Genau dann beträgt das zwischen Deckglas und einem Außenquadranten eingeschlossene Volumen $0,1 \text{ mm}^3$, wobei 1 cm^3 1 ml entspricht. Anschließend werden ungefähr $10 \text{ }\mu\text{l}$ einer Zellsuspension – je nach vermuteter Zellmenge – entweder pur oder mit PBS verdünnt in die entstandene Kammer hineinpipettiert. Falls während der Zählung zusätzlich eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen erwünscht ist, kann man der Suspension einen blauen Farbstoff (Trypanblau) in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:10 hinzusetzen, der nur von toten Zellen aufgenommen wird und diese blau anfärbt. Abhängig von der Fragestellung können daraufhin unter dem Mikroskop bei einer 40fachen Vergrößerung die lebenden durchsichtigen oder die toten blauen Zellen oder auch beide Zellarten zusammen bei der Messung berücksichtigt werden. Dabei zählt man in allen vier Außenquadranten jeweils diejenigen Zellen, die innerhalb und auf der unteren bzw. linken Begrenzungslinie (L-Form) der 16 kleineren Quadrate zu liegen kommen.

Damit kann die Berechnung der Zellzahl wie folgt vorgenommen werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{mittlere Zellzahl/Quadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.2.3.3 Stimulation der PBL

Die PBL wurden im RPMI-Medium mit Glutamax (1640) in einer Endkonzentration von ca. 3×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Stimuliert wurden die PBL in einer 24-well-Platte mit $0,4 \mu\text{l/ml}$ Ca^{2+} -Ionophor und $0,2 \mu\text{l/ml}$ PMA. Anschließend wurden sie über 48 Std. in einem 37°C -Brutschrank inkubiert.

3.2.3.4 Oberflächenfärbung der PBL und deren Analyse mittels eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (FACS)

Mit dieser Methode lässt sich die Expressionsstärke verschiedener Oberflächenmoleküle auf Zellen einer Suspension untersuchen und letztere über eine Messung von Zellgröße, Granuladichte und Fluoreszenzintensität in weitere Subpopulationen aufteilen. Dazu wird eine Zellsuspension mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern, die gegen die zu untersuchenden Antigene gerichtet sind, inkubiert und darauf folgend in einem FACS-Gerät analysiert. Dies erfolgt über eine Messung der Fluoreszenzemission, die während der Anregung durch einen Laser von den gebundenen Antikörpern ausgeht und damit ein Maß für die vorhandene Antigendichte auf einer Zelle darstellt.

Färbeprotokoll:

- Zellen in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer in einer Konzentration von ca. 3×10^5 Zellen/ml in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß aufnehmen
- 20minütige Inkubation mit einem oder mehreren verschieden fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Verdünnungen: CD3/CD19 \rightarrow 1:10; B7h \rightarrow 1:20) bei 4°C
- Zugabe von $900 \mu\text{l}$ FACS-Puffer, mischen
- 5 min zentrifugieren bei 2000 U/min und 4°C
- Überstand abpipettieren und verwerfen
- Pellet in $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendieren, in FACS-Röhrchen umfüllen und im Durchflusszytometer analysieren.

3.2.3.5 Separierung CD19-negativer und CD19-positiver Zellen aus PBL

Die Isolation einer Subpopulation wurde mit Hilfe des magnetischen Zellsortierers (MACS) durchgeführt. Hierbei wird zuerst eine Zellsuspension mit einem Antikörper inkubiert, der mit winzigen ferromagnetischen Teilchen (MicroBeats) konjugiert ist und gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen gerichtet ist, das die zu separierenden Zellen typisiert. Danach lässt man die Zellsuspension über eine Säule fließen, die von einem permanenten Magneten umgeben ist, und erhält auf diese Art und Weise eine Trennung in zwei Zellpopulationen. Die eine markierte Population bildet die Durchflussfraktion, und die andere, unmarkierte ist im magnetischen Feld der Säule hängen geblieben. Die beschriebene Methodik ist eine von zwei Möglichkeiten für eine magnetische Zellseparierung und wird als „positive Selektionierung“ bezeichnet.

Separierungsprotokoll:

- Zellen in 500 µl MACS-Puffer in einer Konzentration von bis zu 10^8 Zellen /ml in einem 15-ml-Falcon-Röhrchen aufnehmen
- 20minütige Inkubation mit 10% CD19-MicroBeats bei 4°C
- LS-Säule am Magneten festklemmen und mit 3 x 5 ml entgastem MACS-Puffer beschicken
- Nach der Inkubation Zellsuspension mit 9,5 ml PBS auffüllen und mischen
- 7 min zentrifugieren bei 1200 U/min und 4°C
- Überstand absaugen und verwerfen
- Pellet in 1 ml entgastem MACS-Puffer aufnehmen und über die Säule geben (Durchfluss wird in einem frischen 15-ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen und entspricht den CD19-negativen PBL)
- Die Säule mit 3 x 2 ml entgastem MACS-Puffer nachspülen und Flüssigkeit ganz durchlaufen lassen
- Säule aus der magnetischen Halterung in die Hand nehmen und über ein frisches 15-ml-Falcon-Röhrchen platzieren
- 3 ml entgastem MACS-Puffer auf die Säule geben und mit einem dazu passenden Spritzenstempel schnell durchpressen (Durchfluss entspricht den CD19-positiven PBL).

3.2.3.6 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolation aus den PBL oder deren Subpopulationen wurde nach der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) durchgeführt. Dazu werden die Zellen in einer Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung (GITC) aufgenommen, um darin lysiert zu werden und um sämtliche RNA-schädigende Proteine, wie z.B. RNasen, zu denaturieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Reagenz Trizol verwendet, welches aus GITC und Phenol zusammengesetzt ist. Danach wird die RNA mit Hilfe eines Phenol-Chloroform-Gemisches von Proteinen und DNA isoliert und in Isoamylalkohol präzipitiert. Abschließend wird das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in aqua dest. aufgenommen. Die RNA der CD19-negativen und -positiven Zellen wurde in mehreren Aliquots bei -80°C gelagert. Die aus anderen Zellen gewonnene RNA wurde gleich weiterverarbeitet oder ebenfalls tiefgefroren.

3.2.3.7 Reverse Transkription und Real-Time PCR

Das Umschreiben in cDNA und die Detektion der B7h-cDNA mittels der Real-Time PCR sind bereits unter 3.2.2.7 bzw. 3.2.2.10 beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen B7h

Der Einsatz der Immunhistochemie sollte es ermöglichen, als eine von zwei in dieser Arbeit verwendeten Methoden die Expression des B7h-Moleküls auf intestinalen Epithelzellen zu untersuchen. Hierbei interessierte vor allem die Frage, ob jenes Protein dort exprimiert wird, und wenn dieses der Fall ist, ob bei Proben von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein Unterschied in seiner Ausprägung – sowohl untereinander als auch mit gesunden Kontrollen verglichen – zu erkennen ist. Gefärbt wurden Gefrier- und Paraffinschnitte von Biopsieproben und Resektaten des Kolons von CED-Patienten (befallener und unbefallener Bereich) und von diesbezüglich Nichterkrankten sowie von lymphatischem Gewebe (Rachen- und Gaumenmandel) mit den anti-B7h-Antikörpern HIL-93 und HIL-131, für die erst ein Färbeprotokoll etabliert werden musste (s. Material und Methoden).

4.1.1 Gefrierschnitte – Erstellung eines Färbeprotokolls

Da im Paraffinmaterial die von Antikörpern erkannten Strukturen manchmal so verändert werden, dass eine spezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigen – wenn überhaupt – erst durch spezielle sog. Antigen-Retrieval-Methoden wieder ermöglicht werden kann, wurde die Färbung zunächst an Gefrierschnitten ausgetestet. Bei den jeweiligen Arbeitsschritten wurden nach Variation mehrerer Parameter folgende Beobachtungen gemacht:

Rehydrierung:

Bei Verwendung einer Rehydrierung der Schnitte vor dem Blocken endogener Peroxidasen schien die Morphologie weniger durch das eingesetzte Wasserstoffperoxid beeinträchtigt worden zu sein.

Block endogener Peroxidase:

Auf Grund störender Enzymumsetzung durch die in Erythrozyten und eosinophilen Granulozyten vorhandene endogene Peroxidase wurde ein Blocken des endogenen Enzyms für sinnvoll gehalten. Dabei erzielte man das beste Resultat mit einer 0,1 %igen H₂O₂-Lösung (in PBS), die es ermöglichte, die Färbeartefakte unter gleichzeitiger Schonung der Morphologie zu reduzieren. Nach dem Gebrauch von H₂O₂ in Methanol schien das Bindungsverhalten des Antikörpers beeinträchtigt worden zu sein, so dass keine positiven Färbungen mehr zu erreichen waren.

Block unspezifischer Bindungen:

Beim Vergleich aller vier ausgetesteten Möglichkeiten für das Blocken unspezifischer Bindungen (s. Material u. Methoden 3.2.1.3.1) waren allenfalls nur sehr geringe Unterschiede feststellbar. Deshalb wurden lediglich zwei Verfahren mit sonst üblich guten Färbeergebnissen ausgewählt (s. Tab. 4.1 Punkt 3).

Inkubation mit Primär-AK:

Mit einer Übernachtinkubation der Antikörper bei 4°C konnte zwar die unspezifische Hintergrundfärbung ein wenig reduziert werden, jedoch fiel damit auch die spezifische Färbung schwächer aus. Die Inkubation bei 37°C erbrachte keine Vorteile gegenüber der herkömmlichen Methode bei Raumtemperatur.

Bezüglich der Antikörperkonzentration wurde abhängig vom eingesetzten Detektionssystem für den Klon HIL-93 mit 20 – 41 µg/ml und für den Klon HIL-131 mit 19 – 57 µg/ml ein sehr guter Kompromiss aus starker spezifischer und schwacher unspezifischer Färbung erreicht.

Mit einer Verschiebung des pH-Wertes beim Antikörperverdünnungsmedium (Tris) ins Basische wurden die unspezifischen AK-Bindungen eher gefördert, so dass entweder PBS/BSA 1% oder eine bei Dako zu erwerbende Lösung verwendet wurde.

Inkubation mit Sekundär-AK u. Tertiärkomplex (Detektionssystem):

Mit allen drei Detektionssystemen (s. Material u. Methoden 3.2.1.3.1) konnten zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden, die sich in Distinktheit und Stärke der Färbung ein wenig unterschieden.

Chromogen:

Das Chromogen Nova Red wies eine wesentlich kräftigere Färbung auf als DAB. Deshalb wurde es im Protokoll vorgezogen.

Gegenfärbung:

Für das bessere Erkennen einzelner schwach gefärbter Zellen wurde die Gegenfärbung weggelassen. Ansonsten wurde zur Gegenfärbung Hämatoxylin trotz schlechterer Kontrastierung verwendet, da es gegenüber Methyl-Green ein besseres morphologisches Endergebnis lieferte.

Somit konnte folgendes Protokoll erstellt werden:

Tabelle 4.1: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für die anti-B7h-Antikörper (HIL-93 u. HIL-131) auf Gefrierewebe

Arbeitsschritt	verwendete Methodik	Zeitdauer
1) Rehydrierung	in Tris	10 min
2) Block endogener Peroxidase	H ₂ O ₂ (0,1%) in PBS	20 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
3) Block unspezifischer Bindungen	1. Ziegen-Normalserum (NGS)(3%) in Tris oder 2. NGS (3%) + BSA (1%) in PBS	15 min 15 min
Flüssigkeit abklopfen		
4) Inkubation mit Primär-AK (HIL-93 ; HIL-131)	A. Temperatur u. Dauer: bei RT B. Konzentration: <u>HIL-93</u> : 41; 20 µg/ml <u>HIL-131</u> : 57; 19 µg/ml C. AK-Verdünnungsmedium: - PBS/BSA 1% - Dako Antibody Diluent	60 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
5) Inkubation mit Sekundär-AK	1. anti-IgG _{Maus} -Biotin (Kit) oder 2. anti-IgG _{Maus} -Peroxidase (1,6 µg/ml) oder 3. anti-IgG _{Maus} -Polymer-Peroxidase (Kit)	30 min 30 min 30 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
6) Inkubation mit Tertiärkomplex (falls notwendig, s. 5.)	nur bei 5.1: Streptavidin-Peroxidase (Kit)	30 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
7) Chromogen	Nova Red	6 – 10 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	5 min
8) Gegenfärbung	1. keine oder 2. Hämatoxylin	5 sec
Bläuen	warmes H ₂ O _{dest}	2 min
Waschen	kalttes H ₂ O _{dest}	2 x 2 min

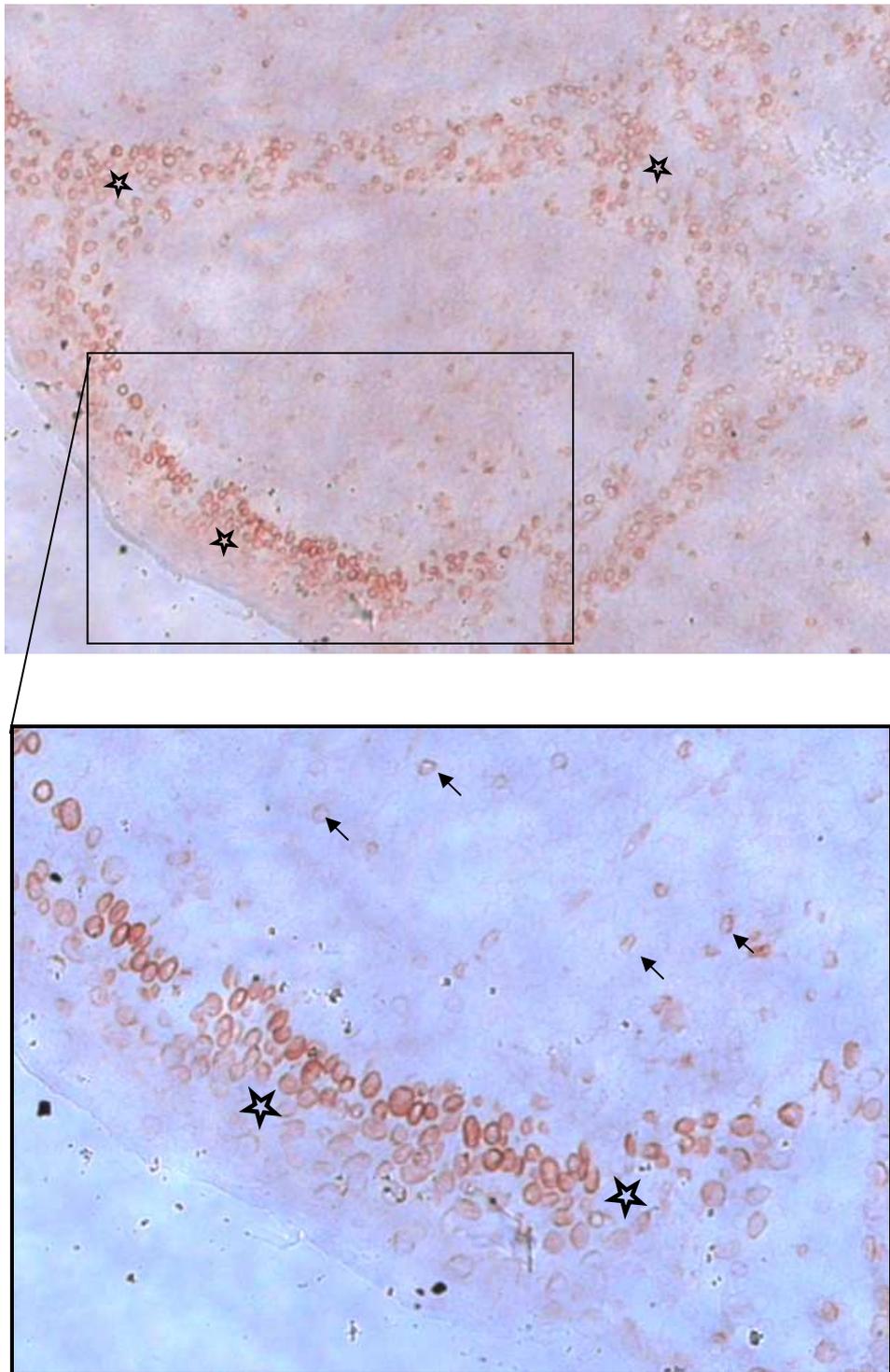
4.1.1.1 Rachen- und Gaumenmandel

Bei der IHC von lymphatischem Gewebe einer Rachen- oder Gaumenmandel, die wegen ihres hohen B-Zell-Gehaltes als Positivkontrolle für die B7h-Expression dienen sollte, konnte mit beiden Antikörpern eine eindeutige Färbung erzielt werden, wobei die zwei Klone ein leicht divergentes Muster aufwiesen. So lässt sich bei der Verwendung von HIL-93 ein kräftiges Signal fast ausschließlich vom Endothel der Gefäße wahrnehmen und nur sehr geringfügig vom mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel, welches das lymphatische Gewebe umgibt. Die Inkubation mit HIL-131 hingegen zeigt eine starke Färbung des Epithels, vor allem der basal liegenden Zellschicht, und eine nur wenig schwächere des Endothels. Zusätzlich waren vereinzelte Zellen im lymphatischen Gewebe nachweisbar, die sich topographisch aber nur schwer einem speziellen Bereich (B- oder T-Zellareal) zuordnen lassen.

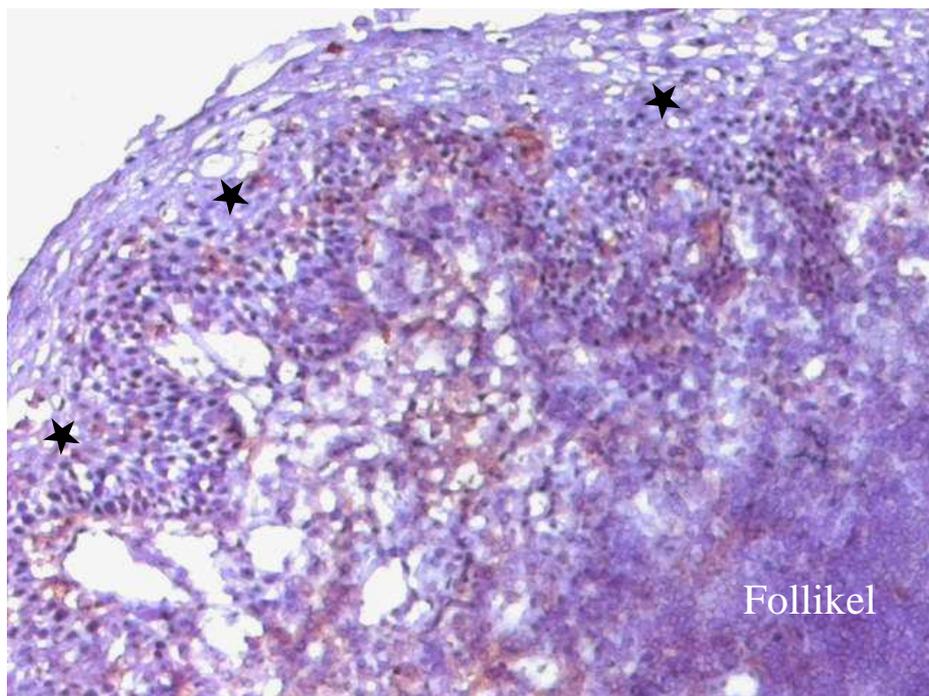
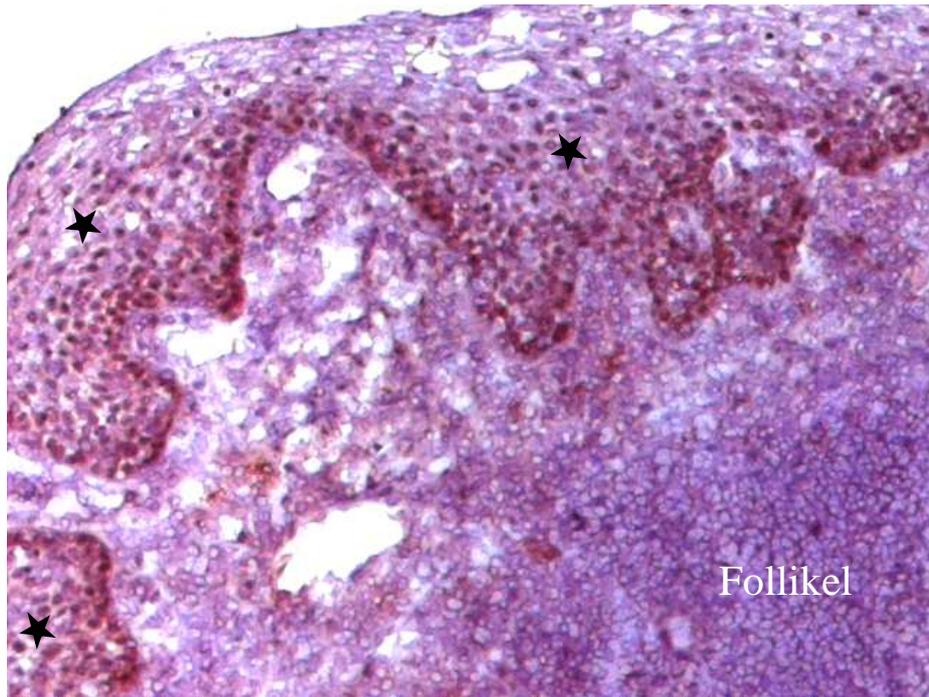
Das Färbemuster einer einzelnen Zelle ist eher als randständig zu deuten, was erwartungsgemäß für eine Oberflächenexpression von B7h sprechen würde.

Die bei jeder Versuchsreihe mitgeführten Isotypenkontrollen, die in der gleichen Konzentration eingesetzt wurden wie der Primär-Antikörper, fielen für die zu vergleichenden Strukturen durchweg negativ aus.

Überraschenderweise ließen sich jedoch keine B-Zellen mit diesen Antikörpern nachweisen.



Abbildungen 4.1 (oben) und **4.2** (unten): Immunhistochemie einer humanen Rachenmandel (Gefriermaterial) in 100facher Vergrößerung (4.1) bzw. in einer 200fachen Ausschnittsvergrößerung (4.2). Die mit anti-B7h-Ak gefärbten Strukturen stellen sich rotbraun dar. Der gefärbte ringförmig angeordnete Zellverband (★) entspricht dem unverhornten mehrschichtigen Plattenepithel, welches die Mandel umgibt. Neben den vor allem basal liegenden stark gefärbten Epithelzellen sind noch einzelne schwächer gefärbte Zellen (↖) innerhalb des lymphatischen Areals, das von dem Epithelzellverband umschlossen wird, zu sehen. *Methode:* HIL-131 (57 µg/ml) + ant-IgG-Peroxidase



Abbildungen 4.3 (oben) und **4.4** (unten): Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Gefriermaterial); gleicher Ausschnitt in 100facher Vergrößerung. Das Tonsillenepithel ist mit (★) markiert, darunter liegend das lymphatische Gewebe mit einem Follikelanschnitt. (4.3) zeigt eine starke Färbung des Epithels mit anti-B7h-AK. *Methode:* HIL-131 (19 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase. (4.4) zeigt die Isotypenkontrolle (Negativkontrolle). Es ist keine spezifische Färbung zu erkennen. *Methode:* NCOG2 (19 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase

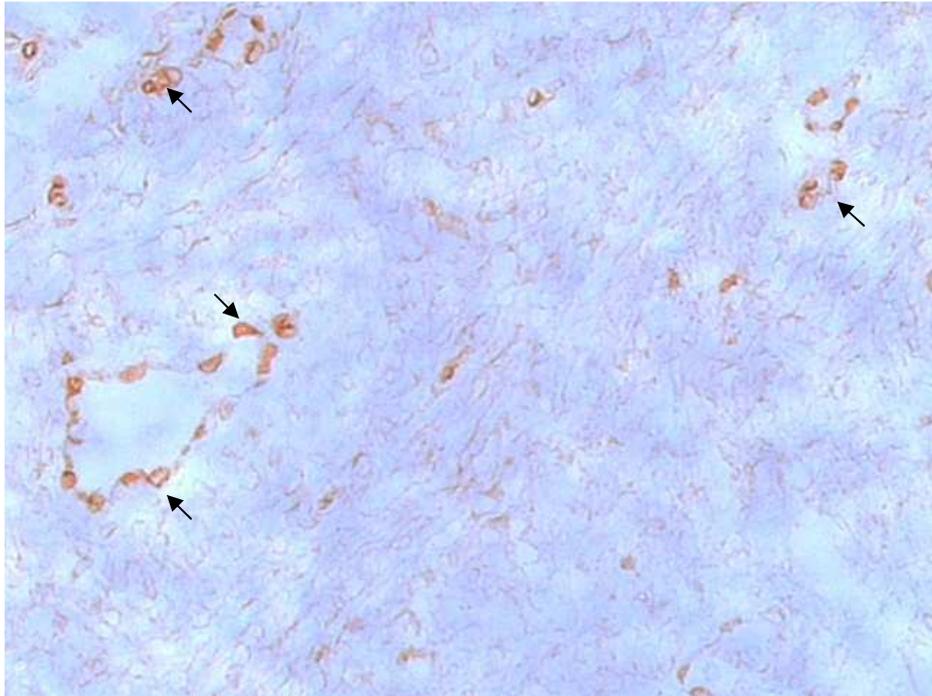


Abbildung 4.5: Immunhistochemie einer humanen Rachenmandel (Gefriermaterial) mit HIL-131; 200x. Zu erkennen sind gefärbte Endothelzellen (↖), die sich im lymphatischen Bereich befinden. *Methode:* HIL-131 (57 µg/ml) + anti-IgG-Peroxidase

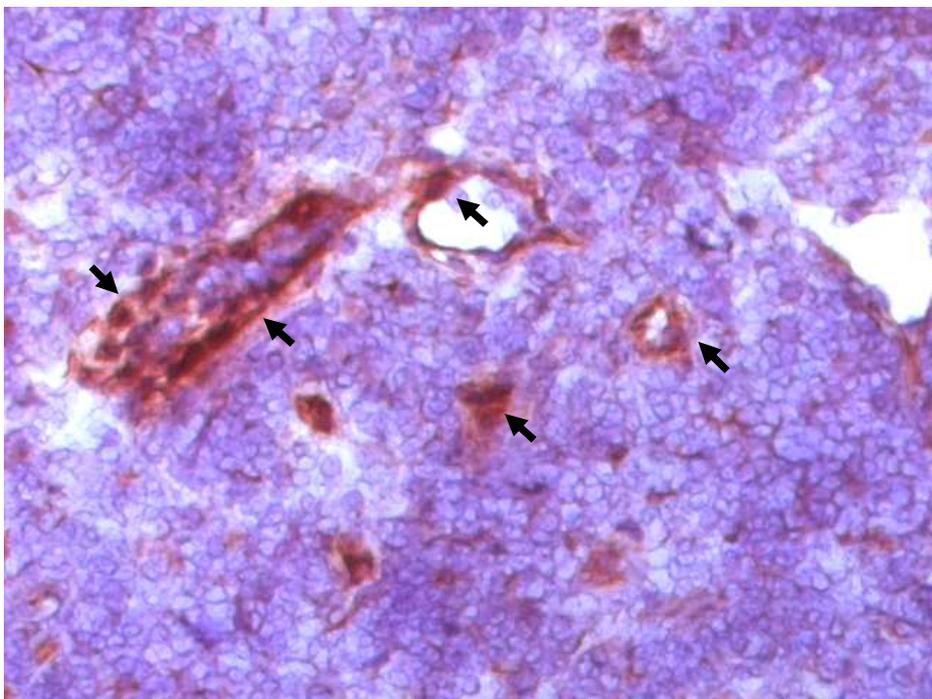


Abbildung 4.6: Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Gefriermaterial) mit HIL-93; 200x. Starke Färbung von Endothelzellen (↖). *Methode:* HIL-93 (20 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase

4.1.1.2 Dickdarm

Mit dem an der Positivkontrolle erfolgreich getesteten immunhistochemischen Protokoll wurde anschließend Dickdarmgewebe eines gesunden Patienten und eines Morbus-Crohn-Patienten untersucht.

Hierbei war keine spezifische Färbung irgendwelcher bestimmter Strukturen mehr erkennbar. Das Epithel der Schleimhaut hob sich in beiden Fällen durch seine diffuse Röte ein wenig von der restlichen Umgebung ab, wahrscheinlich auf Grund unspezifischer Antikörperbindungen, da ein solch ähnliches Phänomen auch in den Isotypenkontrollen zu beobachten ist.

4.1.2 Paraffinschnitte – Erstellung eines Färbeprotokolls

Da bei den Färbungen von Gefriermaterial hinsichtlich beider untersuchter Gewebe teilweise schwer zu interpretierende Ergebnisse erzielt wurden, einerseits wegen der fehlenden Nachweisbarkeit von B-Zellen im lymphatischen Gewebe und andererseits wegen der schlechten Färbequalität von Darmgewebe, wurden die Antikörper auf Paraffinmaterial ausgetestet. Bei der Erstellung des Färbeprotokolls konnten zu den einzelnen Arbeitsschritten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Antigendemaskierung:

Sowohl ohne Vorbehandlung zum Zweck einer Antigendemaskierung, als auch nach einer Hitze-Behandlung (s. Material u. Methoden, Tab. 3.10 Punkt 1) der Gewebsschnitte war kein positives Färbeergebnis zu erreichen. Hierbei orientierte ich mich an der Positivität des Tonsillenepithels auf Gefrierschnitten. Dasselbe Färbemuster konnte allerdings nach einer enzymatischen Vorbehandlung mit Protease erzielt werden.

Block endogener Peroxidase:

Das Blocken mit destilliertem Wasser als Verdünnungsmedium für Wasserstoffperoxid schien eine effektivere Wirkung zu besitzen als Methanol.

Block unspezifischer Bindungen:

Da sich die Färbung der einzelnen Strukturen schon relativ klar und ohne einen diffus gefärbten Hintergrund darstellen ließ, wurde auf diesen zusätzlichen Blockschritt verzichtet. Er schien ganz im Gegenteil sogar die spezifische Anfärbung in ihrer Intensität abzuschwächen.

Inkubation mit Primär-AK:

Der Versuch, mit einer Übernachtinkubation des Primär-Antikörpers bei 4°C eine stärkere spezifische Färbung und eine noch geringere unspezifischere Hintergrundfärbung zu erlangen, zeigte nicht die erwünschte Wirkung. Deshalb blieb man bei der gängigen einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Bezüglich der Austestung verschiedener Verdünnungsstufen wurden für die Klone HIL-93 mit einer Konzentration von 61 µg/ml und für HIL-131 mit 114 µg/ml die besten Resultate erzielt.

Inkubation mit Sekundär-AK und Tertiärkomplex (Detektionssystem):

Hier kristallisierte sich eindeutig das Detektionssystem – bestehend aus einem biotinylierten Sekundär-Antikörper und einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (LSAB-Methode) – als das Beste heraus. Bei Austestung des CSA-Systems (s. Material u. Methoden 3.2.1.4.) zeigte sich dasselbe Bild einer starken Anfärbung des intestinalen Epithels auch bei der Isotypenkontrolle, was auf Grund der sehr hohen Sensitivität dieser Methode auf eine unspezifische Färbung endogener Immunglobuline schließen lässt und somit die Anwendung des CSA-Systems unmöglich machte.

Diese Beobachtungen führten zur Erstellung des folgenden Protokolls:

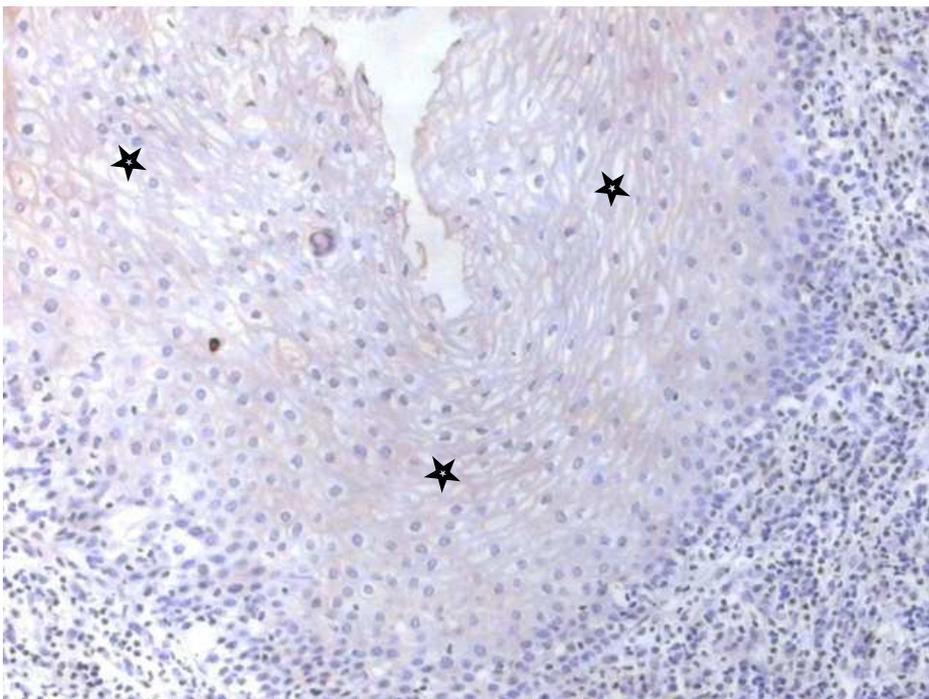
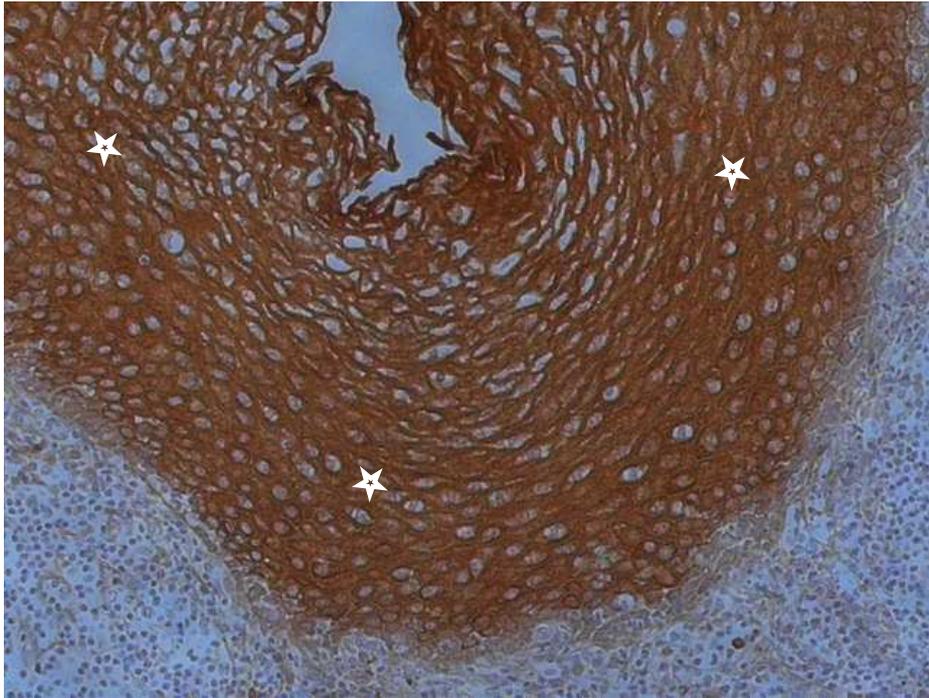
Tabelle 4.2: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für die anti-B7h-Antikörper (HIL-93 u. HIL-131) auf Paraffingewebe

Arbeitsschritt	Variation diverser Parameter	Zeitdauer
1) Antigendemaskierung (Retrieval-Methode)	Enzymatische Demaskierung mit Protease	20 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
2) Block endogener Peroxidase	H ₂ O ₂ (3%) in H ₂ O _{dest}	15 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
3) Inkubation mit Primär-AK (HIL-93 ; HIL-131)	A. Temperatur u. Dauer: bei RT B. Konzentration: <u>HIL-93</u> : 61 µg/mg <u>HIL-131</u> : 114 µg/ml	60 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
4) Inkubation mit Sekundär-AK	anti-IgG _{Maus} -Biotin (Kit)	30 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
5) Inkubation mit Tertiärkomplex	Streptavidin-Peroxidase (Kit)	30 min
Waschen	Tris	3 x 3 min
6) Chromogen	DAB	15 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	5 min
7) Gegenfärbung	Hämatoxylin	5 sec
Bläuen	warmes H ₂ O _{dest}	2 min
Waschen	kalt H ₂ O _{dest}	2 x 2 min

4.1.2.1 Gaumenmandel

Auf Paraffinmaterial ist das Färbeverhalten beider Antikörper (HIL-93 u. HIL-131) sehr ähnlich. Es werden fast ausnahmslos Epithelzellen stark positiv dargestellt. Endothelzellen zeigten im Gegensatz zum Gefriermaterial allenfalls eine sehr schwache Färbung. Andere deutlich spezifisch gefärbte Zellen, die auf B-Zellen schließen lassen könnten, sind im Präparat nicht bestimmt nachweisbar. Betrachtet man das Färbemuster einer einzelnen Zelle, so ist dieses nicht ganz mit der klaren Randständigkeit, wie sie auf Gefriergewebe gefunden wurde, vergleichbar. Die verstärkt intrazelluläre Färbung einiger vereinzelter Zellen könnte aufgrund der klassischen Morphologie (großes Zytoplasma, exzentrisch liegender Kern) Plasmazellen markieren.

Die Isotypenkontrolle blieb negativ.



Abbildungen 4.7 (oben) und **4.8** (unten): Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Paraffinmaterial); gleicher Ausschnitt in 100facher Vergrößerung. (4.7) zeigt stark gefärbtes Tonsillenepithel (★) mit anti-B7h-AK. *Methode:* HIL-93 (61 µg/ml) + IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase. (4.8) entspricht der Isotypenkontrolle (Negativkontrolle). Es ist keine spezifische Färbung zu erkennen. *Methode:* NCOG2 (61 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase

4.1.2.2 Dickdarm

Die Färbung wurde an Biopsiematerial von CED-Patienten ausgetestet. Dabei ist generell nur eine mittelstarke bis schwache Färbung der Epithelzellen zu erkennen; augenscheinlich unabhängig davon, ob die Probe aus einem makroskopisch befallenen oder nicht befallenen Gebiet herkommt. Weiterhin lassen sich einige Zellen in der Lamina propria mucosae nachweisen, die zwar ein wenig schwächer, aber ebenfalls genauso wie die Epithelzellen in der Isotypenkontrolle detektierbar sind. Deshalb ist hier eine exakte Aussage über die Spezifität der Färbung nicht möglich.

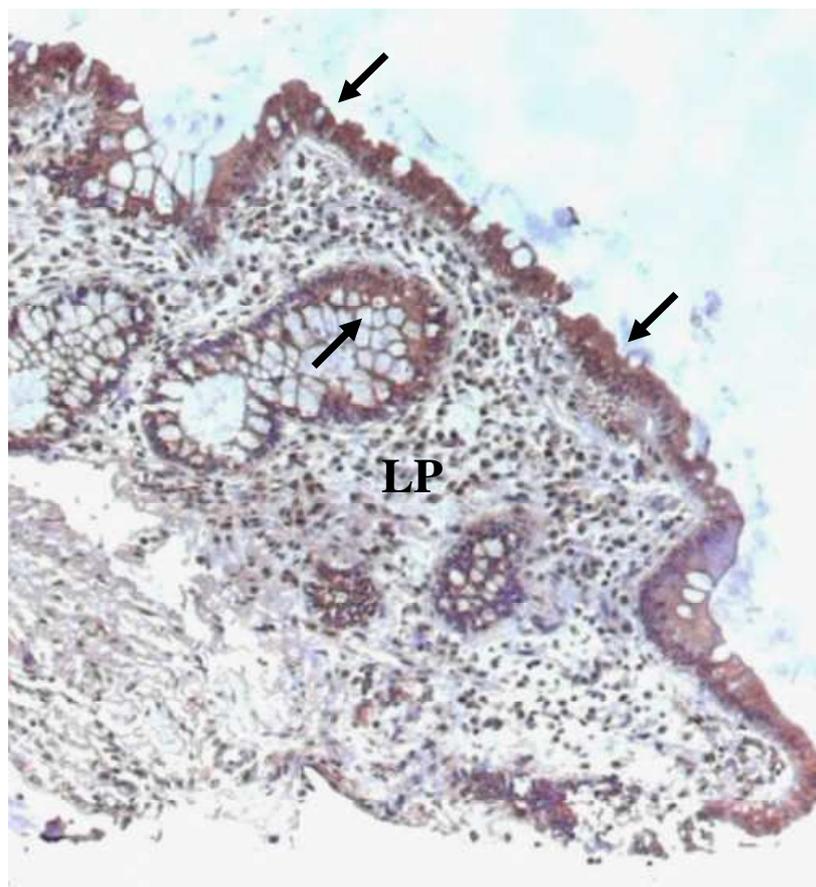


Abbildung 4.9: [siehe Legende der Abb. 4.10]

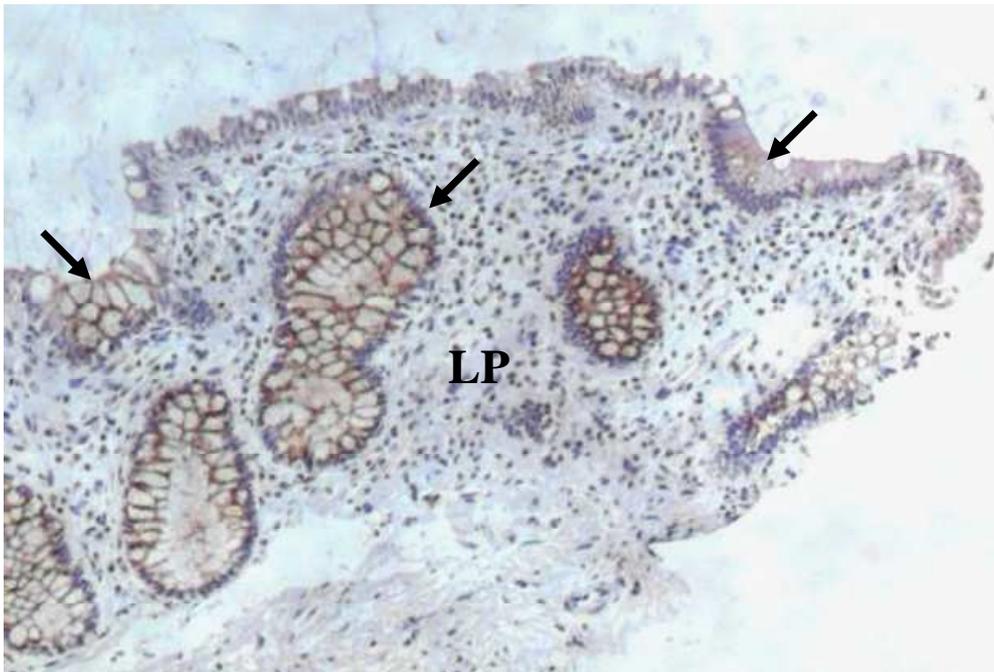


Abbildung 4.10: Immunhistochemie von Kolonschleimhaut aus einem nicht entzündeten Bereich eines Morbus-Crohn-Patienten (Paraffinmaterial); gleicher Ausschnitt in 100facher Vergrößerung.

(4.9) zeigt bei der IHC mit anti-B7h-AK eine mittelstarke Färbung des intestinalen Epithels (\blacktriangleright) und einiger Zellen aus der Lamina propria (LP).

Methode: HIL-93 (61 $\mu\text{g/ml}$) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase (4.10) stellt die Isotypenkontrolle (Negativkontrolle) dar. Auch hier ist eine leichte Färbung des Epithels und einiger Zellen aus der Lamina propria zu sehen. *Methode:* NCOG2 (61 $\mu\text{g/ml}$) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase

4.1.3 Zusammenfassung immunhistochemischer Ergebnisse

Bei der immunhistochemischen Untersuchung des lymphatischen Gewebes (Rachen- und Gaumenmandel) mit anti-B7h-Ak zeigt sich sowohl im Gefrier- als auch im Paraffinmaterial eine deutliche Positivität für B7h von Epithel- und Endothelzellen. Zusätzlich ließen sich einige diffus verstreute Zellen nachweisen, die jedoch nicht einer definierten Zone wie beispielsweise einer T- oder B-Zellzone zuzuordnen sind. Die Stärke der Ausprägung sowie die Präferenz für die genannten Zellen variiert je nach Verwendung des jeweiligen Antikörpers (s. Tab. 4.3).

Unter Anwendung des gleichen Färbeprotokolls konnte hingegen in der Immunhistochemie der Dickdarmschleimhaut aufgrund eines diffusen unspezifischen Färbeverhaltens die B7h-Expression mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht ausreichend beurteilt werden. Dies gilt sowohl für das Gefrier- als auch für das Paraffinmaterial. Somit ist eine genauere Differenzierung der B7h-Expression auf intestinalen Epithelzellen aus gesunden Arealen und Arealen unterschiedlicher entzündlicher Aktivität mittels IHC nicht möglich. Dieser Missstand machte eine weitere Methodik zur B7h-Expressionsanalyse erforderlich. Die Entscheidung fiel auf eine quantitative Untersuchung der B7h-mRNA.

Tabelle 4.3: Zusammenfassender Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse. Gefärbt wurden Gefrier- und Paraffinschnitte aus Tonsillen- und Kolongewebe mit den anti-B7h-Antikörpern HIL-93 und HIL-131 sowie mit einem Isotypenantikörper als Negativkontrolle. Die Intensität der IHC-Färbung ist aufsteigend von „ - “ (keine Färbung) über „ + - “ (allenfalls sehr schwache Färbung) bis hin zu „ +++ “ (sehr starke Färbung) bewertet

		Gefriergewebe			Paraffingewebe		
		HIL-93	HIL-131	Isotyp	HIL-93	HIL-131	Isotyp
Tonsille	Epithel	+	+++	-	+++	++	-
	Endothel	+++	++	-	+	+	-
	Einzelne Zellen im lymphatischen Areal	+	++	-	+	+	-
Kolon	Epithel	+	+	+	++	++	+
	Einzelne Zellen in der Lamina propria	+	+	+	+	++	+ -

4.2 Laser-Capture-Microdissection und Real-Time RT-PCR

Die zweite angewendete Methode zur Untersuchung der B7h-Expression auf intestinalen Epithelzellen fand molekularanalytisch auf mRNA-Ebene statt. Das Ausgangsmaterial, aus dem die RNA isoliert wurde, stellte Paraffingewebe von CED- und Nicht-CED-Patienten dar (s. Material u. Methoden, Tab. 3.5, 3.6, 3.7). Zusätzlich sollten die nicht eindeutigen und schwer zu interpretierenden immunhistochemischen Daten auf diese Weise miteinander verglichen werden.

4.2.1 Bilddokumentation des Dissektionsvorgangs

Da es während der Mikrodissektion möglich ist, von den einzelnen Schritten Aufnahmen zu machen, zeigen die folgenden Abbildungen 4.11 – 4.14 exemplarisch den Verlauf einer LCM. Nachdem ein geeignetes Areal zum Dissezieren ausgewählt worden war, wurde es zentral im Blickfeld eingestellt (Abb. 4.11). Vorzugsweise wurde mit dem Laser die oberflächliche Epithelzellreihe entlangefahren, jedoch konnte vor allem bei Biopsiematerial die wesentlich aufwendigere Dissektion von tiefen Kryptenarealen auf Grund mangelnder Alternativen oft nicht vermieden werden. Trotz der relativ schlechten Sicht (einfache Hämatoxylinfärbung, ohne Deckglas) während der LCM, bezogen auf die Kontrastierung einzelner Zellen und Strukturen, konnte das intestinale Epithel auf Grund seiner günstigen Lage und seines typischen Erscheinungsbildes eindeutig von seiner Umgebung abgegrenzt werden (s. Abb. 4.12). Obwohl je Probe konstant eine Anzahl von ca. 900 – 1000 Laserschüssen (Abb. 4.12) abgegeben wurde, lässt sich daraus nur grob auf die Menge der dissezierten Zellen schließen. Dies liegt daran, dass die eingestellte Größe des Laserspots trotzdem abhängig von der Gewebsbeschaffenheit und der Gewebe-Capfilm-Interaktion von Schnitt zu Schnitt variiert. Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 3 – 5 dissezierten Zellen pro 7,5 µm breiten Spot, welcher meistens verwendet wurde, werden so insgesamt ca. 2700-5000 Zellen pro Probe isoliert. Die Abbildung 4.14 zeigt dasselbe Resektatgewebe nach Laserbeschuss und Abheben des Caps, auf dem die oberflächlich dissezierte Epithelzellreihe zu sehen ist (Abb. 4.13).

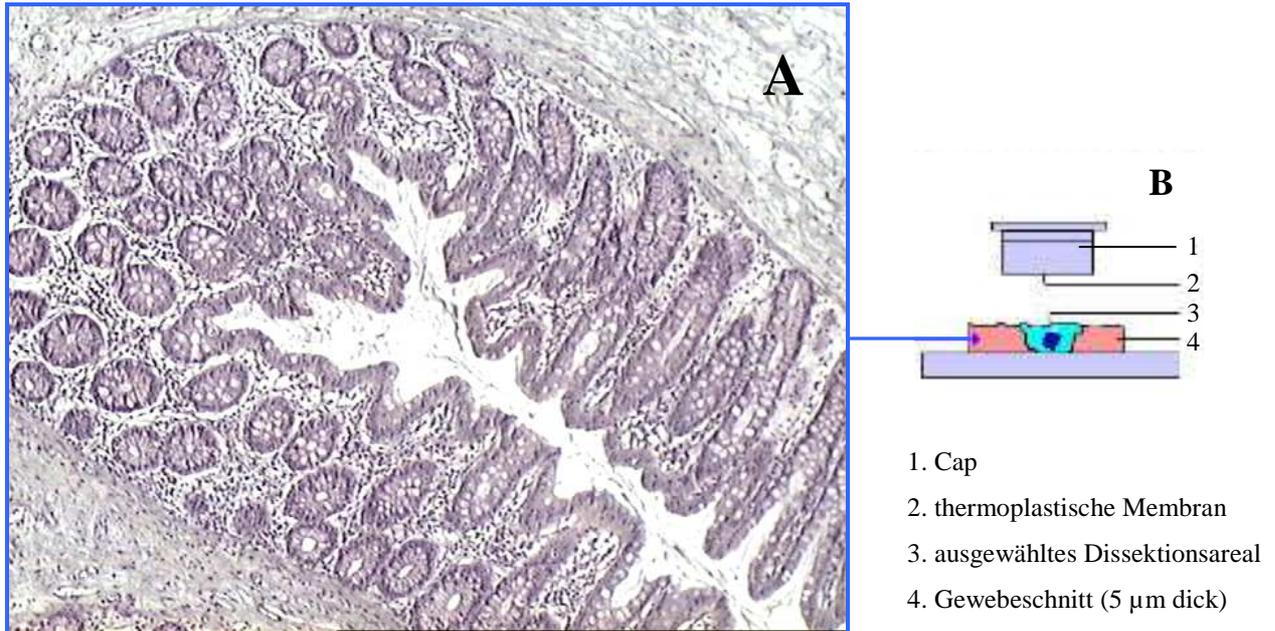


Abbildung 4.11: Aufnahme mit Diffusionsfilter vor Beginn der LCM (s. Schema B). Das mikroskopische Bild (A) zeigt das zur Dissektion eingestellte Schleimhautareal eines Kolonresektates von einem Patienten ohne CED. Zum Lumen hin wird das Gewebe durch das oberflächliche intestinale Epithel abgegrenzt. Dies ist zugleich auch die Zielstruktur für den Laservorgang. 40x

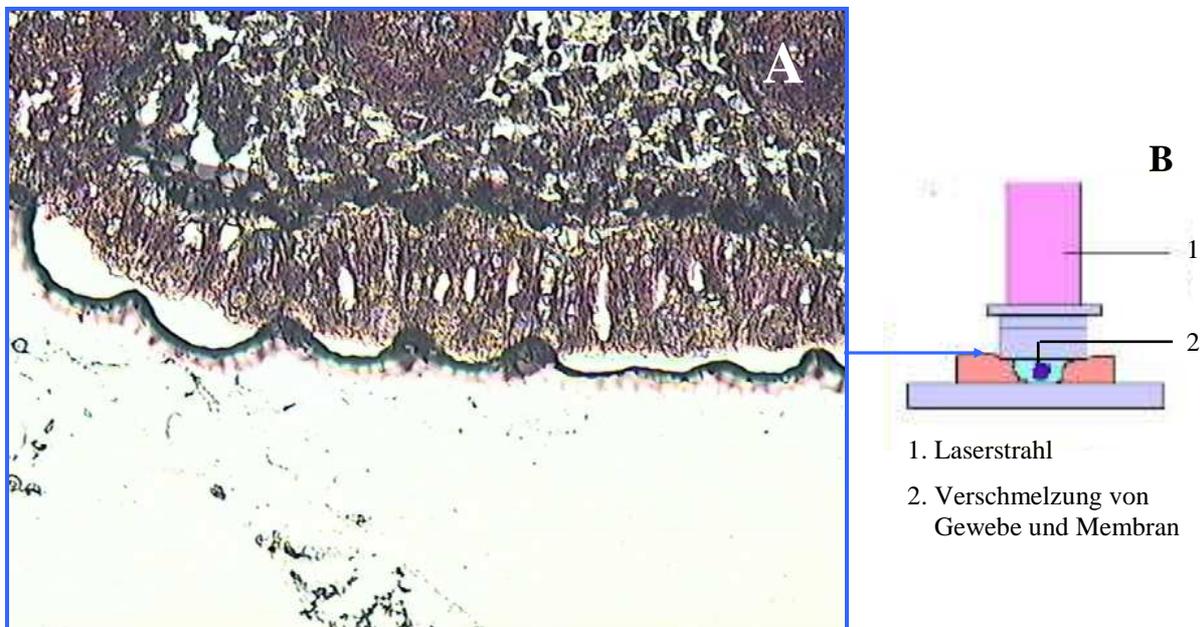


Abbildung 4.12: Aufnahme ohne Diffusionsfilter während des Laserns (s. Schema B). Die Abbildung links (A) zeigt ein Teilstück des Resektatgewebes aus Abb. 4.11 bei 200facher Vergrößerung. An das Lumen grenzend sieht man eine Reihe von Epithelzellen, die beidseits von einer gewellt verlaufenden schwarzen Linie (= Grenze zwischen verschmolzener und nicht verschmolzener Membran des Caps, die die einzelnen sich überlappenden Laserspots markiert) umrandet sind

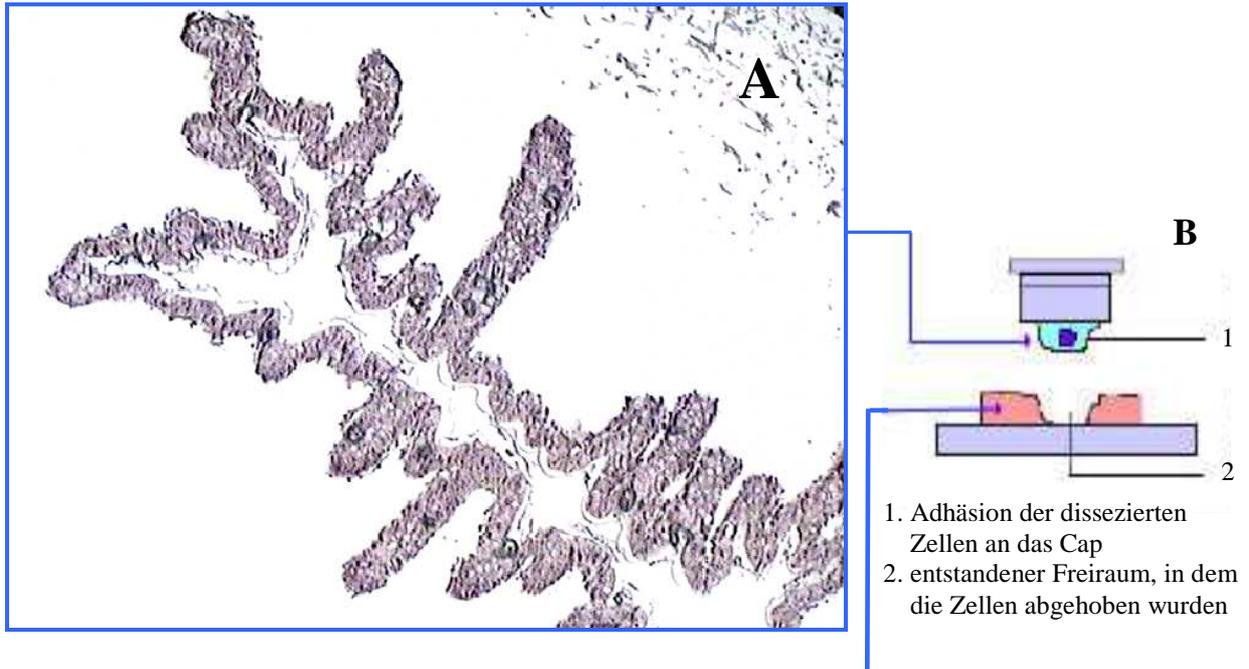


Abbildung 4.13: Aufnahme mit Diffusionsfilter vom Cap nach der LCM (s. Schema B). Die Abbildung links (A) zeigt die dissezierte intestinale Epithelzellreihe, die noch in Abb. 4.11 im Gewebe zu sehen ist. Die abgelaserten Zellen behalten ihre ursprüngliche Morphologie. 40x

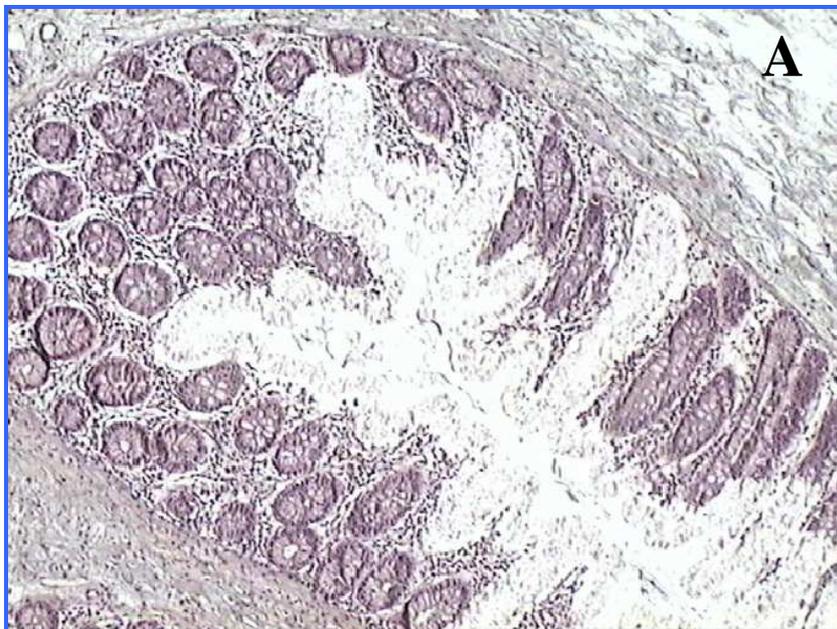


Abbildung 4.14: Aufnahme mit Diffusionsfilter nach der Dissektion und Abheben des Caps (s. Schema B). Die Abbildung links (A) zeigt den zusätzlich entstandenen Freiraum zum Lumen hin, in dem die Epithelzellen abgehoben wurden. Ihr ehemaliger Sitz wird noch schwach durch zurückgebliebenes Restmaterial angedeutet. Die Umgebung erscheint nach der LCM morphologisch vollkommen unverändert. 40x

4.2.2 Voraussetzungen für die Anwendung der relativen Quantifizierung

Alle vier im Material- und Methodenteil aufgelisteten Voraussetzungen, die für eine relative Quantifizierung geprüft werden müssen, wurden ausnahmslos erfüllt. Sowohl die Amplifikationseffizienz des Zielgens (B7h) als auch die des Housekeeping-Gens (GAPDH) ist unabhängig von der eingesetzten cDNA-Menge. Kontrolliert wurde dies, indem jeweils die C_T -Werte für eine vierstufige Verdünnungsreihe der in den TaqMan eingesetzten cDNA bestimmt wurden. Das gegenseitige Auftragen der logarithmisch transformierten cDNA-Mengen und der gewonnenen C_T -Werte ergibt einen linearen Verlauf der Regressionsgeraden, wodurch mathematisch eine von der cDNA-Menge unabhängige lineare Amplifikationseffizienz bestätigt wird (s. Abb. 4.15). Weiterhin wurden die Primer-Sondenpaare so gewählt, dass die Amplifikationseffizienz beider Gene, des Housekeeping-Gens und des Zielgens, auch relativ identisch ist. Formal lässt sich dies durch die Berechnung der Steigung der Regressionsgeraden bei einer graphischen Gegenüberstellung der verschiedenen cDNA-Mengen (logarithmisch) mit den entsprechenden $\Delta C_T (= C_{T,B7h} - C_{T,GAPDH})$ -Werten überprüfen, wobei die Steigung zwischen $-0,1$ und $+0,1$ liegen muss (Abb. 4.16).

Die Erfüllung der letzten Bedingung, die eine durchweg konstante Expression des Housekeeping-Gens beinhaltet, wurde an einer Kultur mit T-84-Zellen ausgetestet, die hinsichtlich vieler Veröffentlichungen ein etabliertes Modell für intestinale Epithelzellen darstellt. Abb. 4.17 zeigt jeweils die gleichen Expressionslevel der beiden untersuchten Housekeeping-Gene GAPDH und HPRT in Relation zur 18S-rRNA-Expression für den Zeitpunkt „vor“ und „nach Stimulation“ (16 h) mit $TNF\alpha$. Letzteres wurde ausgewählt, da es bei CED-Patienten (vor allem bei Morbus Crohn) eine wesentliche Rolle in der Entstehung und der Unterhaltung der Entzündung spielt, was sich in der außerordentlich wirksamen Behandlung mit anti- $TNF\alpha$ Antikörper widerspiegelt. Um die Verwendung eines Housekeeping-Gens in dem Normalisierungs-Ansatz zu validieren, wurde für drei mögliche Housekeeping-Gene jeweils der Quotient der C_T -Werte von zwei Housekeeping-Genen aus der unstimulierten Probe mit dem Quotienten verglichen, der aus den stimulierten Zellen erhalten wurde. Bei idealen internen Kontrollen für einen Normalisierungs-Ansatz errechnet sich durch Division beider Quotienten ein Fehler „E“, der den Wert 1 hat (Vandesompele et al. 2002). Diese Bedingung konnte – wie der Tabelle 4.4 zu entnehmen ist – erfüllt werden.

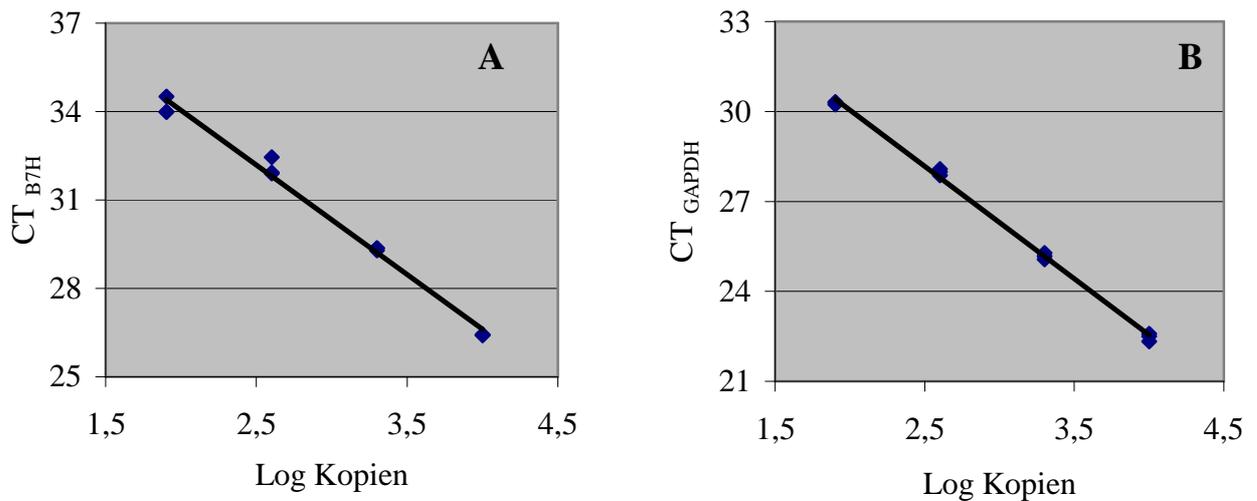


Abbildung 4.15: Abhängigkeit der C_T -Werte von der eingesetzten cDNA-Menge. Die C_T -Werte für die B7h-cDNA (A) und für GAPDH (B) wurden für eine vierstufige Verdünnungsreihe der cDNA (= Kopienanzahl) bestimmt. Die Korrelationskoeffizienten sind $R^2 = 0,9975$ (A) und $R^2 = 0,9906$ (B)

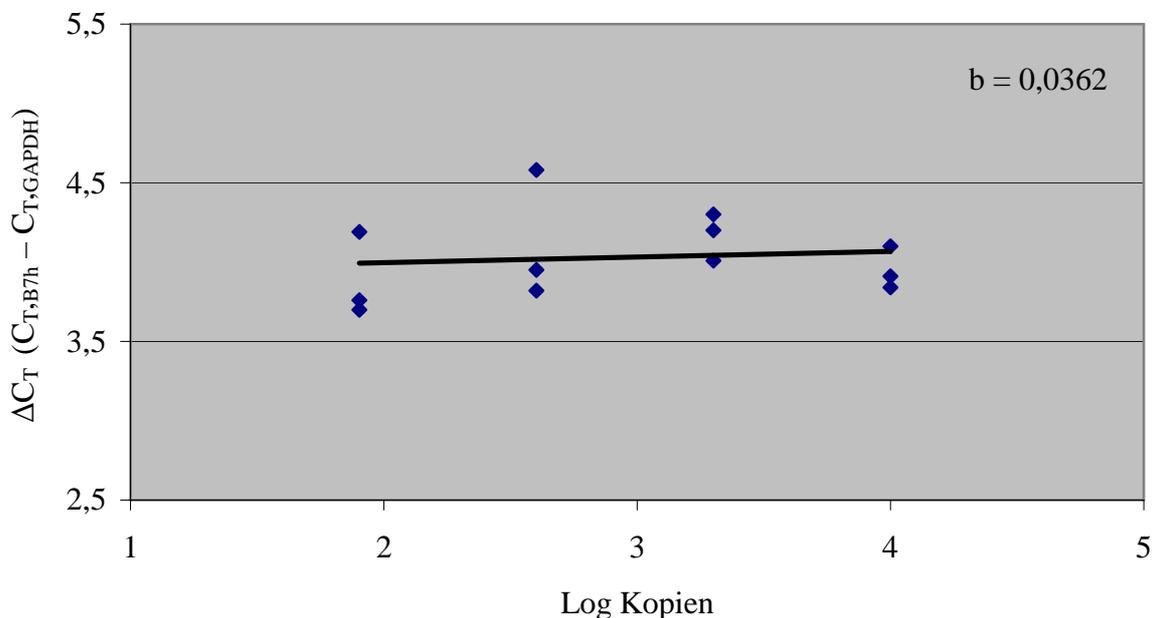


Abbildung 4.16: Abhängigkeit der ΔC_T -Werte von der eingesetzten cDNA-Menge. Die ΔC_T -Werte errechnen sich aus $(C_{T,B7h} - C_{T,GAPDH})$, wobei die jeweiligen cDNA-Mengen aus gleichen vierstufigen Verdünnungsschemata herkommen. „b“ entspricht der Steigung der linearen Regressionsgeraden

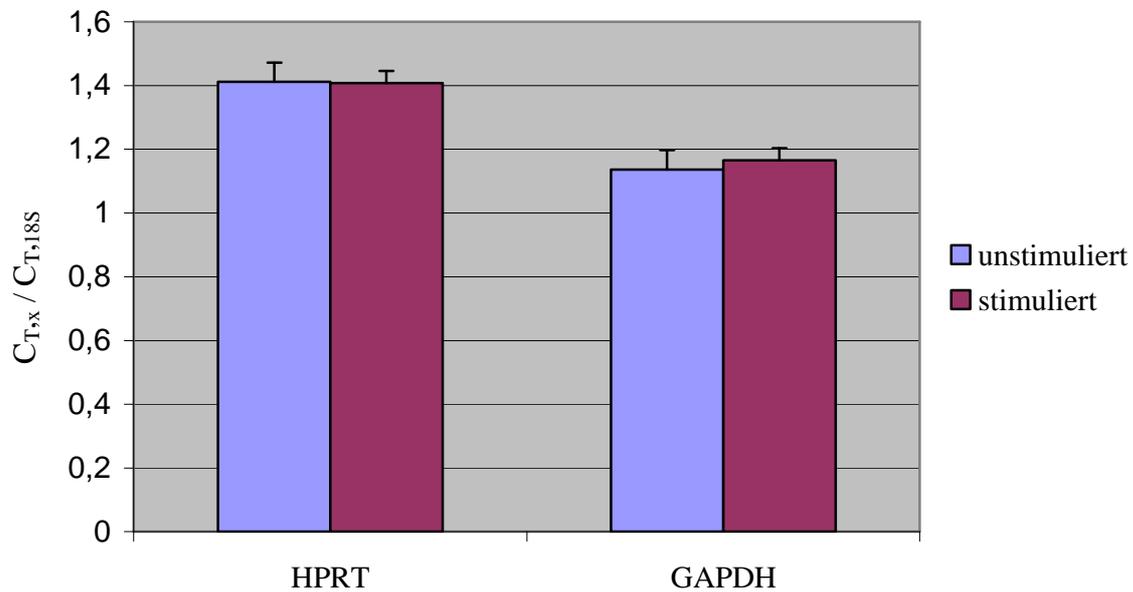


Abbildung 4.17: Expression der Housekeeping-Gene HPRT und GAPDH in Relation zur 18S rRNA-Expression vor und nach Stimulation mit TNF α , getestet an der Tumorzelllinie T-84. x = GAPDH bzw. HPRT.

Tabelle 4.4: Beziehung zwischen jeweils zwei Housekeeping-Genen aus unstimulierten und stimulierten (TNF α) T-84-Zellen zur Validierung des Normalisierungs-Ansatzes. Dafür wird der Fehler „E“ berechnet

$\frac{\text{HPRT} / \text{GAPDH}_{\text{unstimuliert}}}{\text{HPRT} / \text{GAPDH}_{\text{stimuliert}}}$	E = 0,97254055
$\frac{\text{HPRT} / 18\text{S}_{\text{unstimuliert}}}{\text{HPRT} / 18\text{S}_{\text{stimuliert}}}$	E = 0,97517962
$\frac{\text{GAPDH} / 18\text{S}_{\text{unstimuliert}}}{\text{GAPDH} / 18\text{S}_{\text{stimuliert}}}$	E = 1,002713215

4.2.3 Primäranalyse der TaqMan-Daten

Den weiteren Berechnungen liegen die aus jedem Reaktionsgefäß einzeln aufgezeichneten Amplifikationskurven zugrunde. Man erhält auf diese Weise zwei graphische Darstellungen, eine für den verwendeten Reporterfarbstoff „VIC“, der die Amplifikation des Haushaltgens kennzeichnet, und eine für „FAM“, der die Amplifikation des Zielgens anzeigt. Veranschaulicht wird dies in Abbildung 4.18, in der jeweils ein Beispiel für die Amplifikation einer Biopsieprobe aus einem befallenen und einem nicht befallenen Areal sowie eines Kalibrator-Aliquots (aus CD19-negativen PBL gewonnene RNA) dargestellt wird. Vergleicht man jeweils intern die C_T -Werte beider Biopsien mit dem des Kalibrator, so wird eine deutliche Zyklusverschiebung des C_T -Werts (13 bzw. 9 Zyklen) für die Biopsie nach hinten erkennbar. Dies lässt sich zum einen über den Einsatz einer geringeren Zellzahl erklären, die für die RNA-Isolierung aus Biopsatgewebe zur Verfügung stand, und zum anderen über die wesentlich schlechtere RNA-Qualität nach der Paraffineinbettung. Beim Vergleich der Amplifikationskurven beider Gene zeigt sich sowohl für den Kalibrator als auch für die Biopsie ein späterer Anstieg für B7h. Dieses Ergebnis bestätigt die erwartungsgemäß äußerst geringen Durchschnittsmengen von B7h-mRNA. Da die Zyklusdivergenz zwischen GAPDH und B7h für die Biopsien kleiner ausfallen als für den Kalibrator, liegt im Kolonepithel eine höhere B7h-Expression als in den CD19 negativen PBL vor. Weiterhin lässt sich in diesem Beispiel bei der B7h-Amplifikation ein um einen Zyklus größerer C_T -Wert für die Probe aus entzündetem Bereich verglichen mit der aus nicht entzündetem Bereich feststellen (bei gleichen C_T -Werten bei der GAPDH-Amplifikation), was einer etwa um die Hälfte geringeren B7h-Expression entspricht.

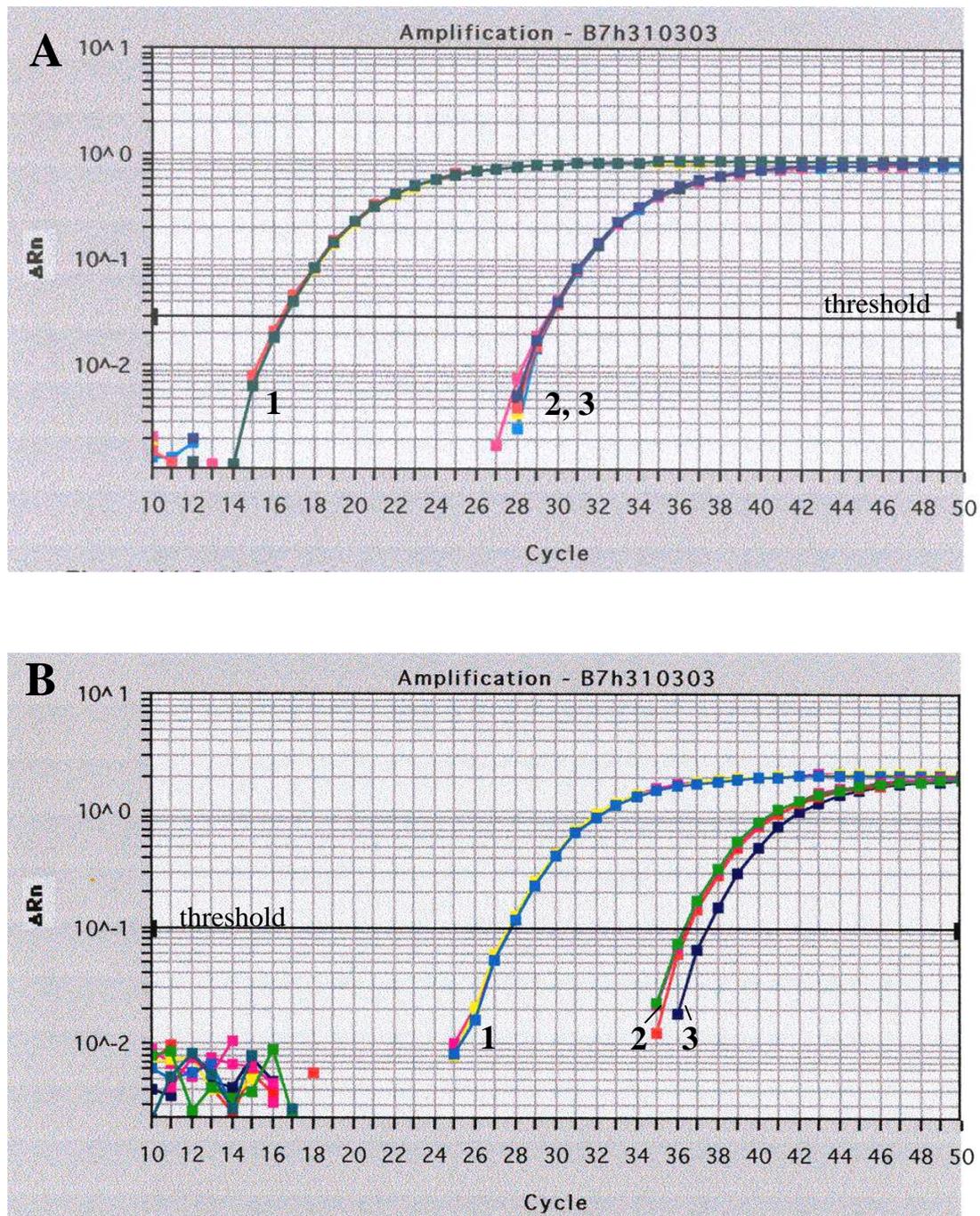


Abbildung 4.18: Durch Real-Time PCR (TaqMan) erstellte Amplifikationskurven des Housekeeping-Gens GAPDH (A) und des Zielgens B7h (B) (= amplification plot). Die cDNA stammt aus CD19-negativen PBL = Kalibrator (1) sowie aus einer Gewebeprobe aus befallenem (3) und nicht befallenem (2) Bereich desselben Morbus-Crohn-Patienten. Da die Messungen jeweils in drei Reaktionsgefäßen durchgeführt wurden, können pro untersuchtem Gewebe bis zu drei Kurven sichtbar werden, falls sie sich nicht gegenseitig überdecken. In (A) fallen die Kurven von 2 und 3 zusammen. Abszisse = Zyklusnummer; Ordinate = Fluoreszenzintensität von VIC (A) und FAM (B)

4.2.4 B7h-Expression der CD19-negativen und CD19-positiven PBL

Die in CD19-negativ und CD19-positiv separierten PBL-Populationen dienten für die folgenden Versuche als Vergleichspopulationen für Zellen mit geringer B7h-Expression (CD19-negative Zellen) bzw. für Zellen mit höherer B7h-Expression (B-Zellen). Die Reinheit der isolierten CD19-Fraktionen wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse überprüft und betrug 89,93% CD19⁺-Zellen in der Fraktion „CD19-positiv“ bzw. 61,15% CD3⁺-Zellen in der Fraktion „CD19-negativ“.

Hinsichtlich der B7h-Expression zeigen CD19-positiv PBL einen ca. 51fach höheren Wert als die der CD19-negativen PBL. Da letztere im Rahmen der relativen Quantifizierung auch als Referenzwert dienen, ist die B7h-Expression definitionsgemäß 1fach (s. Abb. 4.19).

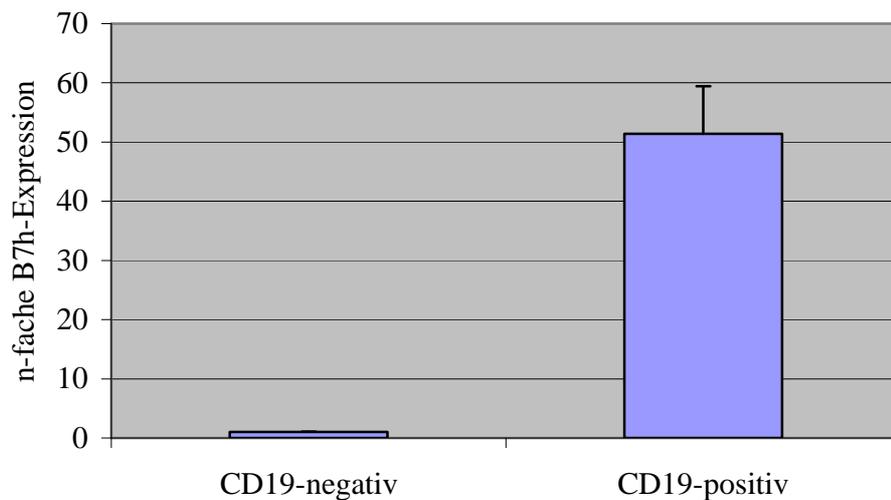


Abbildung 4.19: Relative B7h-Expression CD19-negativer und CD19-positiver PBL. Den Referenzwert liefern CD19-negative PBL

4.2.5 B7h-Expression im Tonsillenepithel und in der Lamina propria mucosae des Dickdarms

Verglichen mit den CD19-negativen PBL weist das Tonsillenepithel eine fast 82fach höhere B7h-Expression auf. Einen ungefähr ähnlichen sehr großen Wert (73fach) liefert das dissezierte Lamina-propria-Gewebe aus entzündeten Arealen. Da hingegen die gleiche Schicht aus nicht befallenen Bereichen eine viel geringere Expression (18fach) aufzeigt, scheinen die infiltrierenden Entzündungszellen für die hohe B7h-Expression verantwortlich zu sein.

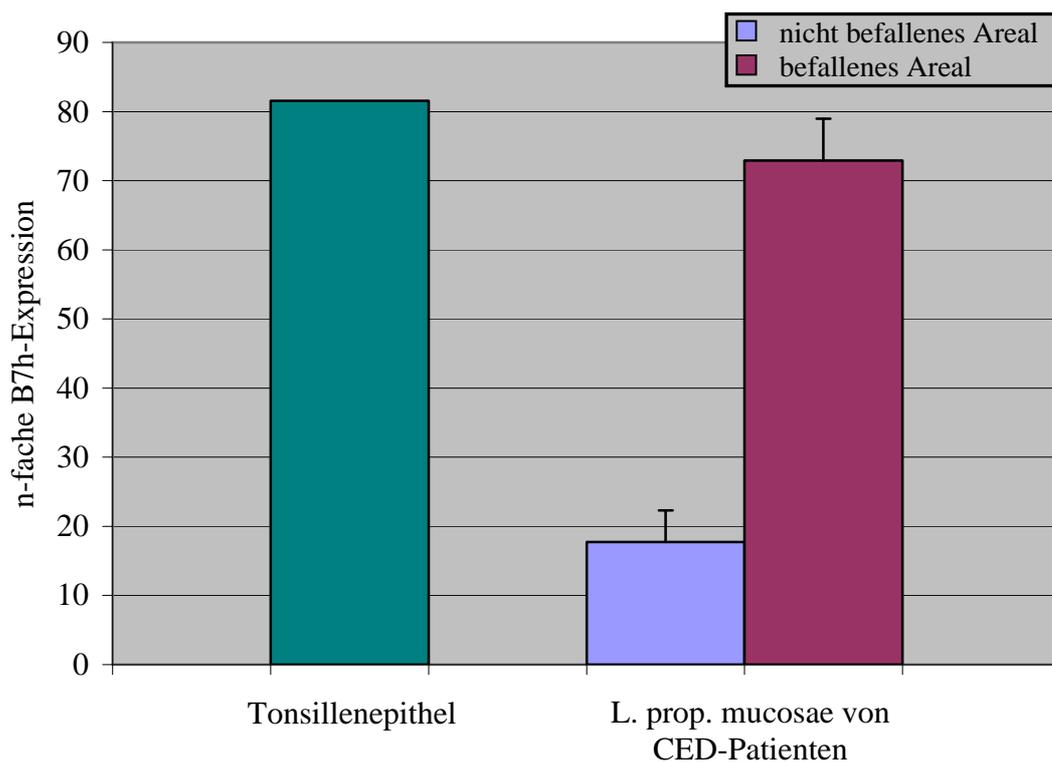


Abbildung 4.20: Relative B7h-Expression von dem Tonsillenepithel und der Lamina propria mucosae aus befallener und unbefallener Schleimhaut von CED-Patienten. Den Referenzwert liefern CD19-negative PBL

4.2.6 B7h-Expression auf intestinalen Epithelzellen

4.2.6.1 Bei Patienten ohne chronisch entzündliche Darmerkrankung

Um einen Expressionsunterschied von B7h auf intestinalen Epithelzellen zwischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Referenzproben von diesbezüglich gesunden Patienten festzustellen, wurden acht Kolonproben aus dem tumorfreien Randbereich eines Resektates von Patienten mit einem intestinalen Adenokarzinom untersucht. Die einzelnen Ergebnisse sind in der Abbildung 4.21 dargestellt. Sie bewegen sich in einem relativ eng gefassten Intervall, dessen Minimum bei einer 3fach und dessen Maximum bei einer 25fachen höheren Expression liegt als die der CD19-negativen PBL. Somit liegt die B7h-Expression im Epithel von nicht an CED Erkrankten durchschnittlich neunmal höher als die Expression von B7h in CD19-negativen PBL.

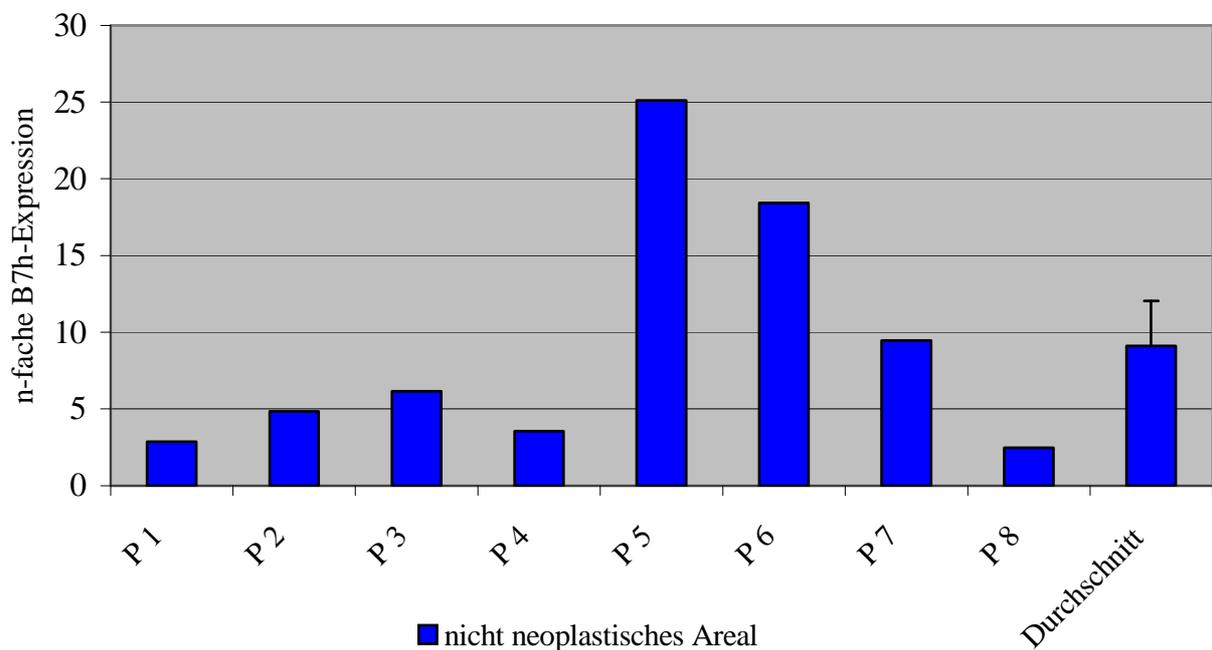


Abbildung 4.21: B7h-Expressionsmuster auf intestinalen Epithelzellen von Nicht-CED-Patienten. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen. P = Patient

4.2.6.2 Bei Patienten mit Colitis Ulcerosa

Zur Untersuchung der B7h-Expression auf intestinale Epithel bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurden von diesen Personen sieben Kolon-Biopsien oder -Resektate verwendet, die pro Patient jeweils aus einem histologisch befallenen und einem nicht befallenen Bereich herkommen. Betrachtet man in Abbildung 4.22 die für jede Person einzeln aufgeführten Resultate, so zeigt sich im nicht befallenen Areal eine ca. 2- bis 16fach höhere Expression als die der CD19-negativen PBL. Obwohl der Vergleich von befallener und unbeefallener Mukosa keinen signifikanten Unterschied aufweist, lässt sich doch ein gewisser Trend hin zu einer geringeren Expression in befallener Schleimhaut feststellen. Denn der B7h-Expressionslevel aus dem entzündeten Areal, welches Werte zwischen 1 und 15 annimmt, liegt bis auf eine Ausnahme stets unter dem Wert, den man aus nicht entzündeten Bereichen gewinnt.

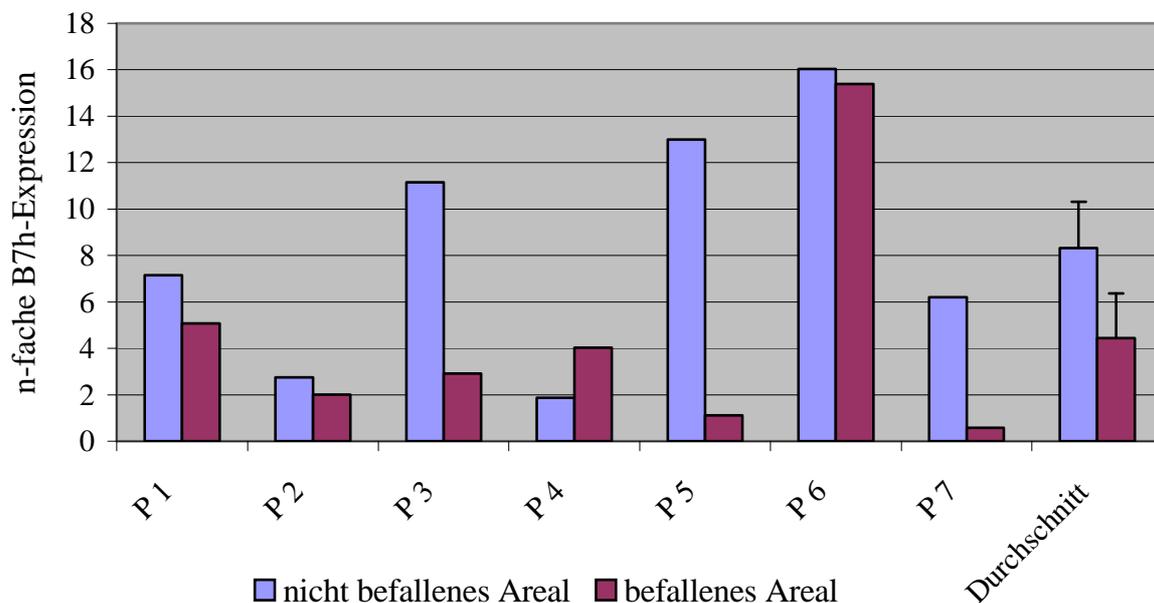


Abbildung 4.22: B7h-Expressionsmuster auf intestinalen Epithelzellen von Patienten mit Colitis ulcerosa. Es wurden jeweils Areale aus befallener und nicht befallener Schleimhaut untersucht. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen. P = Patient

4.2.6.3 Bei Patienten mit Morbus Crohn

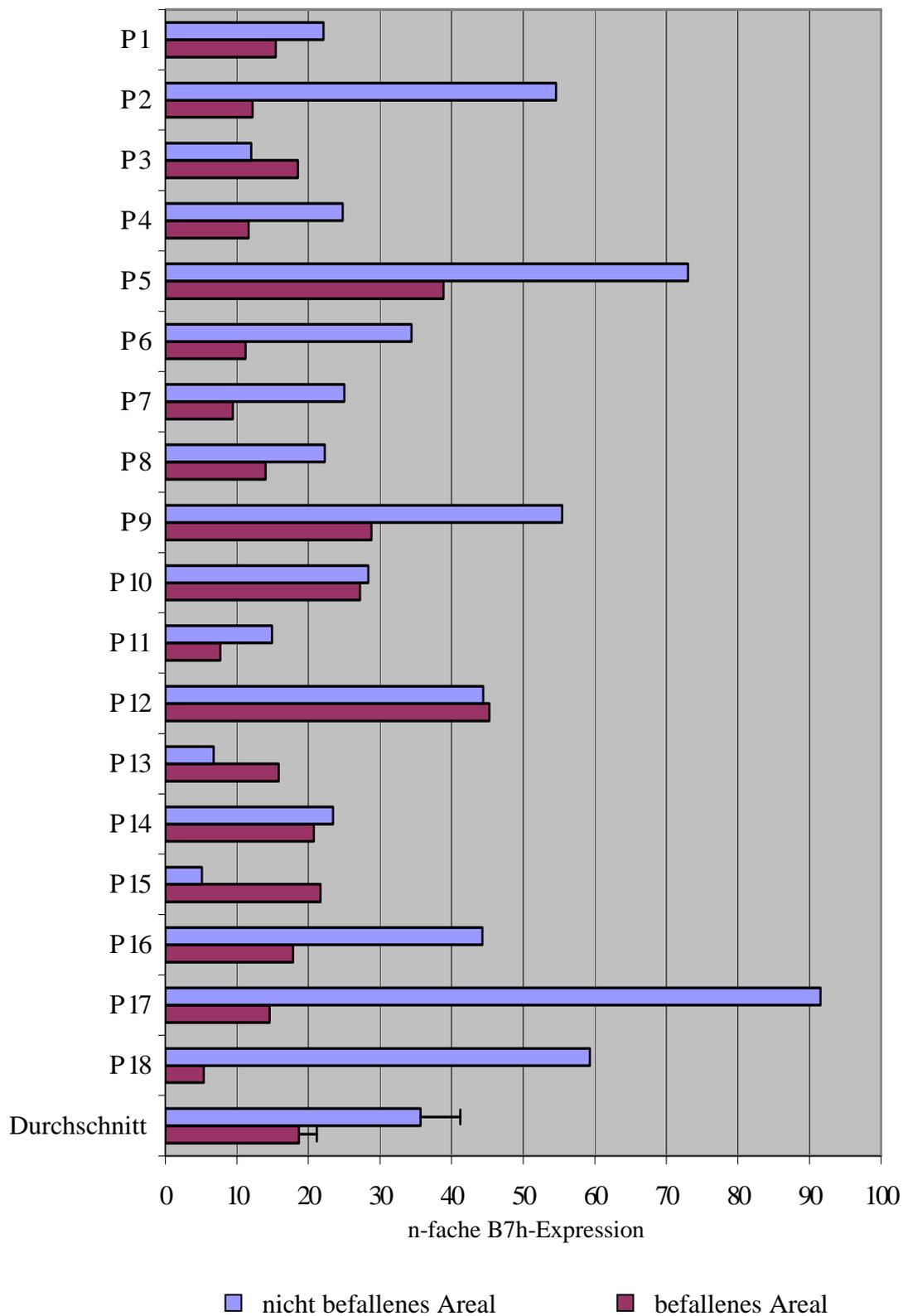


Abbildung 4.23: B7h-Expressionsmuster auf intestinalen Epithelzellen von Patienten mit Morbus Crohn. Es wurden jeweils Areale aus befallener und nicht befallener Schleimhaut untersucht. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen. P = Patient

Zu diesem Zweck wurden wiederum Biopsien und Resektate aus befallenen und nicht befallenen Bereichen von Patienten mit Morbus Crohn herangezogen. Da sich bereits in den Vorversuchen ein größerer Unterschied vor allem zwischen befallener MC-Schleimhaut und Mukosa von Nicht-CED-Patienten herausstellte als bei der Untersuchung von Dickdarmgewebe der Colitis-ulcerosa-Gruppe, wurde zur Validierung der Ergebnisse die Anzahl der untersuchten Proben von Patienten mit MC auf 18 aufgestockt.

Die erzielten Resultate sind in Abbildung 4.23 graphisch dargestellt. Auffällig sind die sehr hohen Werte, die zum Teil in den nicht entzündeten Arealen erreicht werden. Diese Gebiete weisen eine bis zu 92fach höhere B7h-Expression auf als CD19-negative PBL. Die Werte, die aus den entzündeten Bereichen gewonnen wurden, liegen zwar deutlich darunter, sind aber mit ihrem Intervall von 7 – 46 immer noch relativ hoch. Der Unterschied zwischen befallener und unbefallener Schleimhaut ist signifikant ($p < 0,011$).

4.2.7 Zusammenfassender Vergleich der untersuchten Gewebe

Beim Vergleich der Ergebnisse aus allen untersuchten Geweben stellt man fest, dass erwartungsgemäß die B7h-Expressionen in B-Zellen und in der Lamina propria mucosae auf Grund der dort vorhandenen entzündlichen Infiltration (antigenpräsentierende Zellen) sehr hoch ausfallen. Ebenfalls hohe Werte liefert relativ gesehen das Tonsillenepithel, was gut mit den immunhistochemischen Resultaten vereinbar ist und diese demnach bestätigt. Vergleicht man das intestinale Epithel einer gesunden Kontrollpopulation mit dem von MC-Patienten aus nicht entzündeten Bereichen, kann man im Gegensatz zur Colitis-ulcerosa-Gruppe einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$) in seiner B7h-Expression erkennen (s. Abb. 4.24). Besonders deutlich zeigt dies die Abbildung 4.25, in der die jeweilige Expressionsstärke der angeführten Gewebe auf den Expressionslevel der gesunden Kontrollgruppe bezogen ist, der folglich nach Definition einer 1fachen Expression entspricht. Die graphische Darstellung zeigt eine etwa 4fach höhere Expression. Weiterhin macht sie bei den CED-Patienten die Reduzierung der B7h-Ausprägung um jeweils ca. 50 % in der befallenen Mukosa gegenüber der unbefallenen deutlich sichtbar.

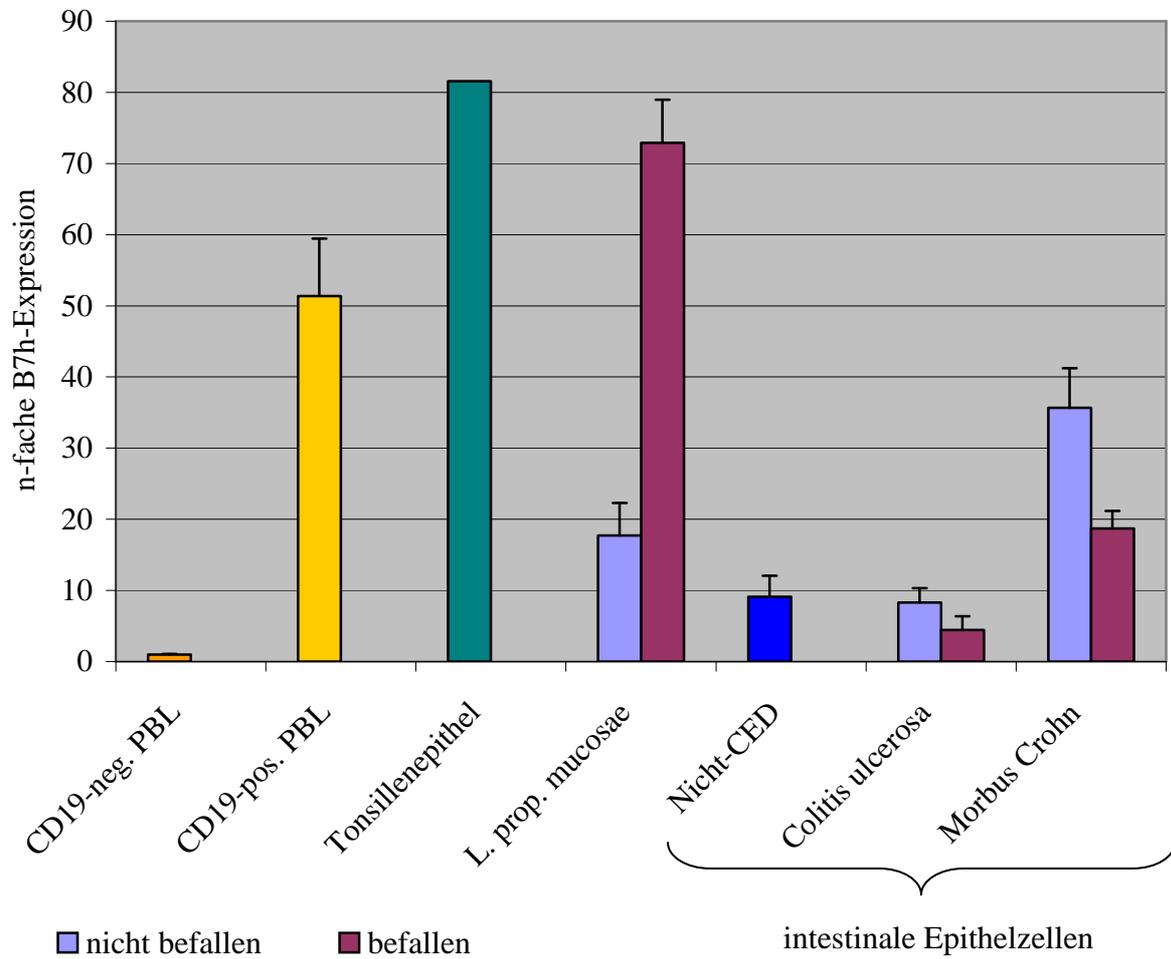


Abbildung 4.24: Vergleich der verschiedenen B7h-Expressionsmuster aus allen untersuchten Geweben. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen

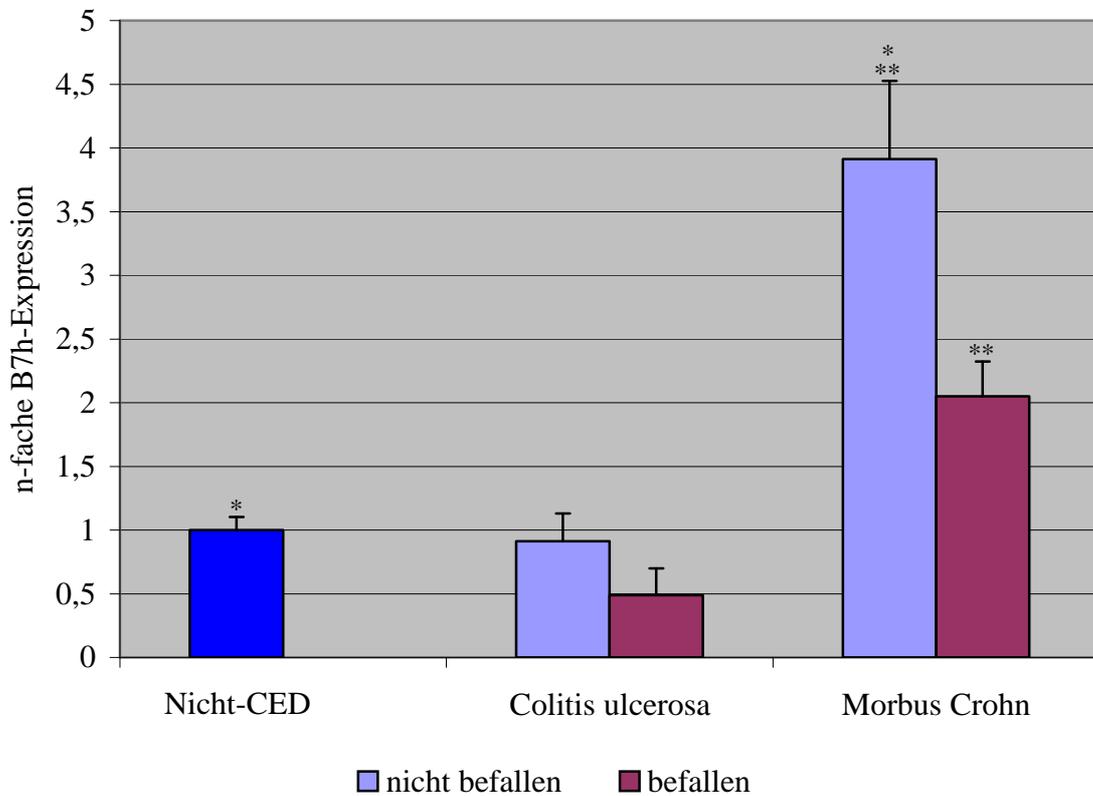


Abbildung 4.25: Vergleich der B7h-Expression auf intestinalem Epithel von CED-Patienten (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, jeweils befallenes und nicht befallenes Areal) und Nicht-CED-Patienten. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der intestinalen Epithelzellen von Nicht-CED-Patienten bezogen. Die Symbole „*“ und „**“ kennzeichnen jeweils einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$)

4.2.8 Validitätskontrollen

Zur Absicherung der Gültigkeit der verwendeten Methoden und der resultierenden Daten wurden vermeintliche Schwachstellen im Verlauf des gesamten Protokolls (LCM und Real-Time RT-PCR) offen gelegt und anschließend mit folgenden Tests überprüft:

- Um eine Kontamination des direkt unter dem intestinalen Epithel liegenden Gewebes aus der L. prop. mucosae während der LCM auszuschließen, wurden daraus stammende Zellareale ebenfalls auf ihre B7h-Expression hin untersucht. Betrachtet man die unter 4.2.6 beschriebenen Ergebnisse, ist eine Kontamination höchst unwahrscheinlich beziehungsweise würde sie zumindest an der qualitativen Ergebnislage nichts ändern. Denn im Falle einer Kontamination müssten theoretisch die aufgezeigten Unterschiede noch größer ausfallen, da das intestinale Epithel aus befallenen Arealen sowohl der Colitis-ulcerosa- als auch der Morbus-Crohn-Patienten einen etwa um die Hälfte kleineren Wert als aus nicht befallenen Arealen aufweist, wohingegen Gewebe aus der L. prop. mucosae von CED-Patienten in entzündeten Bereichen eine wesentlich höhere B7h-Expression als in nicht entzündeten Gebieten aufweist.
- Um eine Kontamination der einzelnen Proben mit Fremd-mRNA während der langwierigen RNA-Isolation auszuschließen, wurden bei der LCM wie stets ca. 1000 Schüsse auf einen gewebefreien Bereich auf dem Objektträger abgegeben und das beladete Cap durch alle weiteren Arbeitsschritte der RNA-Isolation und der reversen Transkription durchlaufen gelassen. Bei der mRNA-Bestimmung mittels TaqMan konnte keine spezifische B7h-Amplifikation nachgewiesen werden (C_T -Wert > 50).
- Um während der PCR-Reaktion eine unspezifische Amplifikation genomischer DNA anstatt der umgeschriebenen RNA (cDNA) auszuschließen, wurde zu einer isolierten RNA-Probe bei dessen Umschreibung die Zugabe der Reverse-Transkriptase ausgelassen. Da nun keine cDNA mehr für eine eventuelle Amplifikation vorhanden ist und auch tatsächlich keine Amplifikation stattgefunden hat (C_T -Wert > 50), kommt eine solche Fehlerquelle nicht in Frage.

5. Diskussion

In früheren Studien konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass intestinale Epithelzellen die Fähigkeit besitzen, den T-Zellen Antigene zu präsentieren und diese T-Zellen auch zu aktivieren (Bland & Warren 1986, Mayer & Shlien 1987, Hoang et al. 1992, Campbell et al. 1999). Für eine derartige antigenspezifische Stimulation von T-Zellen sind gewöhnlich zwei Signale erforderlich. Das eine wird durch die Bindung des antigenbeladenen MHC-II-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor vermittelt und das andere meist durch die Interaktion des kostimulatorischen Ligandenpaares B7 und CD28 (Schwartz 1997, Abbas & Sharpe 1999, Bugeon & Dallman 2000). Da jedoch in bisherigen Studien keine bzw. nur äußerst geringe Mengen der beiden klassischen kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 auf intestinalen Epithelzellen nachgewiesen werden konnten, zweifelte man an einer zentralen Stellung dieses Signalweges in der epithelialen T-Zell-Kostimulation (Sanderson et al. 1993, Framson et al. 1999). In-vitro-Untersuchungen ließen aber keine Anergie von T-Zellen erkennen, wie sie sonst bei ausbleibender Kostimulation nach Antigenkontakt auftreten würde. Demzufolge erschließen sich zwei Möglichkeiten für die effektive T-Zell-Aktivierung durch das intestinale Epithel: entweder reichen die geringen Mengen an B7-2 aus, die (in vivo) auf dem Epithel in entzündeter Schleimhaut gefunden wurden (Nakazawa et al. 1999), oder es sind noch andere kostimulatorische Moleküle involviert, deren Existenz auf intestinalen Epithelzellen noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Da man sich in den letzten Jahren der bedeutenden Rolle intestinaler Epithelzellen in der lokalen Immunregulation des Darmes bewusst geworden ist, hat sich damit auch deren Stellung in der immer noch unbekanntem Ätiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verändert. So beschränkt sich ihr Mitwirken nicht nur auf einen passiven Part in Form einer Barriere für luminalen Antigene, sondern weitet sich z.B. durch Präsentation luminaler Antigene oder durch Zytokinsekretion auf einen aktiven aus.

In diesem Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob und mit welchem Unterschied B7h – eines der neueren kostimulatorischen Moleküle aus der B7-Familie – in intestinalen Epithelzellen gesunder und an CED erkrankter Menschen exprimiert wird. Die Untersuchungen wurden sowohl mittels Immunhistochemie auf Protein-Ebene als auch mittels Real-Time RT-PCR auf mRNA-Ebene durchgeführt. Hierfür wurden paraffineingebettete Kolon-Biopsien und -Resektate der jeweils zu untersuchenden Gruppe

nach bestimmten, im Material- und Methodenteil angeführten Kriterien ausgewählt und deren Epithelzellen mit Hilfe der Laser-capture-Microdissection vom übrigen Gewebe separiert.

5.1 Expression von B7h auf intestinalen Epithelzellen

Mittels Real-Time RT-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit B7h-mRNA in intestinalen Epithelzellen detektiert werden. Das Epithel stammte aus Proben von Patienten mit intestinalem Adenokarzinom. Für die Untersuchung wurden hingegen nur nicht-dysplastische Areale des tumorfreien Absetzungsrandes verwendet. Die anschließende relative Quantifizierung der mRNA-Mengen ergab eine durchschnittlich 10fach höhere Expression verglichen mit der von CD19-negativen peripheren Blutlymphozyten. Von den acht analysierten Patientenproben lagen das gemessene Maximum bei einer 25fachen und das Minimum bei einer ca. 3fachen B7h-Expression.

Kürzlich gelang es auch in anderen Zellen – die als nichtprofessionelle, antigenpräsentierende Zellen fungieren können – eine B7h-Expression auf RNA- und Proteinebene festzustellen. Dazu gehören beispielsweise Keratinozyten oder Endothelzellen, die ebenfalls keine der beiden klassischen kostimulatorischen Moleküle B7-1 und B7-2 exprimieren (Khayyamian et al. 2002, Witsch et al. 2002). Funktionelle in-vitro-Tests zeigten, dass der ICOS/B7h-Signalweg eine Aktivierung von CD4⁺-Gedächtnis- und -Effektorzellen, jedoch nicht von naiven T-Zellen ermöglichte. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass das mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe auch im Wesentlichen von diesen B- und T-Gedächtniszellen bevölkert ist. Die Blockierung der Interaktion von ICOS und B7h mittels anti-B7h-Antikörpern führte sowohl zu einer deutlichen Reduzierung von Th1-Zytokinen (IL-2, IFN- γ), als auch von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-10, IL-13) (Khayyamian et al. 2002). Ähnlich dieser beschriebenen Reaktivierungsmöglichkeit von T-Gedächtnis- und -Effektorzellen durch das Endothel könnte auch das intestinale Epithel eine derartige Rolle übernehmen. Eine direkte Signalvermittlung zwischen den Epithelzellen und den darunter liegenden Immunzellen wäre für die lokale Immunregulation des Darmes in zweierlei Hinsicht von großer Bedeutung. Auf der einen Seite könnte sie z.B. über proinflammatorisch wirkende Zytokine (IFN- γ) zu einer schnellen Abwehr von pathogenen Antigenen beitragen. Auf der anderen Seite könnte sie z.B. durch inhibitorisch wirkende Zytokine (IL-10) zur Entstehung oder Aufrechterhaltung der oralen Toleranz beisteuern. Weitere Studien sind in

diesem Kontext nötig, um vor allem die funktionelle Rolle des ICOS/B7h-Ligandenpaares näher zu charakterisieren.

Neben den bereits erwähnten RNA-Analysen aus intestinalen Epithelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Proteinexpression von B7h mittels immunhistochemischer Methoden sowohl auf Gefrier- als auch auf Paraffingewebe (Kolon-Biopsien und -Resektate) untersucht. Dabei konnten in Gaumen- und Rachenmandel, die auf Grund des hohen B-Zell-Gehaltes als Positivkontrolle verwendet wurden, spezifisch gefärbte Endothelzellen sowie Epithelzellen registriert werden. Weiterhin waren einige schwächer gefärbte Zellen innerhalb der lymphatischen Areale detektierbar, die jedoch keiner genaueren Substruktur zuzuordnen waren. Auch Khayyamian et al. (2002) konnten bei der Immunhistochemie von Nabelschnur- und Tonsillengewebe mit dem Antikörper HIL-131 über eine deutliche Positivität von Endothelzellen berichten (s.o.). Des Weiteren liegen zwei Studien vor, in denen auch die von mir gezeigte B7h-Expression auf Epithelzellen ihre Bekräftigung findet. In der einen Studie konnten Witsch et al. (2002) mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendeten Antikörpers HIL-93 eine positive Färbung von Keratinozyten (Epithelzellen der Haut) erreichen. In der anderen Studie konnte B7h immunhistochemisch auf Tubular-Epithel der Niere nachgewiesen werden (Wahl et al. 2002). Allerdings fand sich bei den von mir gefärbten Darmpräparaten mit den beiden zur Verfügung stehenden anti-B7h-Antikörpern HIL-93 und HIL-131 eine so erhebliche Hintergrundfärbung, dass eine sichere Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen nicht mehr möglich war. Mit unterschiedlich sensitiven Detektionssystemen war die Färbung der intestinalen Epithelzellen sowie einiger Zellen der Lamina propria auch in der Isotypenkontrolle zu beobachten. Damit ist zwar nicht zwangsweise eine spezifische Anfärbung auszuschließen, jedoch auch nicht zu bestätigen.

Bezüglich immunhistochemischer Ergebnisse, die bei Färbungen lymphatischer Organe erzielt wurden, lässt sich in der Literatur kein Nachweis einer B7h-Expression auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen finden. Ebenso war es auch mir in dieser Arbeit nicht möglich, großflächig B-Zell-Areale zu detektieren. Dabei ist auf mRNA-Ebene (Yoshinaga et al. 1999, Ling et al. 2001) eine B7h-Expression professioneller APCs vielfach beschrieben worden. Demgegenüber existieren nur wenige Arbeiten, die einen Nachweis von B7h in lymphatischen Organen auf Protein-Ebene erbringen konnten. Alle diese Untersuchungen wurden mit einem ICOS-Ig-Fusionsprotein durchgeführt. Mit Hilfe anschließender FACS-Analysen wurden eine starke Expression auf CD19⁺-B-Zellen der Milz

(Ling et al. 2000) und eine schwache Expression auf B-Zellen der Tonsille festgestellt (Aicher et al. 2000). Iwai et al. (2002) zeigten mittels anschließender Immunfluoreszenz im Rahmen eines Arthritis-Modells eine B7h-Expression auf einigen CD45R⁺-B-Zellen, CD11b⁺-Makrophagen und auf CD11c⁺-dendritischen Zellen in entzündeten Lymphknoten der Maus. Zuvor schlug deren Versuch einer immunhistochemischen Detektion mit einem eigens hergestellten Antikörper ebenfalls fehl.

5.2 Unterschied in der B7h-Expression intestinaler Epithelzellen zwischen entzündeter und nicht entzündeter Mukosa von CED-Patienten

Um bei einer anhaltenden Stimulation einer überschießenden Reaktion des aktivierten Immunsystems vorzubeugen, ist den positiv kostimulatorischen Molekülen eine spezielle Kinetik gemein. Hierbei wird die Expression ab einem gewissen Zeitpunkt, der für die einzelnen Moleküle sehr unterschiedlich ausfällt (Stunden bis Tage), nach einer vorübergehenden Erhöhung wieder herunterreguliert (Bugeon & Dallman 2000, Gonzalo et al. 2001, Liang et al. 2002).

Diese Art von Kinetik könnte auch Ursache für die angestellten Beobachtungen in der Untersuchung von entzündeten und nicht entzündeten Arealen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sein. So konnte in der vorliegenden Arbeit mittels mRNA-Analysen gezeigt werden, dass die B7h-Expression intestinaler Epithelzellen in den befallenen Schleimhautbereichen etwa um die Hälfte niedriger ist als in den noch gesunden, unbefallenen Bereichen. Während dieser Unterschied bei der Untersuchung Morbus-Crohn-Erkrankter signifikant ist, fällt derjenige bei Colitis-ulcerosa-Patienten trotz ähnlicher Tendenzen (durchschnittliche B7h-Expression in entzünd. Arealen 50% niedriger als in nicht-entzünd. Arealen) nicht unter das veranschlagte Signifikanzniveau von 0,05.

Die in vivo erlangten Resultate korrelieren mit Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, die in vitro bei der Kolonkarzinom-Zelllinie T-84 gemacht wurden. In diesem Experiment zeigten die intestinalen Epithelzellen nach einer Stimulation mit TNF α zuerst eine zweifache Hochregulierung der B7h-Expression mit einem Maximum nach etwa vier Stunden, ehe die B7h-Transkripte wieder auf etwa die Hälfte des Ausgangsniveaus herunterreguliert wurden.

Vergleicht man die gewonnenen Ergebnisse mit Daten aus der Fachliteratur hinsichtlich der B7h-Kinetik nach Stimulation, so lassen sich zwei divergente Verläufe erkennen, die jedoch beide im Endresultat mit dem aufgezeigten Unterschied von befallener und unbefallener Schleimhaut übereinstimmen. Dabei hängt die zu beobachtende Kinetik von der untersuchten Zellart und der verwendeten Stimulierungsmethode ab. Der eine Verlauf beschreibt eine positive Regulation, was bedeutet, dass nach Aktivierung zuerst eine Expressionssteigerung einsetzt, ehe dann die Herunterregulation folgt. Gezeigt wurde dies beispielsweise an Fibroblasten-, Endothelzellen- und Monozyten-Kulturen unter Zusatz von z.B. TNF α oder LPS (Swallow et al. 1999, Yoshinaga et al. 2000, Khayyamian et al. 2002, Liang et al. 2002). Der andere Verlauf spiegelt eine negative Regulation wieder, in dem sofort nach Aktivierung eine Herunterregulierung der Expression unter den konstitutiv vorhandenen B7h-Level eingeleitet wird. Diese Art von Kinetik findet sich bei B-Zellen und auch dendritischen Zellen nach Stimulation über den BZR oder den IL-4-Rezeptor bzw. mit TNF α (Yoshinaga et al. 2000, Liang et al. 2002). Folglich resultieren beide Verlaufsformen über den Beobachtungszeitraum von 1 bis 7 Tagen in einer niedrigeren B7h-Expression in aktivierten als in nicht aktivierten Zellen und dienen somit als mögliche Erklärung für den ebenfalls geringeren B7h-Level in der teils akut, teils chronisch entzündeten Darmschleimhaut, verglichen mit nicht-entzündeten Arealen.

Beide Erklärungsansätze beruhen auf der Annahme, dass das B7h-Molekül als positiv kostimulierendes Protein wirkt. Dessen proinflammatorische Funktion wird durch etliche Studien sowohl in vitro als auch in vivo belegt (s. Einleitung 1.2.4) und würde seine Herunterregulierung bei einem fortwährenden Stimulus, wie er bei CED beispielsweise durch luminale Bakterien vermutet wird, für sinnvoll erscheinen lassen. Neben diesen Untersuchungen gibt es jedoch auch solche, die eine inhibitorische Wirkung von B7h prognostizieren. Wahl et al. (2002) stellten in einer Zellkultur aus T-Zellen zusammen mit tubulären Epithelzellen, auf denen in vivo und in vitro eine konstitutive B7h-Expression nachgewiesen wurde, fest, dass durch eine Blockade des Signalweges ICOS/B7h mit den entsprechenden Antikörpern eine deutliche Erhöhung des IL-2-Spiegels resultiert. IL-2 besitzt eine starke proinflammatorische Wirkung und spielt in der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Infolgedessen könnte die Interaktion von tubulären Epithelzellen mit T-Zellen über das Ligandenpaar ICOS/B7h zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung führen. Die genauen inhibitorischen Mechanismen müssten jedoch erst in weiteren Studien näher untersucht werden. Im Gegensatz hierzu stehen zwei

Krankheitsmodelle, bei denen der sich günstig auswirkende Einfluss des ICOS/B7h-Signalweges auf die Krankheitsentwicklung und -progression näher definiert werden konnte. In einem asthmaähnlichen Modell der Maus wurde gezeigt, dass ICOS/B7h u.a. durch Sekretion von IL-10 zur Entwicklung von regulatorischen T-Zellen beiträgt und auf diese Weise einen wichtigen Part sowohl in der Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz in der Lunge als auch in der Reduzierung der entzündlichen Aktivität bei Asthma spielt (Akbari et al. 2002). Ein weiteres interessantes Beispiel liefert die experimentelle Autoimmunenzephalitis. Hierbei weisen ICOS-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle einen viel schwerwiegenderen Krankheitsverlauf mit einer hohen Sterblichkeitsrate auf. Die Untersuchung der Splenozyten bezüglich ihres Zytokinmusters ergab ein Fehlen von IL-13, welches als Th2-Zytokin einen anti-entzündlichen Effekt zeigt (Dong et al. 2001 a). In einem anderen EAE-Experiment, bei dem der ICOS/B7h-Signalweg mit blockierenden Antikörpern unterbrochen wurde, fielen in den Splenozytenkulturen auch stark erhöhte Spiegel von IFN γ auf, das als Th1-Zytokin eine große proinflammatorische Wirkung besitzt (Rottman et al. 2001).

Geht man also auch für die intestinalen Epithelzellen von einer inhibitorischen Funktion des ICOS/B7h-Signalweges aus, so wäre zu diskutieren, ob durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren (z.B. Zytokine, Expressionsmuster kostimulatorischer Moleküle, Antigene) ein in der Schleimhaut lokal unterschiedliches Milieu für eine jeweils bestimmte B7h-Expression geschaffen wird. Dieses Milieu erlaubt es den Epithelzellen, beim erhöhten Entzündungsstatus von CED-Patienten mit einer Hochregulierung von B7h zu reagieren und infolgedessen eine sich anbahnende Entzündung zu verhindern. Die hohe B7h-Expression in den unbefallenen Bereichen würde auf Grund ihrer protektiven Wirkung die fehlende Entzündung erklären, während hingegen der geringere B7h-Level in den befallenen Arealen zur Verhinderung einer Entzündung nicht ausreicht.

5.3 Unterschied in der B7h-Expression intestinaler Epithelzellen zwischen gesunden Menschen und CED-Patienten

Bislang existiert nur die Arbeit von Totsuka et al. (2003), in der mit Hilfe eines murinen Kolitis-Modells die Rolle und Expression von ICOS/B7h im chronisch entzündeten Darm näher analysiert wurde. Ansonsten liegen Studien weder über eine B7h-Expression auf

intestinalen Epithelzellen noch über die Rolle und Expression von B7h in der Schleimhaut von CED-Patienten vor. Auch bei Totsuka et al. standen intestinale Epithelzellen nicht im Zentrum ihrer Untersuchungen, sondern Zellen, die der Schicht direkt unterhalb des Epithels angehören – nämlich der Lamina propria mucosae. Es wurde mittels Immunhistochemie und einiger FACS-Analysen sowohl die Expression von B7h als auch die von ICOS untersucht. Dabei fand sich nach Beginn der Entzündung eine deutliche Hochregulierung von ICOS und B7h. Beinahe alle CD4⁺-T-Zellen zeigten sich stark positiv für den Rezeptor ICOS, während in den gesunden Kontrollen lediglich eine schwache Expression auf nur wenigen T-Zellen zu registrieren war. Die B7h⁺-Zellen entsprachen Makrophagen. Diese in der entzündeten Schleimhaut vorhandene Hochregulierung beider Moleküle suggeriert eine Beteiligung von ICOS/B7h an der Pathogenese der chronischen Kolitis. Um deren Beitrag näher bestimmen zu können, wurden zwei separate Experimente durchgeführt, in denen parallel zur Kolitis-Induktion blockierende Antikörper gegen ICOS bzw. gegen B7h durch intraperitoneale Injektion verabreicht wurden. Das Resultat gab wider Erwarten zwar bei der Behandlung mit anti-ICOS-AK eine klinisch – und auch histologisch abgesicherte – deutliche Abschwächung der entzündlichen Aktivität zu erkennen, jedoch nicht bei der Anwendung von anti-B7h-AK. Dieser Unterschied in der Effektivität beider Antikörper lässt während der ICOS-Blockade auf einen anti-inflammatorischen Mechanismus schließen, der unabhängig von der Interaktion zwischen ICOS und B7h ist. Demnach ist entweder die Existenz eines weiteren, bisher noch nicht identifizierten Bindungspartners von ICOS für die erzielte Verbesserung bei der Behandlung mit anti-ICOS-AK verantwortlich oder aber die beobachtete großflächige Apoptose-Induktion ICOS-exprimierender T-Zellen. Die zuletzt angeführte Erklärung wird – vergleichbar mit dem Wirkmechanismus von Infliximab[®] (anti-TNF α -AK) – für sehr wahrscheinlich gehalten. Weiterhin könnte aber auch ein schlechtes Bindungsverhalten des anti-B7h-AK an seine Zielstruktur für die beobachtete Divergenz in der Effektivität beider Antikörper verantwortlich sein.

In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das dissezierte Lamina-propria-Gewebe aus entzündeter Schleimhaut von Patienten mit CED (MC und CU) eine 4fach höhere Expression von B7h aufweist, als aus nicht entzündeten Abschnitten. Da die Analysen auf RNA-Ebene durchgeführt wurden, war es nicht möglich, die B7h-exprimierenden Zellen näher zu definieren. Doch nach dem heutigen Stand des Wissens sind wohl eingewanderte und ortsansässige APCs (v.a. Makrophagen) Kandidaten für diese B7h⁺-Zellen. Bei der Untersuchung von intestinalen Epithelzellen bezüglich ihrer B7h-Expression

konnte in den unbefallenen Arealen von Patienten mit CU kein Unterschied zum Epithel der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Gegensatz dazu lieferte das intestinale Epithel aus unbefallenen Arealen von Patienten mit MC eine durchschnittlich ca. 4fach höhere B7h-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,01$). Zusätzlich wurde auch die äußere glatte Muskulatur des Darmes (Tunica muscularis) aus nicht entzündeten Bereichen eines MC-Patienten untersucht. Jedoch war aus diesem Gewebe bei der Real-Time RT-PCR über 50 Zyklen erwartungsgemäß keine mRNA zu detektieren.

Der Fall, dass eine Kontamination von Lamina-propria-Zellen bzw. von intraepithelialen Lymphozyten bei der Dissektion des intestinalen Epithels zu einer deutlichen Verfälschung der gewonnenen Ergebnisse geführt hat, ist aus nachfolgenden Gründen eher auszuschließen. Der erste Punkt, der gegen eine grobe Kontamination spricht, stellt die ständige optische Kontrollmöglichkeit während sowie auch nach der Dissektion durch die starke Vergrößerung des Mikroskops dar. Dabei konnte eine äußerst selektive Isolierung von Epithelzellen beobachtet werden. Zweitens würden unter Berücksichtigung meiner Ergebnisse die aufgezeigten Unterschiede in der B7h-Expression durch eine Kontamination nur noch deutlicher ausfallen, weil die intestinalen Epithelzellen aus entzündeten Arealen eine niedrigere B7h-Expression aufweisen als aus nicht entzündeten Arealen, die Lamina-propria-Zellen hingegen aus entzündeten Schleimhautbereichen eine wesentlich höhere B7h-Expression als aus nicht entzündeten Bereichen zeigen (s. auch Ergebnisteil, Punkt 4.2.8). Inwieweit intraepitheliale Lymphozyten B7h ausdrücken, kann aufgrund fehlender Studien zu diesem Thema nicht beurteilt werden. Da jedoch der überwiegende Anteil dieser Zellpopulation aus T-Zellen besteht (Janeway et al. 2002, S. 434-436), die nach derzeitigem Stand kein B7h exprimieren, und deren Anzahl verglichen mit den Epithelzellen vernachlässigbar gering ist, kann eine Beeinflussung der vorliegenden Resultate als sehr unwahrscheinlich angesehen werden.

Wenn sich bei MC-Patienten die aufgezeigte Differenz des intestinalen Epithels in der B7h-Expression gegenüber gesunden Menschen auf Protein-Ebene bestätigen lässt, ist von einem Mitwirken des kostimulatorischen Moleküls B7h an der Pathogenese des Morbus Crohn auszugehen. Obwohl im oben erwähnten Kolitis-Modell, dessen Entzündung wie bei MC hauptsächlich durch eine Th1-vermittelte Immunantwort ausgelöst wird, eine Beteiligung des ICOS/B7h-Signalweges in Frage gestellt wird (Totsuka et al. 2003), unterstreichen doch einige andere Studien die wichtige Funktion von ICOS/B7h in einem Th1-vermittelten

Krankheitsmodell. Neben der unter 5.2 beschriebenen bedeutsamen Rolle von ICOS/B7h in der EAE weisen auch bestimmte Infektionsmodelle wie die mit *Toxoplasma gondii* oder *Nippostrongylus brasiliensis* eine stark positive Korrelation der vorhandenen ICOS-Expression mit den Th1-typischen Zytokinen IFN γ und IL-2 auf (Kopf et al. 2000, Bonhagen et al. 2002). Dieselbe Assoziation konnte von Bonhagen et al. (2002) auch in einer Transfer-Kolitis beobachtet werden. Des Weiteren zeigt eine Studie über die kollageninduzierte Arthritis, dass durch eine Behandlung der erkrankten Tiere mit anti-B7h-Antikörpern der Krankheitsverlauf wesentlich gemildert werden kann. In den abführenden Lymphknoten wurden erniedrigte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine wie z.B. TNF α oder IL-1 β nachgewiesen (Iwai et al. 2002).

Die plausibelste Erklärung für die hohe epitheliale B7h-Expression in der unbefallenen Schleimhaut von MC-Patienten stellt wohl die Annahme eines genetischen Hintergrundes dar. Dabei würden die erhöhten Basislevel von B7h in den intestinalen Epithelzellen – auf Grund ihres größeren proinflammatorischen Potentials – die Suszeptibilität bei den betroffenen Menschen steigern, an Morbus Crohn zu erkranken. Durch die scheinbar noch funktionierenden, gegenregulatorischen Mechanismen wird die Expression des kostimulierenden Moleküls zwar nach einer Aktivierung des Immunsystems noch herunterreguliert (durchschnittlich um ca. 50%), was aber nicht mehr ausreicht, um die von Seiten des Epithels mitverursachte, überschießende Reaktion des lokalen Immunsystems zu verhindern. Diese Immunantwort kann durch einen Stimulus ausgelöst werden, der nur temporärer Art ist, wie z.B. bei Infektion oder auf Grund der gesunkenen Toleranz gegenüber apathogenen Antigenen oder aber auch von chronischer Art ist, beispielsweise induziert durch die physiologische Darmflora. Unter der Annahme einer vorwiegend positiv kostimulierenden Wirkung von B7h wird auf diese Weise eine Imbalance zwischen pro- und anti-entzündlichen Faktoren geschaffen, die die notwendigen und protektiven Mechanismen der oralen Toleranz (Apoptose oder Anergie antigenspezifischer T-Zellen, die gegen apathogene Antigene gerichtet sind; Entwicklung regulatorischer T-Zellen) zusammenbrechen lassen (Janeway et al. 2002, S. 440-442; Tzachanis & Boussiotis 2003). Somit ist die sonst übliche Diskriminierungsfähigkeit des intestinalen Immunsystems zwischen pathogenen (gefährliche Krankheitserreger) und apathogenen Antigenen (z.B. Nahrungsbestandteile) nicht mehr gewährleistet.

Allein epidemiologische Daten lassen eine genetische Beteiligung an der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, besonders an der von MC, stark vermuten. Noch

bis vor kurzem konnten jedoch keine spezifischen Gene determiniert werden, die mit den CED-Erkrankungen assoziiert sind. Es wurden mit Hilfe genomweiter Untersuchungen nur mögliche krankheitsassoziierte Loci gefunden, in oder neben denen wiederum bestimmte Gene als mögliche Kandidaten in Frage kommen, wie z.B. die codierenden Sequenzen für MHC I u. -II, TNF α , TZR und ICAM-1. Von diesen sog. IBD-Loci sind mittlerweile neun beschrieben, welche individuell mit dem Auftreten beider oder nur mit einer der CED-Erkrankungen korrelieren (IBD 1 – IBD 6 auf den Chromosomen 5, 6, 12, 14, 16 und 19 und andere Loci auf Chromosom 1, 3 und 7) (Bonon & Cho 2003). Mittlerweile ist es aber gelungen, zumindest eines der spezifischen Gene nachzuweisen. Dieses erstentdeckte Gen wird als NOD 2/CARD 15 bezeichnet und liegt im IBD 1 (Hampe et al. 2001). Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen wird es auf Makrophagen und intestinalen Epithelzellen exprimiert (Berrebi et al. 2003, Hisamatsu et al. 2003, Rosenstiel et al. 2003). Bezüglich seiner Gensequenz sind drei Polymorphismen bekannt, die bei einem heterozygoten Auftreten eines dieser Allele das Risiko, an MC zu erkranken, um das 2- bis 4fache und bei einer Homozygotie um das 20- bis 40fache ansteigen lassen. Die intestinale Funktion von NOD 2/CARD 15 als ein antibakterieller Faktor ist bei den betroffenen Patienten wahrscheinlich durch einen Defekt in der NF- κ B-Aktivierung gestört (Bonon & Cho 2003). Zudem zeigen beide erwähnte Zelltypen aus entzündeten Schleimhautarealen eine erhöhte Expression von NOD 2/CARD 15 im Vergleich zu denen aus unbefallenen Bereichen (Berrebi et al. 2003, Hisamatsu et al. 2003).

In Anbetracht der gewonnenen Ergebnisse wäre es in weiteren Studien von Interesse, ob die erhöhte B7h-Expression bei einem Teil der Patienten mit MC ebenfalls durch einen genetischen Defekt – entweder primär oder sekundär über Einbeziehung anderer Gene – bedingt ist. Ebenso interessant wäre eine Untersuchung von APCs z.B. aus dem peripheren Blut, um der Frage nachzugehen, ob eine generell erhöhte B7h-Expression bei MC-Patienten vorliegt, oder ob doch nur eine streng auf das intestinale Epithel begrenzte Steigerung zugrunde liegt.

5.4 Neuartige therapeutische Optionen bei CED mit B7h als Zielstruktur

Hinsichtlich der noch immer ungeklärten Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen basieren die unterschiedlichen Ansatzpunkte der medikamentösen CED-Behandlung auf einer lokalen oder systemischen Durchbrechung proinflammatorischer Prozesse im Darm. Hierbei kommen entweder größtenteils empirisch gewonnene Therapieschemata zur Anwendung, die beispielsweise Glukokortikoide und 5-ASA beinhalten, oder neuere, gezielt entwickelte Substanzen, wie z.B. Antikörper gegen Zytokine, deren Spiegel in der Lamina propria von CED-Patienten als erhöht nachgewiesen wurden (z.B. TNF α). Die Wirkungen dieser Substanzen sind als sehr unterschiedlich zu bewerten. Von den sog. biologischen Arzneimitteln (Zytokine, Antikörper, Antisense-Oligonukleotide) besitzen bis zum heutigen Zeitpunkt nur Antikörper gegen TNF α (Infliximab[®]) einen anerkannten Stellenwert in einer speziellen Therapie von MC (Present et al. 1999, Rutgeerts 2002, Shand & Forbes 2002). Da sich die Forschung auf dem Feld biologischer Substanzen aber erst in ihren Anfängen befindet, kann diesbezüglich noch kein abschließendes Urteil gefällt werden (s. Einleitung 1.5.4).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte vor allem bei an Morbus Crohn Erkrankten, gegenüber einer gesunden Vergleichspopulation, ein signifikanter Unterschied in der Expression eines Moleküls festgestellt werden, das in den bisherigen Untersuchungen vorzugsweise einen proinflammatorischen Effekt zeigte. Diese Untersuchungen standen jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit einer Erforschung der speziell intestinalen Funktion von ICOS/B7h. Zugleich weisen aber einige Studien über Th1-vermittelte Krankheitsmodelle stark auf eine Beteiligung von B7h an der Pathogenese dieser Krankheiten hin. So wurden z.B. Antikörper gegen B7h erfolgreich in dem unter 5.3 erwähnten Arthritis-Modell eingesetzt (Iwai et al. 2002).

In ähnlicher Weise könnte auch bei den MC-Patienten die Behandlung mit anti-B7h-AK zu einer Abmilderung des Krankheitsverlaufes führen. Denn bei Betrachtung der von mir durchgeführten Einzelanalysen der B7h-Expression von Patienten mit MC fallen in den nicht entzündeten Schleimhautarealen Spitzenwerte auf, die im Vergleich mit gesunden Menschen z.T. 10fach höher liegen. Besonders diese Patienten könnten von einer gezielten Therapie mit anti-B7h-AK profitieren.

6. Zusammenfassung

Obwohl die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) mit ihren beiden Hauptvertretern Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bereits seit einigen Jahrzehnten bekannt sind, konnte ihre Pathogenese bis zum heutigen Zeitpunkt noch immer nicht im Detail entschlüsselt werden. Es scheint sich aber über die letzten Jahre hinweg ein komplexes Zusammenspiel mehrerer äthiologisch bedeutsamer Faktoren herauskristallisiert zu haben, in deren immunologischem Netzwerk wohl auch intestinale Epithelzellen stark eingebunden sind. Diese Annahme unterstützen einige Studien, in denen diese Zellen einerseits als wichtige Barriere gegen luminale Antigene fungieren und andererseits die lokale Immunantwort im Darm direkt über Zell-Zell-Kontakte oder über Freisetzung verschiedener Zytokine beeinflussen können.

Da aber auch die Funktion der intestinalen Epithelzelle als nicht-professionelle, antigenpräsentierende Zelle in der Literatur unumstritten ist, jedoch die damit verbundene notwendige Kostimulation anscheinend nicht primär durch die klassischen kostimulatorischen Moleküle B7-1/-2 geleistet wird, sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle eines anderen relativ neu entdeckten kostimulatorischen Moleküls aus der B7-Familie, namens B7h, auf intestinalem Epithel von CED-Patienten näher untersucht werden.

Dabei konnte nach epithelialer Mikrodissektion aus paraffineingebetteten Kolon-Biopsien und -Resektaten mittels Real-Time RT-PCR gezeigt werden, dass intestinale Epithelzellen bei Patienten mit Morbus Crohn im Durchschnitt eine ca. 4fach höhere Expression aufweisen als bei Patienten ohne CED. Dieser Wert betrifft jedoch nur Epithel aus nicht entzündeten Gebieten, denn in befallenen Bereichen war nur noch eine 2fach höhere Expression nachweisbar. Vergleichbar mit der Herunterregulierung anderer kostimulatorischer Moleküle nach Aktivierung der exprimierenden Zelle wirkt diese Gegenregulation einer überschießenden Immunantwort entgegen. Während die beschriebene Reaktion auch auf Epithelzellen von Patienten mit Colitis ulcerosa zu sehen war, blieb dort eine dem MC entsprechende signifikante Abweichung der B7h-Expression in unbefallenen Arealen aus. Bei ihnen entspricht der gemessene Wert ungefähr demjenigen von Nicht-CED-Patienten. Bei der Untersuchung von Lamina-propria-Gewebe der an CED Erkrankten lag die B7h-Expression in den befallenen Arealen auf Grund des entzündlichen Infiltrates erwartungsgemäß höher (4x) als in den unbefallenen Arealen.

Mittels immunhistochemischer Methoden ließen sich zu den Biopsien von CED- und Nicht-CED-Patienten mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen B7h keine exakten Aussagen machen. Es konnte allerdings eine starke B7h-Expression auf Epithel- und Endothelzellen von Tonsillargewebe festgestellt werden. Dieses Organ diente in der immunhistochemischen Studie als Positivkontrolle.

Die wahrscheinlichste Erklärung im Falle von MC für eine Steigerung der B7h-Expression ist eine genetische Determination, die eine erhöhte Empfänglichkeit der betroffenen Menschen für CED mit sich führen würde. Obwohl die nach einer Aktivierung einsetzenden gegenregulatorischen Mechanismen anscheinend noch intakt sind, reicht die beobachtete Senkung der B7h-Expression trotzdem nicht aus, eine überschießende Reaktion des lokalen Immunsystems zu verhindern, sobald sie von Seiten des Epithels wegen seines erhöhten proinflammatorischen Potentials auf einen Stimulus hin eingeleitet worden ist. Solch ein Stimulus kann temporärer Art (z.B. bei Infektion oder auf Grund der gesunkenen Toleranz gegenüber apathogenen Antigenen) oder auch chronischer Art (z.B. durch die physiologische Darmflora) sein.

Die erhöhte B7h-Expression als eine Reaktion des intestinalen Epithels auf eine Entzündung ist eher unwahrscheinlich. Findet sie jedoch statt, wäre auch ein inhibitorischer Effekt von B7h auf die T-Zell-Aktivierung zu bedenken.

Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen wäre es mit weiteren Studien interessant zu klären, ob die beobachtete Erhöhung der B7h-mRNA-Level eine Beschränkung auf intestinale Epithelzellen zeigt oder ob eventuell eine ubiquitäre Erhöhung z.B. in peripheren Blutlymphozyten bei diesen Patienten nachweisbar ist. Ebenso würde die Auswirkung einer Blockierung mit anti-B7h-Antikörpern im Hinblick auf eine mögliche Therapieoption beim Menschen von besonderem Interesse sein.

7. Verzeichnis der Tabellen

- Tabelle 3.1:** Beschreibung und Verwendungszweck der eingesetzten Antikörper
- Tabelle 3.2:** Detektionssysteme und ihr Anwendungsbereich
- Tabelle 3.3:** Immunhistochemische Farbstoffe
- Tabelle 3.4:** Charakterisierung der verwendeten Primer und Sonden
- Tabelle 3.5:** Topographie und Pathologie der für die LCM verwendeten Gewebeproben und deren Patientendaten in der Morbus-Crohn-Gruppe
- Tabelle 3.6:** Topographie und Pathologie der für die LCM verwendeten Gewebeproben und deren Patientendaten in der Colitis-ulcerosa-Gruppe
- Tabelle 3.7:** Topographie und Pathologie der für die LCM verwendeten Gewebeproben und deren Patientendaten in der gesunden Kontrollgruppe
- Tabelle 3.8:** Art und Pathologie der für die Immunhistochemie verwendeten Gewebeproben
- Tabelle 3.9:** Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte in der IHC von Gefriermaterial mit den verschiedenen ausgetesteten Variationsmöglichkeiten
- Tabelle 3.10:** Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte in der IHC von Paraffinmaterial mit den verschiedenen ausgetesteten Variationsmöglichkeiten
- Tabelle 4.1:** Immunhistochemisches Färbeprotokoll für die anti-B7h-Antikörper (HIL-93 u. HIL-131) auf Gefriergewebe
- Tabelle 4.2:** Immunhistochemisches Färbeprotokoll für die anti-B7h-Antikörper (HIL-93 u. HIL-131) auf Paraffingewebe
- Tabelle 4.3:** Zusammenfassender Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse
- Tabelle 4.4:** Berechnung des Fehlers „E“ zur Validierung des Normalisierungs-Ansatzes

8. Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1.1:** Proteinstruktur von B7h und seinem Rezeptor ICOS mit Angabe der B7h- und ICOS-exprimierenden Zellen
- Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der B7h-Expressionsstudie in der Immunhistochemie
- Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der B7h-Expressionsstudie, durchgeführt mittels LCM und Real-Time RT-PCR
- Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des TaqMan[®]-PCR Assays
- Abbildung 3.4:** Ausschnitt des Pipettierschemas einer 96-Well-Platte für die B7h-Expressionsuntersuchung mittels TaqMan
- Abbildung 4.1:** Immunhistochemie einer humanen Rachenmandel (Gefriermaterial), 100x; Positivität des Tonsillenepithels u. einiger Zellen aus dem lymphatischen Areal. *Method:* HIL-131 (57 µg/ml) + anti-IgG-Peroxidase; ohne Gegenfärbung
- Abbildung 4.2:** Immunhistochemie einer humanen Rachenmandel (Gefriermaterial), 200x; Positivität des Tonsillenepithels u. einiger Zellen aus dem lymphatischen Areal. *Method:* HIL-131 (57 µg/ml) + anti-IgG-Peroxidase; ohne Gegenfärbung
- Abbildung 4.3:** Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Gefriermaterial), 100x; Positivität des Tonsillenepithels. *Method:* HIL-131 (19 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung
- Abbildung 4.4:** Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Gefriermaterial), 100x; Negativkontrolle ist negativ. *Method:* NCOG2 (19 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung

- Abbildung 4.5:** Immunhistochemie einer humanen Rachenmandel (Gefriermaterial), 200x; Positivität der Endothelzellen. *Method:* HIL-131 (57 µg/ml) + anti-IgG-Peroxidase; ohneGegenfärbung
- Abbildung 4.6:** Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Gefriermaterial), 200x; Positivität der Endothelzellen. *Method:* HIL-93 (20 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung
- Abbildung 4.7:** Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Paraffinmaterial), 100x; Positivität des Tonsillenepithels. *Method:* HIL-93 (61 µg/ml) + IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung
- Abbildung 4.8:** Immunhistochemie einer humanen Gaumenmandel (Paraffinmaterial), 100x; Negativkontrolle ist negativ. *Method:* NCOG2 (61 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung
- Abbildung 4.9:** Immunhistochemie von Kolonschleimhaut aus einem nicht entzündeten Bereich eines Morbus-Crohn-Patienten (Paraffinmaterial), 100x; Positivität des intestinalen Epithels und einiger Zellen aus der Lamina propria mucosae. *Method:* HIL-93 (61 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung
- Abbildung 4.10:** Immunhistochemie von Kolonschleimhaut aus einem nicht entzündeten Bereich eines Morbus-Crohn-Patienten (Paraffinmaterial), 100x; Negativkontrolle ist nicht negativ, Positivität des intestinalen Epithels und einiger Zellen aus der Lamina propria mucosae. *Method:* NCOG2 (61 µg/ml) + anti-IgG-Biotin + Streptavidin-Peroxidase; Hämatoxylin-Gegenfärbung
- Abbildung 4.11:** Aufnahme mit Diffusionsfilter vor Beginn der LCM; (A) Mikroskopisches Bild des zur Dissektion eingestellten Schleimhautareals eines Kolonresektates von einem Patienten ohne CED, 40x; (B) schematische Darstellung des Vorgangs

- Abbildung 4.12:** Aufnahme ohne Diffusionsfilter während des Laserns bei der LCM; (A) Mikroskopischer Ausschnitt von mit dem Laser beschossenen Epithelzellen in einem Kolonresektat, 200x; (B) schematische Darstellung des Vorgangs
- Abbildung 4.13:** Aufnahme mit Diffusionsfilter vom Cap nach der LCM; (A) Mikroskopisches Bild der dissezierten intestinalen Epithelzellreihe, 40x; (B) schematische Darstellung des Vorgangs
- Abbildung 4.14:** Aufnahme mit Diffusionsfilter nach der LCM und Abheben des Caps; (A) Mikroskopisches Bild vom zusätzlich entstandenen Freiraum, von wo die Epithelzellen abgehoben wurden, 40x; (B) schematische Darstellung des Vorgangs
- Abbildung 4.15:** Abhängigkeit der C_T -Werte von der eingesetzten cDNA-Menge. Die C_T -Werte für die B7h-cDNA (A) und für GAPDH (B) wurden für eine vierstufige Verdünnungsreihe der cDNA bestimmt
- Abbildung 4.16:** Abhängigkeit der ΔC_T -Werte von der eingesetzten cDNA-Menge. Die cDNA-Mengen wurden jeweils aus gleichen vierstufigen Verdünnungsschemata hergestellt
- Abbildung 4.17:** Expression der Housekeeping-Gene HPRT und GAPDH in Relation zur 18S-rRNA-Expression vor und nach Stimulation mit TNF α , getestet an der Tumorzelllinie T-84
- Abbildung 4.18:** Durch Real-Time PCR (TaqMan) erstellte Amplifikationskurven des Housekeeping-Gens „GAPDH“ und des Zielgens „B7h“ (= amplification plot). Die cDNA stammt aus CD19-negativen PBL = Kalibrator sowie aus einer Gewebeprobe aus befallenem und nicht befallenem Bereich desselben Morbus-Crohn-Patienten
- Abbildung 4.19:** Relative B7h-Expression CD19-negativer und CD19-positiver PBL. Den Referenzwert liefern CD19-negative PBL

-
- Abbildung 4.20:** Relative B7h-Expression von dem Tonsillenepithel und der Lamina propria mucosae aus befallener und nicht befallener Schleimhaut von CED-Patienten. Den Referenzwert liefern CD19-negative PBL
- Abbildung 4.21:** B7h-Expressionsmuster auf intestinalen Epithelzellen von Nicht-CED-Patienten. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen
- Abbildung 4.22:** B7h-Expressionsmuster auf intestinalen Epithelzellen von Patienten mit Colitis ulcerosa. Es wurden jeweils Areale aus befallener und nicht befallener Schleimhaut untersucht. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen
- Abbildung 4.23:** B7h-Expressionsmuster auf intestinalen Epithelzellen von Patienten mit Morbus Crohn. Es wurden jeweils Areale aus befallener und nicht befallener Schleimhaut untersucht. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen
- Abbildung 4.24:** Vergleich der verschiedenen B7h-Expressionsmuster aus allen untersuchten Geweben. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der CD19-negativen PBL bezogen
- Abbildung 4.25:** Vergleich der B7h-Expression auf intestinale Epithel von CED-Patienten (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, jeweils befallenes und nicht befallenes Areal) und Nicht-CED-Patienten. Die relative Expressionsstärke ist auf die Expression der intestinalen Epithelzellen von Nicht-CED-Patienten bezogen

9. Verzeichnis der Abkürzungen

ABC	avidin-biotinylierter Enzym-Komplex
AK	Antikörper
ALIM	activation-inducible lymphocyte immuno-mediatory molecule
APC	antigenpräsentierende Zelle
ASA	Aminosalicylsäure
BSA	bovines Serumalbumin
B7h	B7 homologe
B7-H2	B7 homologue 2
B7-H3	B7 homologue 3
B7-H4	B7 homologue 4
B7RP-1	B7-related protein 1
B7S1	B7 superfamily member 1
BZR	B-Zellrezeptor
C.	Colon
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary-DNA
CRP-1	CD28-related protein-1
CSA	catalysed signal amplification
C_T	threshold cycle
CTLA-4	cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4
CU	Colitis ulcerosa
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsortierer

FAE	follikel-assoziiertes Epithel
FAM	5-(u. 6)-Carboxyfluoreszein
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidinium-Isothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gp180	Glycoprotein 180
h	human
HE	Hämatoxylin-Eosin
IBD	inflammatory bowel disease
ICAM	Intracellular adhesion molecule
ICOS	inducible costimulator
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INFγ	Interferon γ
LCM	Laser capture microdissection
LICOS	ligand of ICOS
LP(L)	Lamina propria (Lymphozyten)
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	labeled streptavidin-biotin system
MACS	magnetischer Zellsortierer
MAdCAM	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MC	Morbus Crohn
MHC	major histocompatibility complex
MOG	Myelin Oligodendrozyt Glykoprotein
mRNA	massenger-RNA
M-Zelle	Mikrofalten-Zelle

NFAE	nicht-follikel-assoziiertes Epithel
NGS	normales Ziegenserum
NK	natürliche Killerzelle
pAPC	periphere antigenpräsentierende Zelle
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	programmed death-1
PDAR	pre-developed assay reagents
PD-L1 /-L2	programmed death ligand 1 / -2
PE	Probeexcision
PE	Phycoerythrin
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PP	Payersche Plaques
Res.	Resektion
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions –PCR
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TAMRA	5-(u. 6)-Carboxytetramethylrhodamin
TGF-β	transforming growth factor β
Th	T-Helferzelle
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TSH	thyreoideastimulierendes Hormon
TZR	T-Zellrezeptor

10. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Sharpe AH. (1999). T-cell stimulation: an abundance of B7s. *Nat. Med.* **5**: 1345-1346

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**: 765-772

Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, Buckwalter S, Ledbetter JA, Clark EA. (2000). Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J. Immunol.* **164**: 4689-4696

Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* **8**: 1024-1032

Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. (2001). Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* **344**: 808-814

Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. (2003). Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* **124**: 40-46

Ardizzone S, Porro GB. (2002). Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J. Intern. Med.* **252**: 475-496

Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. (2003). Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut.* **52**: 840-846

Bland PW, Warren LG. (1986). Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology* **58**: 1-7

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**: 87-98

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

Bonhagen K, Liesenfeld O, Stadecker MJ, Hutloff A, Erb K, Coyle AJ, Lipp M, Kroczeck RA, Kamradt T. (2003). ICOS⁺ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur. J. Immunol.* **33**: 392-401

Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, Liotta LA. (1997). Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* **278**: 1481-1483

Bretscher PA. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 185-190

Brodie D, Collins AV, Iaboni A, Fennelly JA, Sparks LM, Xu XN, van der Merwe PA, Davis SJ. (2000). LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr. Biol.* **10**: 333-336

Bugeon L, Dallman MJ. (2000). Costimulation of T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **162**: 164-168

Buonfiglio D, Bragardo M, Redoglia V, Vaschetto R, Bottarel F, Bonisconi S, Bensi T, Mezzatesta C, Janeway CA Jr, Dianzani U. (2000). The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur. J. Immunol.* **30**: 3463-3467

Campbell N, Yio XY, So LP, Li Y, Mayer L. (1999). The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol. Rev.* **172**: 315-324

- Campbell NA, Park MS, Toy LS, Yio XY, Devine L, Kavathas P, Mayer L. (2002). A non-class I MHC intestinal epithelial surface glycoprotein, gp180, binds to CD8. *Clin. Immunol.* **102**: 267-274
- Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG, Mucerino DR, Habr-Gama A, Kiss DR. (2002). Inflammatory bowel diseases: principles of nutritional therapy. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo* **57**: 187-198
- Carreno BM, Collins M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 29-53
- Chambers CA. (2001). The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol.* **22**: 217-223
- Chambers CA, Allison JP. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 203-210
- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:565-594
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L. (2001). B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* **2**: 269-274
- Chen XL, Cao XD, Kang AJ, Wang KM, Su BS, Wang YL. (2003). In situ expression and significance of B7 costimulatory molecules within tissues of human gastric carcinoma. *World. J. Gastroenterol.* **9**: 1370-1373
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159

Colgan SP, Hershberg RM, Furuta GT, Blumberg RS. (1999). Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**: 13938-13943

Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* **2**: 203-209

Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* **13**: 95-105

Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. (1932). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* **99**: 1323-1329

(a) Dong C, Juedes AE, Teman UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T cell activation and function. *Nature* **409**: 97-101

(b) Dong C, Temann UA, Flavell RA. (2001). Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J. Immunol.* **166**: 3659-3662

Eckmann L, Stenson WF, Savidge TC, Lowe DC, Barrett KE, Fierer J, Smith JR, Kagnoff MF. (1997). Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *J. Clin. Invest.* **100**: 296-309

Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* **3**: 611-618

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. (1996). Laser capture microdissection. *Science* **274**: 998-1001

Epple HJ, Kreusel KM, Hanski C, Schulzke JD, Riecken EO, Fromm M. (1997). Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol. *Pflugers Arch.* **433**: 638-647

Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. (1997). Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* **40**: 619-622

Framson PE, Cho DH, Lee LY, Hershberg RM. (1999). Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **116**: 1054-1062

Frank TS, Cook SM. (1996). Analysis of paraffin sections of Crohn's disease for *Mycobacterium paratuberculosis* using polymerase chain reaction. *Mod. Pathol.* **9**: 32-35

Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Gribben JG, Ng JW, Kim J, Goldberg JM, Hathcock K, Laszlo G, et al. (1993). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **178**: 2185-2192

Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, Lombard DB, Zhou LJ, White M, Fingerhuth JD, Gribben JG, Nadler LM. (1991). Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation B7. *J. Exp. Med.* **174**: 625-631

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**: 1027-1034

Friedman S, Blumberg RS. Entzündliche Darmerkrankungen. In: „Harrisons Innere Medizin 24“. Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N (Hrsg.), ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin-Leiben, 2003, 15. Auflage, 1846-1859

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. (1996). Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* **157**: 1261-1270

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**: 386-401

Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR. (1999). Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol. Carcinog.* **25**: 86-91

Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, Corcoran J, Rottman JB, Lora J, Al-Garawi A, Kroczeck R, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ. (2001). ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat. Immunol.* **2**: 597-604

Gordon FH, Lai CW, Hamilton MI, Allison MC, Srivastava ED, Fouweather MG, Donoghue S, Greenlees C, Subhani J, Amlot PL, Pounder RE. (2001). A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology* **121**: 268-274

Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. (2003). Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* **4**: 261-268

Hart A, Kamm MA. (2002). Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**: 2017-2028

Henry J, Miller MM, Pontarotti P. (1999). Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunol. Today* **20**: 285-288

Herold G und Mitarbeiter. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: „Innere Medizin“, Gerd Herold (Hrsg.), Köln, 2002, 396-402

Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT. (1998). Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **102**: 792-803

Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J, Blum JS, Nepom GT. (1997). Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J. Clin. Invest.* **100**: 204-215

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**: 413-417

Hirata I, Austin LL, Blackwell WH, Weber JR, Dobbins WO 3rd. (1986). Immunoelectron microscopic localization of HLA-DR antigen in control small intestine and colon and in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **31**: 1317-1330

Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 993-1000

Hoang P, Crotty B, Dalton HR, Jewell DP. (1992). Epithelial cells bearing class II molecules stimulate allogeneic human colonic intraepithelial lymphocytes. *Gut* **33**: 1089-1093

Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**: 263-266

Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. (2002). Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J. Immunol.* **169**: 4332-4339

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 2002, 5. Auflage, 777 S.

Jenkins MK, Schwartz RH. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and vivo. *J. Exp. Med.* **165**: 302-319

Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. (2000). The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Radiol.* **35**: 154-167

Karow T, Lang-Roth R. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen bzw. Immunsuppressiva. In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“. Thomas Karow, Köln, 2003, 11. Auflage, 331-332 bzw. 671-678

Khayyamian S, Hutloff A, Buchner K, Grafe M, Henn V, Kroczeck RA, Mages HW. (2002). ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 6198-6203

Kim HS, Colgan SP, Pitman R, Hershberg RM, Blumberg RS. (2000). Human CD1d associates with prolyl-4-hydroxylase during its biosynthesis. *Mol. Immunol.* **37**: 861-868

Kim HS, Garcia J, Exley M, Johnson KW, Balk SP, Blumberg RS. (1999). Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* **274**: 9289-9295

Köhne G, Stallmach A. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: „Thiemes Innere Medizin“. Alexander K, Daniel WG, Diener H-C, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1999, 615-622

Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, Gutierrez-Ramos JC, Bachmann MF. (2000). Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J. Exp. Med.* **192**: 53-61

Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* **96**: 1-4

Laroux FS, Grisham MB. (2001). Immunological basis of inflammatory bowel disease: role of the microcirculation. *Microcirculation* **8**: 283-301

Latchman Y, Wood CR, Chernove T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. (2001). PD-L2, a novel B7 homologue, is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**: 261-268

Lehmann U, Kreipe H. (2001). Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* **25**: 409-418

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 233-258

Liang L, Porter EM, Sha WC. (2002). Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J. Exp. Med.* **196**: 97-108

Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. (1988). Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* **29**: 352-357

Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, Leonard JP, Hunter SE, Zollner R, Thomas JL, Miyashiro JS, Jacobs KA, Collins M. (2000). Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J. Immunol.* **164**: 1653-1657

- Ling V, Wu PW, Miyashiro JS, Marusic S, Finnerty HF, Collins M. (2001). Differential expression of inducible costimulator-ligand splice variants: lymphoid regulation of mouse GL50-b and human GL50 molecules. *J. Immunol.* **166**: 7300-7308
- Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, and Mittler RS. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* **4**:535-543
- Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**: 793-801
- Liu X, Bai XF, Wen J, Gao JX, Liu J, Lu P, Wang Y, Zheng P, Liu Y. (2001). B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8⁺ T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **194**: 1339-1348
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* **25**: 402-408
- Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. (1998). Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology* **114**: 1161-1168
- Lüllman H, Mohr K. Glucocorticoide. In: "Pharmakologie und Toxikologie". Lüllman H, Mohr K (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1999, 14. Auflage, 351-357
- MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. (1998). The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **4**: 54-67
- Mages HW, Hutloff A, Heuck C, Buchner K, Himmelbauer H, Oliveri F, and Kroczeck RA. (2000). Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur. J. Immunol.* **30**: 1040-1047

Mayer L, Shlien R. (1987). Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J. Exp. Med.* **166**: 1471-1483

McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **165**: 5035-5040

McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**: 102-104

McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol. Rev.* **165**: 231-247

Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. (1997). Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* **112**: 1169-1178

Mueller DL. (2000). T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Curr. Biol.* **10**: R227-230

Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*; **155**: 335-350

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

National Cancer Institute. Entparaffinierungs- und Färbeprotokoll für Paraffinschnitte in der Vorbereitung zur „laser capture microdissection (LCM)“. <http://cgap-mf.nih.gov/Protocols> (Stand 2003)

- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* **182**: 1281-1290
- Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* **2**: 1004-1009
- Nielsen OH, Verspaget HW, Elmgreen J. (1988). Inhibition of intestinal macrophage chemotaxis to leukotriene B₄ by Sulphasalazine, Osalazine and 5-Aminosalicylic Acid. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2**: 203-211
- Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, Minato N, Yagita H, Nakano T, Honjo T. (1996). Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int. Immunol.* **8**: 773-780
- Nishimura H, Honjo T. (2001). PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* **22**: 265-268
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**: 141-151
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor deficient mice. *Science* **291**: 319-322
- Nusrat A, Parkos CA, Bacarra AE, Godowski PJ, Delp-Archer C, Rosen EM, Madara JL. (1994). Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. *J. Clin. Invest.* **93**: 2056-2065

Ogasawara K, Yoshinaga SK, Lanier LL. (2002). Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN-gamma production in activated murine NK cells. *J. Immunol.* **169**: 3676-3685

Otto HF. Kolon und Rektum. In: „Pathologie“. Böcker W, Denk H, Heitz Ph U (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2001, 2. Auflage, 677-700

Özkaynak E, Gao W, Shemmeri N, Wang C, Gutierrez-Ramos JC, Amaral J, Qin S, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW. (2001). Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat. Immunol.* **2**: 591-596

Pabst R, Berens von Rautenfeld D, Drenckhanhn D. Fleischhauer K. Die Systeme und Organe der Abwehr. In: „Benninghof Anatomie“. Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg Verlag, München-Wien-Baltimore, 1994, 15. Auflage, Bd. 1, 733-772

Panja A, Goldberg S, Eckmann L, Krishen P, Mayer L. (1998). The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **161**: 3675-3684

Paraffin Block RNA Isolation Kit. Manual Version 0306. Ambion

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* **150**: 823-832

Perrin PJ, Lavi E, Rumbley CA, Zekavat SA, Phillips SM. (1999). Experimental autoimmune meningitis: a novel neurological disease in CD28-deficient mice. *Clin. Immunol.* **91**: 41-49

Pitman RS, Blumberg RS. (2000). First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J. Gastroenterol.* **35**: 805-814

Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF Jr, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J. Immunol.* **162**: 6829-6835

Podolsky DK. (2002). Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* **347**: 417-429

Poggioli G, Pierangeli F, Laureti S, Ugolini F. (2002). Review article: indication and type of surgery in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16 Suppl. 4**: 59-64

Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. (2003). B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity* **18**: 863-873

Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. (1999). Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **340**: 1398-1405

Quill H, Schwartz RH. (1987). Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* **138**: 3704-3712

Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J, Sartor RB. (2001). Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect. Immun.* **69**: 2277-2285

Reinecker HC, MacDermott RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK. (1996). Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* **111**: 1706-1713

Reinecker HC, Podolsky DK. (1995). Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 8353-8357

- Rocha B, Vassalli P, Grand DG. (1994). Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J. Exp. Med.* **180**: 681-686
- Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seeger D, Schreiber S. (2003). TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 1001-1009
- Roth M, Bernhardt V. Klinik und Praxis. In: "Chronisch entzündliche Darmerkrankungen" (Praxismanual). Dr. Falk Pharma GmbH, Freiburg, 2000, 6. Auflage, 10-21
- Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, Pierce B, Gutierrez-Ramos JC, Ozkaynak E, Coyle AJ. (2001). The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat. Immunol.* **2**: 605-611
- Rowbotham DS, Mapstone NP, Trejdosiewicz LK, Howdle PD, Quirke P. (1995). Mycobacterium paratuberculosis DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* **37**: 660-667
- Rutgeerts P. (2002). A critical assessment of new therapies in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17 Suppl**: 176-185
- Sanderson IR, Ouellette AJ, Carter EA, Walker WA, Harnatz PR. (1993). Differential regulation of B7h mRNA in enterocytes and lymphoid cells. *Immunology* **79**: 434-438
- Sands BE, Bank S, Sninsky CA, Robinson M, Katz S, Singleton JW, Miner PB, Safdi MA, Galandiuk S, Hanauer SB, Varilek GW, Buchman AL, Rodgers VD, Salzberg B, Cai B, Loewy J, DeBruin MF, Rogge H, Shapiro M, Schwertschlag US. (1999). Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology* **117**: 58-64
- Sartor RB. (1997). Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? *Inflamm. Bowel. Dis.* **3**: 230-235

(a) Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **116**: 301-309

(b) Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. (1999). Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J. Cell Sci.* **112**: 137-146

Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. (2000). Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* **119**: 1461-1472

Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. (1994). Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* **81**: 85-91

Schwartz RH. (1997). T cell clonal anergy. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 351-357

Sechi LA, Manuela M, Francesco T, Amelia L, Antonello S, Giovanni F, Stefania Z. (2001). Identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Biopsy Specimens from Patients with Crohn's Disease Identified by In Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 4514-4517

Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**: 609-612

Shanahan F. (2000). Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm. Bowel. Dis.* **6**: 107-115

Shanahan F. (2002). Crohn's disease. *Lancet* **359**: 62-69

Shand A, Forbes A. (2003). Potential therapeutic role for cytokine or adhesion molecule manipulation in Crohn's disease: in the shadow of infliximab? *Int. J. Colorectal Dis.* **18**: 1-11

Sharpe AH, Freeman GJ. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 116-126

Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. (2003). B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* **18**: 849-861

Sierro F, Pringault E, Assman PS, Kraehenbuhl JP, Debard N. (2000). Transient expression of M-cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* **119**: 734-743

Smith KM, Brewer JM, Webb P, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos C, Garside P. (2003). Inducible costimulatory molecule-B7-related protein 1 interactions are important for the clonal expansion and B cell helper functions of naive, Th1, and Th2 T cells. *J. Immunol.* **170**: 2310-2315

Somnay-Wadgaonkar K, Nusrat A, Kim HS, Canchis WP, Balk SP, Colgan SP, Blumberg RS. (1999). Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form. *Int. Immunol.* **11**: 383-392

Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. (1999). B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* **11**: 423-432

Tafari A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VSF, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW. (2001). ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* **409**: 105-108

Tamatani T, Tezuka K, Hanzawa-Higuchi N. (2000). AILIM/ICOS: a novel lymphocyte adhesion molecule. *Int. Immunol.* **12**: 51-55

Teller IC, Beaulieu J. (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* © Cambridge University Press ISSN 1462-3994

Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, Drillenburger P, van Deventer SJ, Chvatchko Y, Te Velde AA. (2001). Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* **121**: 1372-1379

Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, Weinstock J, Matis LA, Bluestone JA, Sperling AI. (2001). Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J. Immunol.* **167**: 1996-2003

Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**: 1333-1337

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**: 541-547

Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Lodinova-Zadnikova R, Stepankova R, Cukrowska B, Funda DP, Striz I, Kozakova H, Trebichavsky I, Sokol D, Rehakova Z, Sinkora J, Fundova P, Horakova D, Jelinkova L, Sanchez D. (2002). Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **128**: 77-89

Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Okamoto R, Hibi T, Tezuka K, Azuma M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M. (2003). Ameliorating effect of anti-inducible costimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. *Gastroenterology* **124**: 410-421

Tzachanis D, Boussiotis VA. (2003). Advances in transplantation tolerance: the role of anergic, regulatory and antigen presenting cells. *Haema* **6**: 17-34

User Bulletin #2. ABI PRISM™ 7700 Detection System. (1997). Perkin-Elmer

User's Manual (Draft). ABI PRISM™ 7700 Detection System. (1997). Perkin-Elmer

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**: research 0034,1-11

van de Wal Y, Corazza N, Allez M, Mayer LF, Iijima H, Ryan M, Cornwall S, Kaiserlian D, Hershberg R, Koezuka Y, Colgan SP, Blumberg RS. (2003). Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**: 1420-1431

Wahl P, Schoop R, Bilic G, Neuweiler J, Le Hir M, Yoshinaga SK, Wuthrich RP. (2002). Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand). *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**: 1517-1526

Wallin JJ, Liang L, Bakardjiev A, Sha WC. (2001). Enhancement of CD8⁺ T cell responses by ICOS/B7h costimulation. *J. Immunol.* **167**: 132-139

Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, Ni J, Chen L. (2000). Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* **96**: 2808-2813

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* **270**: 985-988

Watts TH, DeBenedette MA. (1999). T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 286-293

Wirtz S, Neurath MF. (2003). Gene transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gene Ther.* **10**: 854-860

Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, Buchner K, Dorner BG, Jonuleit H, Mages HW, Kroczeck RA. (2002). ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **32**: 2680-2686

Yacyszyn BR, Bowen-Yacyszyn MB, Jewell L, Tami JA, Bennett CF, Kisner DL, Shanahan WR Jr. (1998). A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* **114**: 1133-1142

Yokochi T, Holly RD, Clark EA. (1982). B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J. Immunol.* **128**: 823-827

Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* **402**: 827-832

Yoshinaga SK, Zhang M, Pistillo J, Horan T, Khare SD, Miner K, Sonnenberg M, Boone T, Brankow D, Dai T, Delaney J, Han H, Hui A, Kohno T, Manoukian R, Whoriskey JS, Coccia MA. (2000). Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int. Immunol.* **12**: 1439-1447

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Wagner gilt mein Dank für die mir gegebene Möglichkeit, an dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München im Klinikum rechts der Isar zu promovieren.

In gleicher Weise möchte ich Frau Prof. Dr. I. Förster, meiner Arbeitsgruppenleiterin, für die Überlassung des Themas, die stets sehr freundliche und fachliche Betreuung sowie für die kritische Durchsicht der Dissertation danken.

Ganz besonderen Dank sage ich meinem Betreuer, Herrn Dr. W. Reindl, für die äußerst herzliche und intensive Zusammenarbeit. Sein immerwährender Optimismus verbunden mit großer Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft sowie die konstruktiven und eingehenden Diskussionen trugen in erheblichem Maße zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die fachliche Unterstützung und die arbeitsfördernde, angenehme Atmosphäre.

Dem Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar, insbesondere Herrn Prof. Dr. F. Fend und Herrn Dr. T. Richter, schulde ich großen Dank für die wertvolle Kooperation in der Beurteilung histologischer und immunhistologischer Gewebeschnitte, der Verwendung des Archivs für Paraffinmaterial sowie für die Einweisung und Bereitstellung der erforderlichen Geräte.

Derselbe Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. W. Schepp und seiner II. medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Bogenhausen für das zweijährige Sammeln frischer Biopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. An dieser Stelle sei auch den Patienten für ihre Einwilligung zur zusätzlichen Gewebesentnahme bei der Koloskopie gedankt, wodurch ein großer Beitrag zur Realisierung der Arbeit geleistet wurde.

Schließlich möchte ich noch einen herzlichen Dank meinen Eltern aussprechen, deren Unterstützung und Vertrauen mir erst ein erfolgreiches Abschließen des Studiums und damit auch der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben, sowie Beatrice für ihr außergewöhnliches Verständnis während dieser Zeit.