

**Sebastian Stricker**

---

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen  
Transglutaminase und ihr Einfluss auf den  
Transport von Gliadin innerhalb des  
menschlichen Duodenalepithels

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen  
Transglutaminase und ihr Einfluss auf den  
Transport von Gliadin innerhalb des  
menschlichen Duodenalepithels**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Stricker, Sebastian**

aus Kirchen

Gießen, 2018

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abteilung für  
Allgemeinpädiatrie und Neonatologie,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer
2. Gutachter: Prof. Dr. Elke Roeb

Tag der Disputation: 27.02.2019

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zöliakie .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Definition .....	1
1.1.2 Geschichte .....	1
1.1.3 Klassifikation und Epidemiologie.....	2
1.1.4 Pathogenese.....	5
1.1.4.1 Exogene Faktoren.....	6
1.1.4.1.1 Die Rolle des Glutens .....	6
1.1.4.1.2 Weitere Umweltfaktoren .....	9
1.1.4.2 Endogene Faktoren.....	10
1.1.4.2.1 Genetische Prädisposition.....	10
1.1.4.2.2 Die Gewebstransglutaminase .....	12
1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild und assoziierte Erkrankungen .....	15
1.1.6 Diagnostik .....	18
1.1.7 Therapie .....	23
1.1.7.1 Die glutenfreie Diät .....	23
1.1.7.2 Alternative Therapieansätze .....	24
1.1.8 Langfristige Folgen und Komplikationen .....	25
<b>1.2 Mikrobielle Transglutaminase .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3 Präsentation von Antigenen.....</b>	<b>28</b>
1.3.1 Präsentation endogener Antigene durch MHC-I-Moleküle .....	28
1.3.2 Präsentation exogener Antigene durch MHC-II-Moleküle.....	29
1.3.3 Antigenkreuzpräsentation .....	30
<b>1.4 Die Rolle der Enterozyten als antigenpräsentierende Zellen .....</b>	<b>32</b>
<b>1.5 RACE-Zellen .....</b>	<b>33</b>
<b>1.6 Fragestellung .....</b>	<b>35</b>

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Studiendesign .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Patientenkollektiv .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3 Material .....</b>	<b>37</b>
2.3.1 Geräte und Materialien .....	37
2.3.2 Chemikalien .....	39
2.3.3 Lösungen und Puffer .....	41
2.3.4 Spezielle Enzyme und Proteinfractionen .....	43
<b>2.4 Zellkultur .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5 Verarbeitung der Biopsien .....</b>	<b>46</b>
2.5.1 Probengewinnung und Inkubation .....	46
2.5.2 Probenaufbereitung und Lagerung .....	47
<b>2.6 Slot-Blot .....</b>	<b>48</b>
2.6.1. Grundlagen des Slot-Blot-Verfahrens .....	48
2.6.2. Versuchsdurchführung .....	49
<b>2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>50</b>
2.7.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzmikroskopie .....	50
2.7.2 Versuchsdurchführung .....	51
<b>2.8 Kryoimmunelektronenmikroskopie .....</b>	<b>53</b>
2.8.1 Grundlagen der Kryoimmunelektronenmikroskopie .....	53
2.8.2 Primäre Antikörper .....	53
2.8.3 Sekundäre Antikörper .....	54
2.8.4 Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte .....	55
2.8.5 Antikörperbeschichtung .....	56
2.8.6 Einbettung und Kontrastierung .....	57
2.8.7 Quantitative Auswertung der antikörperbeschichteten EM-Netze .....	57
2.8.8. Statistische Auswertung .....	60

<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Patienten .....</b>	<b>61</b>
3.1.1 Patienteneinteilung.....	61
3.1.2 Nicht-Zöliakie-Patienten.....	61
3.1.3 Zöliakiepatienten.....	62
3.1.4 Patientendaten .....	63
<b>3.2 Slot-Blot .....</b>	<b>63</b>
<b>3.3 Immunfluoreszenz .....</b>	<b>64</b>
3.3.1 Zeitabhängige Aufnahme von mTG durch HT-29-Zellen .....	64
3.3.2 mTG-Aufnahme in Enterozyten der Darmschleimhaut.....	66
3.3.4 Gesteigerte GP2-Expression und Antigenaufnahme durch RANKL.....	67
<b>3.4 Kryoimmunelektronenmikroskopie.....</b>	<b>74</b>
3.4.1 Hintergrundmarkierung und Quantifizierung der Antigenaufnahme.....	74
3.4.2 Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase in Enterozyten .....	75
3.4.2.1 Lokalisation der mTG im ER von Enterozyten.....	75
3.4.2.2 Lokalisation der mTG in anderen Zellkompartimenten .....	77
3.4.3 Lokalisation von Gliadin unter Einfluss mikrobieller Transglutaminase .....	79
3.4.3.1 Transport von Gliadin in das ER von Enterozyten .....	79
3.4.3.2 Gliadin in späten Endosomen.....	80
3.4.3.3 Gliadin in anderen Zellkompartimenten unter Einfluss der mTG.....	82
3.4.4 Antigenaufnahme in RACE-Zellen.....	83
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Diskussion der Methodik .....</b>	<b>87</b>
4.1.1 Patienten.....	87
4.1.2 Biopsieaufbereitung .....	88
4.1.3 Kryoimmunelektronenmikroskopie .....	88
<b>4.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>89</b>

4.2.1. Slot-Blot-Verfahren .....	89
4.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	90
4.2.2.1 Nachweis der Aufnahme von mTG <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> .....	90
4.2.2.2 RANKL induziert Zellen mit GP2-Expression und mTG-Aufnahme .....	91
4.2.3 Kryoelektronenmikroskopie .....	92
4.2.3.1 Transzelluläre Aufnahme von mTG in das Darmepithel .....	92
4.2.3.2 Transport von mTG und Gliadin in das ER .....	93
4.2.3.3 Gliadin in späten Endosomen.....	94
4.2.3.4 Lokalisation von mTG und Gliadin in Vakuolen, an der apikalen und basolateralen Membran .....	95
4.2.3.5 Antigenaufnahme durch RACE-Zellen.....	97
4.2.3.6 Transport von mTG und Gliadin in das ER von RACE-Zellen .....	98
<b>4.3 Die Rolle der mTG im Rahmen der Zöliakie.....</b>	<b>99</b>
<b>4.5 Fazit und Perspektiven.....</b>	<b>102</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>104</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>107</b>
<b>7.1 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>7.2 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>
<b>7.3 Veröffentlichungen .....</b>	<b>129</b>
<b>7.4 Danksagung.....</b>	<b>131</b>
<b>7.5 Lebenslauf .....</b>	<b>132</b>

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

# 1 Einleitung

## 1.1 Zöliakie

### 1.1.1 Definition

Zöliakie, auch glutensensitive Enteropathie genannt, ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die durch die Aufnahme von Gluten und artverwandten Proteinen in genetisch prädisponierten Individuen ausgelöst wird (1). Es handelt sich hierbei um eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Menschen, mit einer Prävalenz von etwa 1% (2–5).

Ausschlaggebend in der Ätiopathogenese sind hierbei vor allem die alkohollöslichen Bestandteile des Glutens, die Gliadine, welche in Weizen enthalten sind, sowie entsprechende Prolamine in Roggen (Secalin), Gerste (Hordein) und Hafer (Avenin). Die Erkrankung zeichnet sich durch eine autoimmunologische Zerstörung der Darmschleimhaut, einhergehend mit Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und Einwanderung von Lymphozyten in das Darmepithel, aus. Charakteristisch ist weiterhin die Bildung von Antikörpern des Typs IgA gegen die humane Gewebstransglutaminase (TG2). Entgegen früherer Annahmen ist die Zöliakie keine reine Enteropathie, sondern eine Multisystemerkrankung, bei der die darmassoziierten Symptome keineswegs dominieren müssen (6).

Derzeit stellt die lebenslange glutenfreie Diät die einzig zuverlässige Behandlung der Zöliakie dar. Regelmäßig kommt es unter dieser Therapie zum Rückgang der intestinalen Schleimhautschädigung und zum Abfall der Autoantikörpertiter im Serum. Allerdings stellt diese Maßnahme einen erheblichen Eingriff in das Leben der teilweise noch sehr jungen Betroffenen dar und die Therapieadhärenz der Patienten ist oft nicht zufriedenstellend (7).

### 1.1.2 Geschichte

Zöliakie ist eine schon in der Antike beschriebene Erkrankung. Die erste Schilderung des Krankheitsbildes stammt heutiger Ansicht nach vom griechischen Arzt Aretaeus von Kapadokien aus dem ersten Jahrhundert nach Christus (8). Der Name dieser Erkrankung leitet sich aus dem Altgriechischen (koilos = Bauch, koilakos = an der Verdauung leidend) ab und beschreibt die ursprünglich mit der Krankheit assoziierten Symptome.

Den Ursprung der modernen Definition der Zöliakie lieferte der englische Arzt Samuel Gee im Jahre 1888 (9). In seiner Darstellung prägte er den Krankheitsbegriff und beschrieb

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

die klassischen Symptome wie chronische Diarrhoe, Muskelschwäche und eine Auftreibung des Bauches. Weiterhin war er schon damals der Meinung, die Krankheit sei durch eine spezielle Diät zu therapieren. Jedoch war man sich zu dieser Zeit noch uneinig, welcher Bestandteil der Nahrung für die Symptome verantwortlich sei und es wurden verschiedenste Diätformen empfohlen (9).

Der entscheidende Schritt in der Identifizierung des Auslösers der Krankheit gelang dem niederländischen Arzt Willem-Karel Dicke in den 50er-Jahren des 20. Jahrhunderts. Während des 2. Weltkriegs hatte er einen Zusammenhang zwischen dem gesundheitlichen Zustand seiner Zöliakiepatienten und der Nahrung, die im Zuge der Lebensmittelrationierung oftmals keinen Weizen enthielt, beobachtet. Später legte Dicke in seiner Promotionsarbeit dar, dass sich die an Zöliakie erkrankten Patienten bei Verzicht auf Weizen, Gerste und Hafer besser fühlten und ihre fettigen Durchfälle abnahmen (10). Aufbauend auf dieser Arbeit zeigten *Anderson et al.* zwei Jahre später, dass nicht, wie bis dahin vermutet, die Weizenstärke, sondern das Klebeeiprotein Gluten die Enteropathie aufrechterhielt (11). Damit war der exogene Faktor, der zur Krankheitsentstehung beiträgt, gefunden.

In der Folge wurde das Wissen über die Zöliakie durch diagnostische Neuerungen erweitert. Vor allem die Etablierung der histologischen Untersuchung von Dünndarmbiopsien sowie die Entdeckung der humanen Gewebstransglutaminase als Autoantigen der Zöliakie im Jahre 1997, waren Meilensteine in der Geschichte der Erkrankung (12–14).

### **1.1.3 Klassifikation und Epidemiologie**

Aufgrund der Vielfalt an unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen und Verlaufsformen wird die Zöliakie in verschiedene Kategorien eingeteilt. Hierzu gehören die klassische, symptomatische, subklinische, potentielle und refraktäre Zöliakie. Diese Definitionen ersetzen vormals verwendete Begriffe wie *silente*, *latente* oder *oligosymptomatische* Zöliakie (Tab. 1-1) (15).

**Tab. 1-1: Klinische Formen und einhergehende Befunde der Zöliakie.**

In Klammern stehen alternative Bezeichnungen. Alle Formen weisen einen HLA-DQ2/8 (Humanes Leukozyten-Antigen) Phänotyp auf. Quelle: Eigene Darstellung nach (15).

<b>Klinische Form</b>	<b>Befunde</b>
<b>Klassische Zöliakie</b> (auch typische Zöliakie genannt)	> Marsh II Serologie positiv Klassische intestinale Symptomatik
<b>Nicht-klassische Zöliakie</b> (auch atypische Zöliakie genannt)	> Marsh II Serologie positiv Nicht-klassische extraintestinale Symptomatik
<b>Subklinische Zöliakie</b> (ehemals silente Zöliakie)	> Marsh II Serologie positiv (intermittierend) Keine oder nur sehr geringe Symptomatik
<b>Potentielle Zöliakie</b>	Histologie unauffällig Serologie positiv Keine Symptomatik
<b>Refraktäre Zöliakie</b>	Persistierende Symptomatik, positive Serologie und Gewebsschädigung des Darms trotz 12-monatiger strikter GFD

Annahmen über die Häufigkeit der Zöliakie unterlagen in der Vergangenheit einem stetigen Wandel. In den letzten Jahrzehnten ist die Prävalenz der Zöliakie um das Zwei- bis Vierfache gestiegen (16, 17). Eine solch rapide Zunahme der Krankheitshäufigkeit wird eher durch exogene Faktoren, beispielsweise die Ernährung, als durch langfristige genetische Trends verursacht. Allerdings tragen hierzu auch die Weiterentwicklung der Diagnostik und ein zunehmendes Bewusstsein gegenüber der Erkrankung bei. Daneben scheint

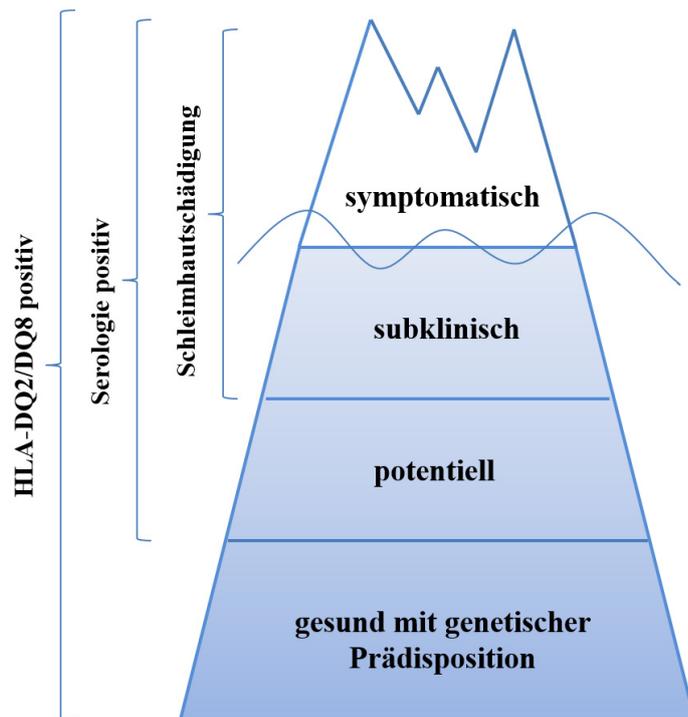
Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

im Sinne der „Hygiene-Theorie“ die Abnahme infektiöser Krankheiten den Anstieg allergischer und autoimmunologischer Erkrankungen zu begünstigen (18).

Durch erweiterte diagnostische Möglichkeiten und Verwandtenscreening mittels Serologie können heutzutage auch asymptomatische Fälle detektiert werden. Dies führte zu der Erkenntnis, dass die Zöliakie eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen der Menschheit ist, wobei ein Großteil der Erkrankten immer noch nicht frühzeitig entdeckt wird (17).

Hinweis auf einen starken genetischen Einfluss in der Pathogenese ist die erhöhte Erkrankungshäufigkeit bei erst- und zweitgradig Verwandten von Zöliakiepatienten mit 4,5% sowie 3,3% (19). Populationsbasierte Zwillingsstudien konnten eine Konkordanz von 75% bei eineiigen sowie 11% bei zweieiigen Zwillingen nachweisen. Daraus lässt sich ein, verglichen mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Mellitus und rheumatoider Arthritis, enormer Stellenwert der genetischen Prädisposition ableiten (20, 21). Weiterhin ist das Krankheitsrisiko in Abhängigkeit vom HLA-Subtyp (Humanes Leukozyten-Antigen) stark unterschiedlich und kann zwischen 2-20% variieren (22).

Man geht davon aus, dass die Zöliakie derzeit unterdiagnostiziert ist. Dies liegt vor allem daran, dass es eine große Anzahl an subklinischen Patienten gibt, die keine oder teilweise nur sehr geringe Symptome zeigen. Der Anteil dieser Erkrankten wird von einigen Autoren bei 60% beziffert, eine Besonderheit, die in der Literatur als „*Eisbergphänomen*“ bezeichnet wird (Abb. 1-1) (3, 5, 23, 24). Das Erklärungsmodell dient der Darstellung der Verteilung der einzelnen Krankheitsformen und visualisiert die Abstufungen zwischen genetisch prädisponierten Individuen, potentiellen, subklinischen und symptomatischen Patienten. Entscheidend ist, dass nur ein geringer Prozentsatz der veranlagten Personen eine manifeste Erkrankung entwickelt. Die breite Basis des Eisbergs bilden Menschen, die eine genetische Prädisposition tragen. Diese Veranlagung besteht in den HLA-Molekülen DQ2 und DQ8, welche etwa 99% der Erkrankten aufweisen. Interessanterweise lässt sich dieses Merkmal jedoch bei rund 25% der gesamten Bevölkerung finden und nur ein geringer Teil davon, etwa 4%, entwickelt eine glutensensitive Enteropathie (25).



**Abb. 1-1: Der „Zöliakie-Eisberg“.**

Zu sehen ist die Verteilung der unterschiedlichen Spektren der Zöliakie. Nur ein kleiner Teil ist klinisch manifest und somit „sichtbar“. Ein Großteil der Patienten bleibt jedoch asymptomatisch und wird nicht diagnostiziert. Quelle: Eigene Darstellung nach (5, 23, 24).

Der Schlüssel zum Verständnis der Zöliakie liegt darin, die Faktoren zu identifizieren, die von einer genetischen Veranlagung zur Entstehung der Erkrankung führen oder dies verhindern.

#### **1.1.4 Pathogenese**

Nach derzeitigem Verständnis handelt es sich bei der Zöliakie um eine multifaktorielle Erkrankung. Entscheidende Determinanten sind dabei die Exposition zu Gluten, die genetische Prädisposition und die als Autoantigen fungierende humane Gewebstransglutaminase.

### 1.1.4.1 Exogene Faktoren

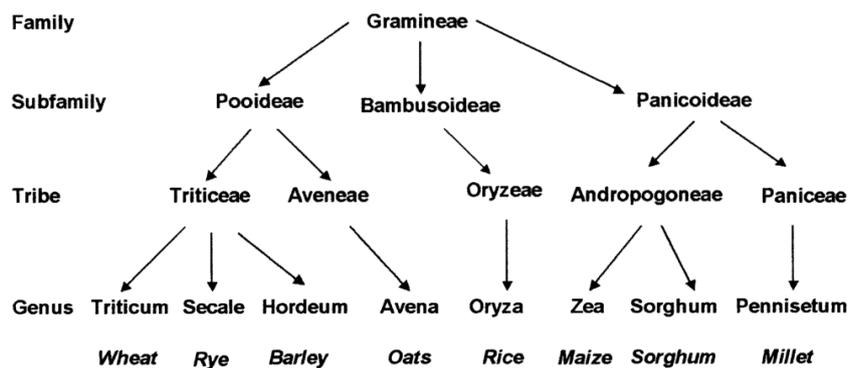
#### *1.1.4.1.1 Die Rolle des Glutens*

Seit den 50er-Jahren des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass Gluten als Trigger der Zöliakie wirkt. Meist wird der Begriff „*Gluten*“ (lat. „*Leim*“) für die toxischen Proteine von Weizen, Roggen und Gerste verwendet, genau genommen bezeichnet er aber nur die des Weizens.

Gluten, umgangssprachlich auch „*Klebereiweiß*“ genannt, ist für die Wasserbindung sowie die Elastizität und Viskosität von Weizenteig essentiell und verleiht ihm seine klassische Textur (26, 27). Es bezeichnet ein Proteingemisch aus verschiedenen Peptiden mit teilweise sehr unterschiedlichen Eigenschaften. Diese Proteine können auf der Basis ihrer Löslichkeit in 70%-igem Ethanol in die Gruppen der alkohollöslichen Prolamine und der nicht-alkohollöslichen Glutenine unterteilt werden.

Prolamine liegen meist als Monomere mit einem Molekulargewicht von 28-35 kD vor und zeichnen sich durch repetitive Sequenzen bestehend aus den Aminosäuren Glutamin und Prolin aus (Abb. 1-2). Sie können anhand ihrer Primärstruktur in die Gruppen  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ -, und  $\omega$ -Gliadine eingeteilt werden (28).





**Abb. 1-3: Taxonomie verschiedener Getreidearten.**

Zu sehen ist die Familie der Gramineae, von der sich die Getreide Weizen, Roggen und Gerste, aus dem Stamm der Triticeae ableiten. Hafer gehört zwar der gleichen Subfamilie an, entspringt jedoch dem Stamm der Aveneae. Andere Getreide wie Reis und Mais sind nicht eng mit den zöliakieassoziierten Getreidesorten verwandt. Quelle: (33).

Inwieweit Hafer, welcher zu den glutenhaltigen Getreidesorten gehört, einen schädigenden Einfluss im Rahmen der Zöliakie besitzt, ist Gegenstand laufender Diskussionen (32, 34–36). Laut der aktuellen Leitlinie der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) kann unter ärztlicher Verlaufskontrolle eine glutenfreie Diät durch nichtkontaminierten Hafer ergänzt werden, wenn unter dem Verzehr keine Beschwerden auftreten (37). Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass viele Studien zu diesem Thema mit geringen Probandenzahlen und über einen eingeschränkten Zeitraum durchgeführt wurden. Weiterhin schieden in einigen Arbeiten viele Patienten aufgrund von gastrointestinalen Symptomen aus. Eine, wenn auch geringe Toxizität, des Hafers scheint somit zu bestehen, zumal gezeigt werden konnte, dass bestimmte Sequenzen des Avenins von T-Zellen zöliakiekranker Patienten erkannt werden (38).

Die Frage, warum Gliadinpeptide für Zöliakiepatienten toxisch sind, lässt sich beantworten, wenn man ihre Primärstruktur betrachtet. Auffallend ist ein besonders hoher Anteil der beiden Aminosäuren Prolin (17%) und Glutamin (37%) (39). Die Verdauungsenzyme des Magens und des Pankreas besitzen ein nur unzureichendes Potential, prolinreiche Domänen von Peptiden zu verdauen (40, 41). Dies ist verantwortlich für die große Stabilität der toxischen Sequenzen und ermöglicht ihnen so die Aufnahme durch Enterozyten, über die sie Anschluss an das Immunsystem erhalten. Darüber hinaus besitzt die Position von Prolin

innerhalb der Gliadinpeptide enormen Einfluss auf die spezifische Deamidierung einzelner Glutaminreste durch die TG2 (Abb. 1-2) (32).

Glutamin hingegen spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Gliadinpeptide mit der TG2, dem Autoantigen der Zöliakie. Die Transglutaminase ist ein sehr spezifisches Enzym, sodass nur an bestimmten Positionen Glutamin (Q) zu Glutamat (E) deamidiert wird (32). An diesen Stellen entsteht durch die Reaktion eine negative Ladung, welche die Affinität zwischen Gliadinpeptiden und HLA-DQ-Rezeptoren der Immunzellen erhöht (Abb. 1-2 D)(42–44).

#### *1.1.4.1.2 Weitere Umweltfaktoren*

Neben Gluten werden noch viele weitere Umweltfaktoren im Rahmen der Zöliakie diskutiert. So werden dem Stillen während der Einführung von Gluten sowie der Fütterung mit anfänglich geringen Mengen an Getreideprodukten protektive Effekte zugeschrieben (45). Allerdings konnten *Vriezinga et al.* in einer multizentrischen, randomisierten und kontrollierten Interventionsstudie keinen protektiven Effekt der schrittweisen Einführung von Gluten nachweisen (46). Fachgesellschaften empfehlen daher weiterhin, Gluten zwischen dem fünften bis siebten Lebensmonat in das Nahrungsangebot unter Fortführen des Stillens aufzunehmen (47–49).

Neben diesen Aspekten rückt aktuell die intestinale Mikrobiota immer mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms nicht nur durch die Ernährung, sondern auch durch den Genotyp HLA-DQ2 beeinflusst wird (50, 51). Allgemein scheinen Aktinobakterien und Bifidobakterien in Zusammenhang mit der Zöliakie protektiv zu sein, während Proteobakterien wie beispielsweise *Escherichia Coli* ein negativer Effekt zugesprochen wird (52–54)

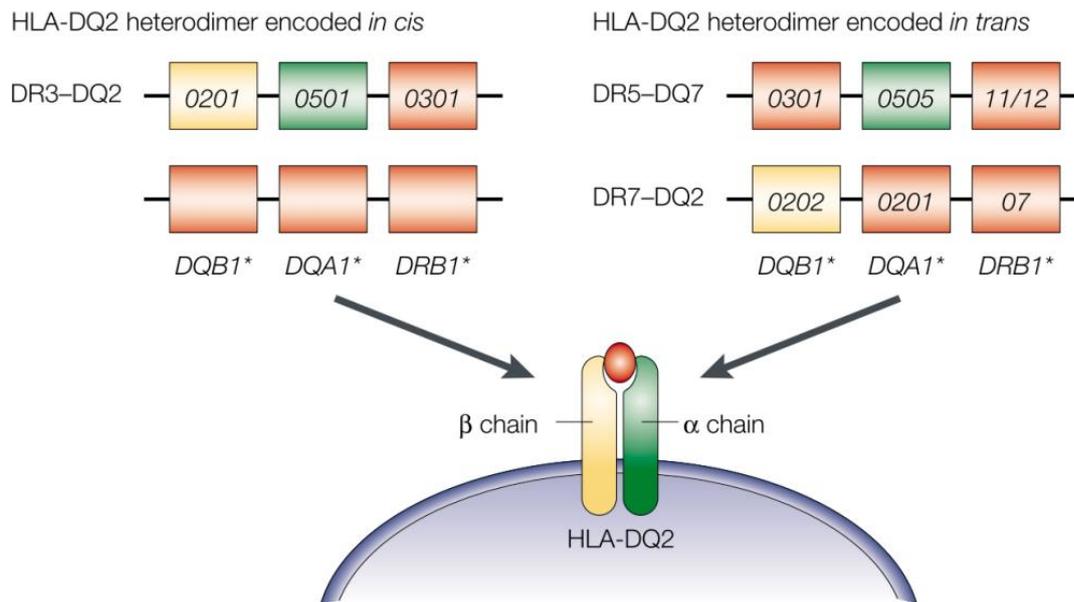
Weitere Umweltfaktoren, die durch eine Beeinflussung der Mikrobiota pathogenetisch relevant sein könnten sind intestinale Infektionen, der Geburtsmodus (Spontangeburt oder Kaiserschnitt) sowie frühkindliche Antibiotikatherapien (55–58).

### 1.1.4.2 Endogene Faktoren

#### *1.1.4.2.1 Genetische Prädisposition*

Seit Langem sind im Zusammenhang mit der Zöliakie die Gene auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21) bekannt, welche für die prädisponierenden HLA-Klasse-II Moleküle DQ2 und DQ8 kodieren. Diese nehmen eine wichtige Funktion im Rahmen der Präsentation exogener Antigene durch APZ (antigenpräsentierende Zellen) ein. Rund 95% aller Zöliakiepatienten besitzen das HLA-DQ2-Molekül, die Verbleibenden weisen das HLA-DQ8-Molekül auf. Allerdings können diese Marker auch bei etwa 25-30% der gesunden Bevölkerung detektiert werden und führen somit nicht zwangsläufig zur Erkrankung (25).

Strukturell bestehen die HLA-Klasse-II-Moleküle aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Beim HLA-DQ2-Molekül wird die  $\alpha$ -Kette durch DQA1\*05 und die  $\beta$ -Kette durch DQB1\*02 kodiert. Genau genommen handelt es sich hierbei um die Isoform HLA-DQ2.5. Da diese jedoch den Hauptteil der unterschiedlichen Isoformen ausmacht, wird im Folgenden zur Vereinfachung nur von HLA-DQ2 gesprochen. Bei den meisten Zöliakiepatienten liegt ein DR3-DQ2 Haplotyp vor (DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201), die Minderheit trägt eine Kombination aus DR5-DQ7 und DR7-DQ2 (DRB1\*11/12-DQA1\*0505-DQB1\*0301 und DRB1\*07-DQA1\*0201-DQB1\*0202) und ist damit heterozygot (22, 59, 60). Das funktionelle HLA-DQ2-Molekül kann aus unterschiedlichen Genkombinationen resultieren. Der DR3-DQ2-Haplotyp zeichnet sich durch eine *cis*-Stellung, der DR5-DQ7/DR7-DQ2-Typ durch eine *trans*-Stellung aus (Abb. 1-4). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette der beiden verschiedenen Heterodimere weichen lediglich in einer Aminosäure voneinander ab, sodass kein funktioneller Unterschied zwischen ihnen besteht (29). Das Risiko, an Zöliakie zu erkranken, ist bei homozygoten DR3-DQ2-Trägern größer als bei heterozygoten DR5-DR7/DR7-DQ2-Trägern, die klinische Manifestation differiert jedoch nicht (33).



**Abb. 1-4: Kodierung des HLA-DQ2  $\alpha/\beta$ -Heterodimer in *cis*-, und *trans*-Stellung.**

Beim homozygoten DR3-DQ2-Haplotyp liegt das  $\alpha/\beta$ -Heterodimer in *cis*-Stellung auf einem einzelnen Chromosom vor. Der heterozygote DR5-DR7/DR7-DQ2-Haplotyp zeichnet sich durch eine *trans*-Stellung aus, das heißt, dass die Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette auf zwei verschiedenen Chromosomen liegen. Quelle: (29).

Das HLA-DQ8-Molekül besteht aus einem DR4-DQ8-Haplotyp, der durch DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302 kodiert wird (61). Sehr selten gibt es Patienten, die weder HLA-DQ2- noch HLA-DQ8-positiv sind. Diese Personen weisen jedoch meist eine einzelne  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette des HLA-DQ2-Moleküls auf (62).

Insgesamt stellen die HLA-DQ2/8-Moleküle die derzeit wichtigste genetische Determinante der Zöliakie dar, allerdings sind die kodierenden Gene nur für weniger als die Hälfte der erblichen Disposition verantwortlich (63).

Weitere Einflussfaktoren sind sogenannte non-HLA-Gene, die weit weniger gut erforscht sind. Als Beispiel sei das Gen CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) genannt, welches sich auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q33) befindet und für ein Oberflächenmolekül auf T-Lymphozyten kodiert (64). Weitere Gensequenzen, die mit der Zöliakie in Verbindung gebracht werden, befinden sich auf den Chromosomen 5 (5q31-33) und 11 (11q), ersteres ist dabei mit verschiedensten Autoimmunerkrankungen assoziiert und stellt ein sogenanntes „genetisches hotbed“ dar (65, 66). Der Einfluss einzelner

non-HLA-Gene scheint gering zu sein, wahrscheinlich übt erst die Summe vieler dieser Erbanlagen einen Einfluss auf die Pathogenese der Zöliakie aus.

#### 1.1.4.2.2 Die Gewebstransglutaminase

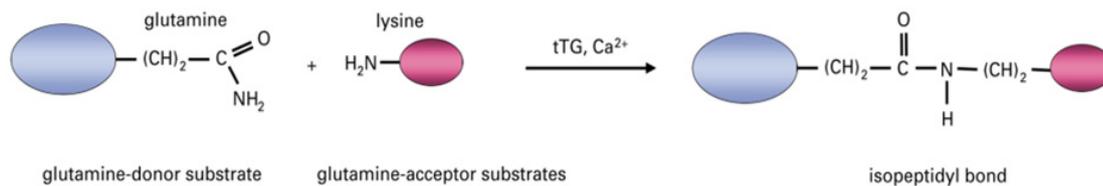
Ein Meilenstein in der Erforschung der Zöliakie war die Entdeckung der Gewebstransglutaminase (EC 2.3.2.13, auch „tissue transglutaminase“ (tTg), oder Gewebstransglutaminase 2 (TG2) genannt) als zentrales Autoantigen dieser Erkrankung (14).

Insgesamt kodiert das menschliche Genom für acht verschiedene Transglutaminasen (unter anderem Gerinnungsfaktor XIII), die vor allem im Rahmen der Wundheilung, Gerinnung, Zelladhäsion und Apoptose eine wichtige Rolle einnehmen (28). Bei diesen Enzymen handelt es sich um Calcium-abhängige Katalysatoren, die meist in einer inaktiven Form im Zytosol vorliegen, jedoch bei Gewebsschädigung freigesetzt werden. Im Extrazellularraum werden sie durch die dortigen hohen Calciumspiegel aktiviert und gewährleisten als „*biologischer Kleber*“ die Integrität des Gewebes (67, 68).

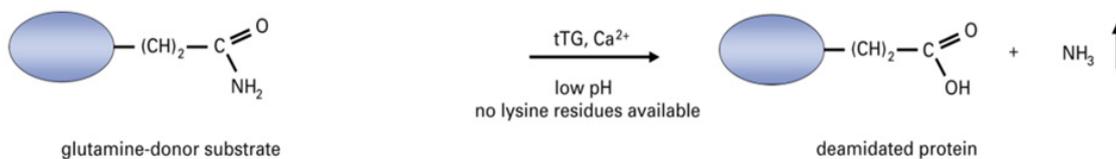
Die rund 80 kD schwere TG2 katalysiert zwei unterschiedliche Reaktionen, die in der Pathogenese der Zöliakie eine fundamentale Rolle einnehmen. Hierbei stellen die verschiedenen Gliadinpeptide aufgrund ihrer Primärstruktur geeignete Substrate dar (siehe 1.1.4.1.1).

Zum einen ist dies die Deamidierung von Glutamin zu Glutamat, zum anderen die Transamidierung (auch Cross-Linking genannt), also Peptidvernetzung unter Bildung einer  $\epsilon$ -(- $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptid-Bindung. Während Glutamin bei beiden Reaktionen den Acyl-Donor darstellt, dienen bei der Deamidierung Wasser und bei der Transamidierung diverse Proteine als Akzeptoren (Abb. 1-5).

## A: Creation of protein cross-links in the presence of glutamine-acceptor substrates



## B: Deamidation of proteins in the absence of available glutamine-acceptor substrates or at low pH

**Abb. 1-5: Proteinmodifikation durch TG2.**

(A) Calcium-abhängiges Cross-Linking zweier Proteine. Hierbei entsteht eine kovalente Isopeptid-Bindung (G-L-Bindung). (B) In Abwesenheit geeigneter Acyl-Akzeptoren oder bei niedrigem pH-Wert findet eine Deamidierung unter Freisetzung von Ammoniak statt. Abbildung adaptiert nach: (28).

Das Verhältnis zwischen beiden Reaktionen wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. So findet bei Vorliegen vieler primärer Amine eher eine Transamidierung statt, während ein niedriger pH-Wert die Deamidierung von Glutamin-Resten begünstigt (69). Hierbei zeigt sich die TG2 vor allem in der Wahl der Acyl-Donoren als äußerst spezifisch. Die Selektion bestimmter Glutamine wird unter anderem durch den Abstand zu Prolin in der Primärstruktur der Proteine beeinflusst (32, 70). Als Acyl-Akzeptoren kommen hingegen sehr viele unterschiedliche Peptide in Frage, sodass mittels Transamidierung zahlreiche verschiedene Proteinkomplexe entstehen können.

Durch die Deamidierung bestimmter Glutamin-Reste der Gliadinpeptide erhalten diese eine negative Ladung, wodurch ihre Affinität zu HLA-DQ2-Rezeptoren antigenpräsentierender Zellen massiv erhöht wird (31, 42, 71).

Durch die Transamidierung kann eine große Palette an Proteinen, seien es aus der Nahrung stammende oder körpereigene, an immunogene Gliadinpeptide gebunden werden. Da die immunstimulierenden Epitope des Gliadins in repetitiver Form auftreten, besteht die Mög-

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

lichkeit, dass Gliadinpeptide gleichzeitig deamidiert (und damit aktiviert) sowie transamidiert werden, sodass eine Verbindung aus immunogenem Peptid und gekoppeltem Protein entsteht (69). Dabei kann auch die TG2 selbst als Acyl-Akzeptor dienen, woraus ein Komplex aus Gliadin und Gewebstransglutaminase hervorgeht (72). Das Cross-Linking durch Transamidierung wird daher sowohl für das „*epitope-spreading*“ mit folgender Generalisierung der Immunantwort, als auch für die Bildung spezifischer Autoantikörper gegen die TG2 verantwortlich gemacht (14, 69, 73, 74).

#### 1.1.4.3 Aktuelles pathogenetisches Verständnis

Gluten wird im Darmlumen durch unterschiedliche Enzyme gespalten. Aufgrund des hohen Prolinanteils und der fehlenden post-Prolin-Spaltungsaktivität der menschlichen Peptidasen erfolgt dieser Verdau allerdings unzulänglich und die immunogenen und toxischen Peptide bleiben bestehen (40).

Um immunologisch wirksam zu werden, erfordert es jedoch eine Passage der Darmschleimhaut. Diese erfolgt vorwiegend transzellulär, allerdings auch in Teilen parazellulär (75–77). Normalerweise verhindern die sogenannten *tight junctions* den parazellulären Übertritt von großen Molekülen, allerdings scheinen Gliadinpeptide die intestinale Permeabilität zu erhöhen, indem sie das Zytoskelett verändern (75, 78).

Nach erfolgreichem Durchdringen der Schleimhautbarriere können Gliadinpeptide durch TG2 deamidiert werden. Die Modifikation der neutralen Aminosäure Glutamin zur negativ geladenen Aminosäure Glutamat verstärkt die Affinität der Peptide zu HLA-DQ-Rezeptoren der APZ der Submukosa (43). Diese wiederum präsentieren die Peptide daraufhin spezifisch restringierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen vom TH1-Typ (79). Neben den klassischen APZ, werden auch Enterozyten als nicht-klassische antigenpräsentierende Zellen diskutiert (siehe 1.4) (80). Am Ende dieser Kaskade steht die Produktion proinflammatorischer Zytokine, allen voran Interferon- $\gamma$ , die mit einer typischen TH1-Zellantwort einhergehen (28, 81). Wie genau die T-Zellen der *Lamina propria* zur Entstehung der Schleimhautschädigung beitragen, ist noch nicht endgültig verstanden, es wird jedoch ein direkter zytotoxischer Effekt des Interferon- $\gamma$  vermutet (82).

Neben der beschriebenen adaptiven Immunantwort sind in den vergangenen Jahren immer mehr auch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems in den Fokus gerückt. Als

Leit-Zytokin fungiert hierbei Interleukin-15, dessen Expression bei Zöliakiepatienten erhöht ist (83, 84).

IL-15, welches unter anderem von dendritischen Zellen, aber auch von Epithelzellen produziert wird, aktiviert intraepitheliale Lymphozyten (85). Dies geschieht vornehmlich dadurch, dass die aktivierenden Rezeptoren NKG2D (Natürliche-Killerzell-Gruppe 2D) und CD94 auf IEL induziert werden. Hierdurch erhalten diese einen Phänotyp der dem von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) ähnelt (86–88). Zusätzlich wird auch die Expression der Liganden dieser Rezeptoren, MICA (MHC-class I polypeptide-related sequence A) und HLA-E, auf Enterozyten IL-15-abhängig verstärkt. Durch die Bindung der NK-Rezeptoren der IEL an ihre spezifischen Liganden auf den Epithelzellen, im Besonderen durch die NKG2D-MICA-Interaktion, werden die IEL aktiviert und können Enterozyten lysieren, ohne dass hierzu ein weiteres kostimulatorisches Signal benötigt wird (89). Dieser Mechanismus scheint zumindest teilweise für die Schleimhautschädigung im Rahmen der Zöliakie verantwortlich zu sein.

IEL unterteilen sich in zwei Gruppen: CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche die  $\alpha/\beta$ -Isoform des TZR (T-Zell-Rezeptor) exprimieren und als Effektorzellen dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind, sowie T-Zellen, welche die  $\gamma/\delta$ -Isoform exprimieren und dem adaptiven Immunsystem angehören (61). Charakteristischerweise sind die IEL bei Zöliakiepatienten erhöht, was auch als diagnostisches Kriterium herangezogen wird (siehe 1.1.6). Die Zerstörung der Enterozyten vermitteln IEL über zwei unterschiedliche Mechanismen: Zum einen über die zytolytischen Moleküle Perforin und Granzym B, zum anderen über den Fas-Rezeptor-Liganden, welcher die Apoptose der Zielzellen induziert (90).

### **1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild und assoziierte Erkrankungen**

Die glutensensitive Enteropathie weist eine große Palette an assoziierten Symptomen auf und trägt nicht zu Unrecht den Beinamen „Chamäleon der Gastroenterologie“. Typische Beschwerden, die im Rahmen einer enteropathischen Malabsorption entstehen, zeigen sich oft bei der klassischen Form. Diese wird meist bei Säuglingen um den sechsten Lebensmonat im Rahmen der Einführung von Weizen in das Nahrungsangebot beobachtet, kann aber auch nach einer Latenzzeit von Monaten bis Jahren symptomatisch werden (91). Im Gegensatz dazu bestehen bei älteren Kindern und Erwachsenen vorwiegend unterschwellige

Symptome und die Krankheit wird oftmals erst als Reizdarmsyndrom fehldiagnostiziert (7, 92).

Die klassische Symptomatik umfasst hauptsächlich Beschwerden, die durch die Schädigung der Darmmukosa auftreten. Führend ist hierbei die chronische Steatorrhoe (Fettstuhl), welche häufig mit einer Malabsorption einhergeht. Weitere Symptome können unter anderem anhaltende Bauchschmerzen, Gedeihstörung und ein geblähter Bauch sein. Außerdem lässt sich bei der klinischen Untersuchung oft Muskelhypotonie und Irritabilität feststellen (6).

Bei den extraintestinalen Manifestationen, welche vorwiegend bei jugendlichen und erwachsenen Patienten auftreten, besteht eine enorme Vielfalt (Tab. 1-2). Eines der häufigsten Symptome stellt die Eisenmangelanämie dar, welche in diesem Fall die Besonderheit aufweist, dass sie meist nicht auf eine Therapie mit oraler Eisenzufuhr anspricht (93, 94). Neben anderen, durch Malabsorption bedingten Symptomen wie verminderte Körperhöhe und retardiertes Knochenalter, gibt es auch extraintestinale Manifestationen ungeklärter Ätiologie, beispielsweise verzögerter Eintritt in die Pubertät, Fertilitätsstörungen sowie erhöhte Abortraten (95–97). Auch neurologische Störungen wie Epilepsien, intrazerebrale Verkalkungen, Ataxie, Kopfschmerzen und Lernstörungen einschließlich ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung) können im Rahmen der Zöliakie beobachtet werden (98, 99). Die meisten dieser Störungen sprechen teilweise auf eine glutenfreie Diät an und die genauen Zusammenhänge zwischen neurologischen Manifestationen und der glutensensitiven Enteropathie sind ungeklärt.

Zuletzt ist als charakteristische dermale Manifestation die Dermatitis herpetiformis Dühring zu nennen, welche sich durch gruppiert stehende, juckende Bläschen auf erythematösem Grund auszeichnet. Zumeist treten diese Hautveränderungen an Ellenbogen, Knien und Gesäß auf und sind zu fast 100% mit Zöliakie assoziiert (100, 101).

**Tab. 1-2: Klassische und nicht-klassische Symptomatik der Zöliakie.**

Auflistung klassischer und nicht-klassischer Symptome die im Rahmen der Zöliakie auftreten können. Hierbei kann der Grad der Ausprägung stark variieren. Quelle: Eigene Darstellung nach (24, 100).

Klassische Symptomatik	Nicht-klassische Symptomatik
Chronische Fettstühle	Refraktäre Eisenmangelanämie
Chronische Bauchschmerzen	Retardiertes Knochenwachstum
Gedeihstörung	Verzögerte Pubertät
Geblähtes Abdomen	Dermatitis Herpetiformis
	Zahnschmelzdefekte
	Ataxie
	Intrazerebrale Verkalkungen

Es gibt eine große Anzahl an Risikogruppen, welche eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit bezüglich der Zöliakie aufweisen und aus diesem Grund auch bei asymptomatischen Personen eine diagnostische Abklärung der Zöliakie notwendig machen (Tab. 1-3). Zu diesen Risikogruppen zählen Personen, die an Autoimmunerkrankungen, allen voran Diabetes Mellitus Typ I (DM I) leiden, aber auch erstgradig Verwandte von Zöliakiepatienten haben ein deutlich erhöhtes Risiko zu erkranken (100, 102, 103). Häufig ist auch das Auftreten von glutensensitiver Enteropathie und selektivem IgA-Mangel, sowie autoimmuner Thyreoiditis und Hepatitis (1, 104, 105). Auch genetische Syndrome, wie das Turner- oder Williams-Beuren-Syndrom sind mit der Zöliakie assoziiert (106). Eine besondere Stellung nimmt dabei die Trisomie 21 ein, da bei Personen mit Down-Syndrom eine Krankheitsprävalenz von etwa 5% festgestellt werden konnte, wobei bemerkenswerterweise die Mehrheit der Betroffenen die symptomatische Form der Zöliakie aufwies (107, 108).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

### 1.1.6 Diagnostik

Die Diagnostik der Zöliakie basiert auf mehreren Pfeilern. Als Leitfaden gelten hierbei die Kriterien der ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition), welche im Jahr 2012 aufgrund zahlreicher neuer Erkenntnisse über die Krankheit revidiert wurden.

Die Basis der Diagnostik bilden hierbei:

1. Klinische Untersuchung
2. Serologie
3. Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) einschließlich Histologie
4. Genetik
5. Klinische und serologische Remission unter GFD

Die Diagnose Zöliakie kann gestellt werden, sofern drei von vier Befunden zöliakietypische Ergebnisse liefern (1).

Entscheidend für die serologische wie auch endoskopische Diagnostik ist, dass sich der Patient nicht glutenfrei ernährt, da sonst die Immunantwort abflaut und Antikörper sowie Gewebsschäden an der Darmschleimhaut nur schwer nachweisbar sind. Für den Fall, dass der Patient diese Diät durchführt wird die zeitlich begrenzte Umstellung auf glutenhaltige Nahrung empfohlen um eine zuverlässige Diagnostik zu gewährleisten (37).

Patientengruppen, die wegen ihrer klinischen Symptomatik oder aufgrund der Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe diagnostisch abgeklärt werden sollten, sind in Tabelle 1-3 aufgeführt.

**Tab. 1-3: Patienten die eine Zöliakiediagnostik durchlaufen sollten.**

Quelle: Eigene Darstellung nach (37, 100).

<b>Patienten mit folgenden Symptomen, für die keine Ursache gefunden werden konnte</b>	<b>Asymptomatische Patienten mit folgenden Risikofaktoren</b>
<b>Intestinale Symptome:</b> Chronische Diarrhoe, chronische Verstopfung, Übelkeit und Erbrechen, chronische Bauchschmerzen	Erstgradig verwandte von Zöliakiepatienten, Diabetes Mellitus Typ I, Autoimmunthyreoiditis, Selektiver IgA-Mangel, Trisomie 21, Turner-Syndrom, Williams-Beuren-Syndrom
<b>Extraintestinale Symptome:</b> Gedeihstörung, verzögerter Pubertätseintritt, Amenorrhoe, refraktäre Eisenmangelanämie chronische Fatigue, kryptogene Transaminasenerhöhung, Dermatitis-herpetiformis, Osteopenie/Osteoporose, rezidivierende orale Aphthen	

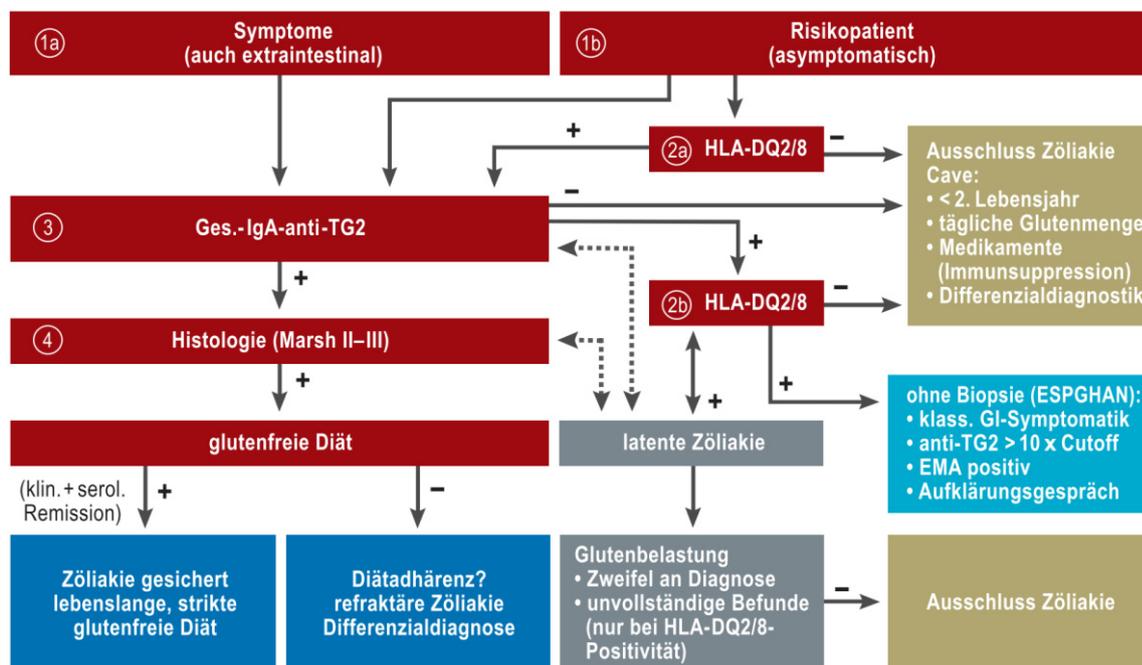
Primärer Schritt der Diagnostik symptomatischer Patienten ist die Serologie, die als wenig invasive Methode bereits erste Erkenntnisse liefern kann. Empfohlen wird die Untersuchung von IgA-Antikörpern gegen Gewebstransglutaminase (TG2-IgA-AK), welche mittels ELISA detektiert werden und eine Sensitivität und Spezifität von über 90% aufweisen. IgA-Antikörper gegen Endomysium (EmA-IgA-AK), welche durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht werden, stellen den Referenzstandard der Antikörperdiagnostik dar, da sie die höchsten Werte bei Sensitivität (>90%) und Spezifität (98%) aufweisen (37, 109). Allerdings ist die Auswertung vom Untersucher abhängig und das Verfahren aufwendig und kostenintensiv.

Im Falle einer positiven Serologie wird die Diagnose mittels duodener Biopsieentnahme weiter gesichert. Bei unauffälligen TG2-IgA-AK kann eine Erkrankung weitestgehend ausgeschlossen werden (Abb. 1-6).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Bei Vorliegen eines selektiven IgA-Mangels, einer häufigen Komorbidität von Zöliakiepatienten, können zuvor genannte Tests falsch negativ ausfallen. Deshalb wird in solchen Fällen auf die Verwendung von TG2-IgG-AK, dGP (deamidierte Gliadinpeptide)-IgG-AK oder EmA-IgG-AK zurückgegriffen (1).

Die diagnostische Evaluation asymptomatischer Patienten kann primär mit einer HLA-Typisierung beginnen. Diese Untersuchung zeichnet sich durch einen hohen negativen prädiktiven Wert aus, das heißt ein negatives Ergebnis für HLA-DQ2 und HLA-DQ8 schließt eine Zöliakie zu beinahe 100% aus. Bei einem positiven Ergebnis sollte im Anschluss die Untersuchung zöliakiespezifischer Antikörper erfolgen (Abb. 1-6).



**Abb.: 1-6: Algorithmus zur Diagnostik der Zöliakie.**

Bestätigungskriterien der Zöliakie in rot, Ausschlusskriterien in braun dargestellt. Revidierte ESPGHAN-Kriterien zur Diagnosestellung ohne Biopsie in hellblau. Bei latenter Zöliakie empfiehlt sich die genetische Untersuchung auf die Marker HLA-DQ2/8 sowie Serologie und Histologie unter glutenhaltiger Diät. Quelle: (110).

Die Endoskopie stellt einen weiteren wichtigen Bestandteil der Diagnostik dar, bei dem nicht nur die Möglichkeit besteht, die Mukosa makroskopisch zu begutachten, sondern auch Schleimhautproben zu entnehmen, die histologisch beurteilt werden können. Entscheidender Faktor ist die Entnahme von mindestens 4 Biopsien aus unterschiedlichen Stellen des Zwölffingerdarms, wobei obligat eine Probe aus dem *bulbus duodeni* entnommen

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

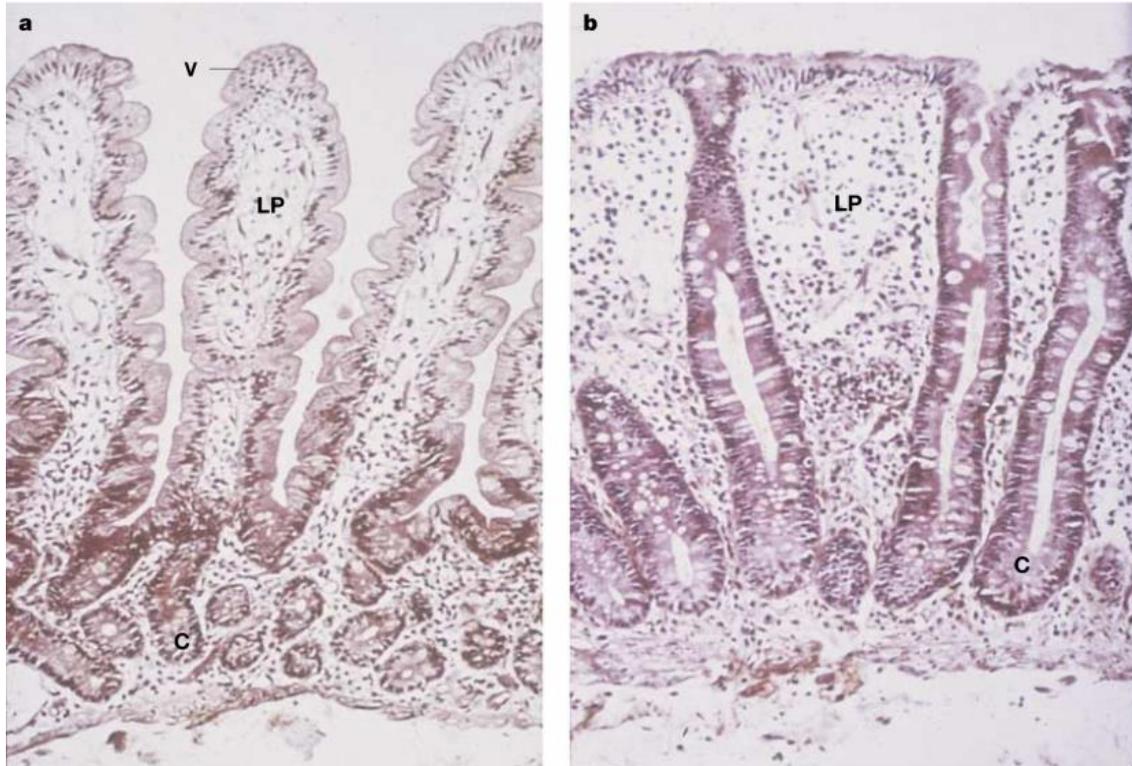
werden muss (111). Nicht nur die Zöliakie, sondern auch viele weitere entzündliche Darmerkrankungen zeigen ein diskontinuierliches Auftreten, sodass unauffällige Abschnitte und stark entzündlich veränderte Regionen benachbart sind. Letztere, sogenannte „*patchy lesions*“, machen es nötig, dass mehrere Biopsien von unterschiedlichen Stellen entnommen werden, um die Sensitivität dieser invasiven diagnostischen Maßnahme zu erhöhen. Histologisch stellt sich im Falle der Zöliakie eine pathologische Trias bestehend aus Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) dar (Abb. 1-7), welche nach der modifizierten Marsh-Oberhuber-Klassifikation eingeteilt wird (Tab. 1-4) (112–114).

**Tab.1-4: Stadieneinteilung des Epithelschadens nach modifizierter Marsh-Oberhuber-Klassifikation.**

\*Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten pro 100 Enterozyten. Quelle: Eigene Darstellung nach (111, 113, 114).

<b>Stadium</b>	<b>Marsh 0</b>	<b>Marsh I (infiltrativ)</b>	<b>Marsh II (hyperplastisch)</b>	<b>Marsh III (destruktiv)</b>
IEL*	<25	>25	>25	>25
Krypten	Normal	Normal	Hyperplasie	Hyperplasie
Zotten	Normal	Normal	Normal	Atrophie a) partiell b) subtotal c) total

Diese Merkmale sind zwar typisch für die Zöliakie, können jedoch auch bei Enteropathien anderer Genese auftreten und sind somit keineswegs pathognomonisch für diese Erkrankung (113).



**Abb. 1-7: Histologische Befunde der Zöliakie.**

Zu sehen sind ein Normalbefund (a) und ein zöliakietyperischer Befund (b) der Dünndarmschleimhaut. Auffallend im rechten Bild sind die fehlenden Zotten, die Hyperplasie der Krypten und die Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten. (V = Zotte, C = Krypte, LP = Lamina propria). Quelle: (29).

Aufgrund dieser recht unspezifischen Merkmale muss bei der histopathologischen Untersuchung der Duodenalschleimhaut stets eine große Anzahl an unterschiedlichen Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden (100, 113, 115). Im Folgenden sind einige hiervon aufgeführt:

- Giardiasis
- Tropische Sprue
- Autoimmunenteropathie
- Nahrungsmittelallergie
- Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
- Infektiöse Enteritiden und postenteritisches Syndrom
- AIDS
- Intestinales T-Zell Lymphom

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Obwohl die mikroskopische Untersuchung der Darmschleimhaut als ein entscheidendes Kriterium der Diagnostik gilt, wird sie im Rahmen der neu definierten ESPGHAN-Kriterien in manchen Fällen nicht mehr als obligat angesehen (1). Da bei sehr hohen TG2-IgA-AK-Titern mit großer Wahrscheinlichkeit von einer schweren Schädigung der Mukosa ausgegangen werden kann, ist die Endoskopie bei einer 10-fachen Erhöhung des TG2-IgA-AK-Spiegels nicht mehr zwingend notwendig. In diesem Fall muss die Diagnose jedoch durch eine unabhängige Testung auf EmA-IgA-AK und eine HLA-Untersuchung bestätigt werden (1). Bei asymptomatischen Patienten stellt die histopathologische Untersuchung der Dünndarmschleimhaut allerdings einen unumgänglichen Bestandteil der Diagnostik dar.

## 1.1.7 Therapie

### 1.1.7.1 Die glutenfreie Diät

Die Zöliakie gilt derzeit als unheilbar und die einzig verfügbare Therapie stellt die glutenfreie Ernährung dar, welche sich bei korrekter Ausführung dadurch auszeichnet, dass sie sehr wirksam und dazu nebenwirkungsfrei ist. Bei symptomatischen Patienten wird in der Mehrzahl der Fälle ein schneller Rückgang der Beschwerden innerhalb von vier Wochen beobachtet, jedoch kann die Regeneration der Darmschleimhaut mehrere Jahre in Anspruch nehmen (92, 116). Bei Kindern mit verminderter Körpergröße und retardiertem Knochenalter kommt es meist zu einem Aufholwachstum innerhalb eines Jahres, nachdem die Diät etabliert wurde (95). Daneben können durch die Therapie auch langfristige Komplikationen der Erkrankung, wie beispielsweise sekundäre Autoimmunität und zöliakieassoziierte Malignome, verhindert werden (siehe 1.1.8).

Allerdings bringt die glutenfreie Ernährung erhebliche Einschnitte im Alltagsleben der Betroffenen mit sich, da Nahrungsmittel, die Weizen inklusive aller Triticum-Arten wie Dinkel und Kamut, sowie Roggen und Gerste enthalten gemieden werden müssen (117). Den Erkrankten verbietet sich als Folge der Verzehr von herkömmlichen Teigwaren und Nudeln, aber auch viele industriell verarbeitete Lebensmittel enthalten Spuren von Gluten, welches beispielsweise als Bindemittel eingesetzt wird.

Um die Kennzeichnung glutenfreier Produkte zu standardisieren wurde die Durchführungsverordnung (EU) Nr. 828/2014 eingeführt. Diese schreibt vor, dass für Nahrungsmittel mit einem Glutengehalt von <100mg/kg die Bezeichnung „*sehr geringer Glutengehalt*“

und für solche mit einem Glutengehalt von  $<20\text{mg/kg}$  die Bezeichnung „*glutenfrei*“ verwendet werden darf (118). Wie bei anderen Diäten ist auch bei glutenfreier Ernährung auf eine ausgewogene Aufnahme von Makronährstoffen und Spurenelementen zu achten (119). In der Vergangenheit konnten diverse Nährstoffmängel, beispielsweise Vitamin B6 und B12 sowie Folsäure nachgewiesen werden. Darüber hinaus scheinen niedrige Spiegel an Magnesium, Calcium und Eisen auch bei langjähriger glutenfreier Diät zu persistieren. Dies scheint jedoch dadurch bedingt, dass viele Erkrankte nicht das gesamte Spektrum der von Natur aus glutenfreien Lebensmitteln wahrnehmen und vermehrt auf industriell gefertigte Produkte zurückgreifen. Schließlich weist die Zusammensetzung vieler konventioneller glutenfreier Produkte mit niedrigem Ballaststoffgehalt und hohem Fettanteil und glykämischem Index mitunter negative Effekte auf den Ernährungszustand von Zöliakiepatienten auf (120, 121). Dabei kann manchen Defiziten durch Verzehr alternativer Getreidesorten wie Amaranth, Buchweizen und Quinoa entgegen gewirkt werden, wobei diese eine andere Nährstoffzusammensetzung aufweisen als die bei der GFD fehlenden Getreide (122, 123).

Trotz allem stellt die glutenfreie Ernährung eine große Herausforderung dar und die Therapieadhärenz ist vor allem bei jugendlichen und asymptomatischen Patienten oft ungenügend, da diese ihre Lebensqualität durch die Diät massiv eingeschränkt sehen und in der Folge oft zu industriell gefertigten glutenfreien Lebensmitteln greifen (91, 119, 124).

#### 1.1.7.2 Alternative Therapieansätze

Aus den oben genannten Gründen gibt es schon lange das Bestreben, die glutenfreie Diät als einzig wirksame Therapieform zu ergänzen oder gar zu ersetzen.

Ein Ansatz ist hierbei Gliadin durch proteolytische Degradierung der immunogenen prolinreichen Sequenzen durch das bakterielle Enzym Prolylendopeptidase (PEP) unschädlich zu machen (125). Auch wenn *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Gliadinpeptide durch PEP gespalten werden können, so brauchte man hierfür hohe Dosen des Enzyms sowie lange Inkubationszeiten. Weiterhin ist eine Toxizität der entstehenden Peptidfragmente nicht ausgeschlossen (41).

Andere Konzepte basieren auf der Modifikation der HLA-DQ-spezifischen Epitope des Gliadins durch die kationischen Aminosäuren Lysin und Arginin oder der Antagonisierung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-15 (42, 84, 84).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Weiteres Interesse gilt der Induktion der oralen Toleranz gegenüber Gliadin durch Modulation seiner intrazellulären Transportprozesse. Erfolgversprechend zeigten sich hierbei Versuche mit Cholera-toxin-B, sowie Zöliakieserum (126, 127). Diese Moleküle können durch Komplexierung spezieller Gliadinpeptide ihren Transport in HLA-II-enthaltende späte Endosomen von Enterozyten fördern (128). Der Theorie nach vermitteln diese Zellorganelle die Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle und fördern hierdurch das Entstehen der Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen (129).

Nichtsdestotrotz stellen diese alternativen Therapiekonzepte lediglich experimentelle Ansätze dar. In Zukunft muss gezeigt werden, ob es eine Therapieoption gibt, die sich mit der verlässlichen und nebenwirkungsarmen glutenfreien Diät messen lassen kann.

### **1.1.8 Langfristige Folgen und Komplikationen**

Nicht diagnostizierte oder diätetisch behandelte Zöliakiepatienten weisen aufgrund von zahlreichen assoziierten Erkrankungen und Komplikationen eine zwei-, bis vierfache Erhöhung der Sterblichkeit auf (16, 130).

Dabei scheint eine frühe Diagnosestellung und somit kürzere Dauer der Glutenexposition mit einer geringeren Rate an komorbiden Autoimmunerkrankungen und zöliakieassoziierten Malignomen einherzugehen (3, 131).

Neuere, populationsbasierte Studien weisen allgemein ein allenfalls gering erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen bei Zöliakiepatienten nach (131, 132). Ausnahmen hiervon bilden jedoch Lymphome, allen voran das Enteropathie-assoziierte T-Zell Lymphome (EATL), deren Inzidenz bei Zöliakiepatienten bis zu 6-fach höher im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist (131). Studien deuten jedoch daraufhin, dass das Risiko für Malignome durch eine adäquate GFD auf das Niveau der Normalbevölkerung gesenkt werden kann (131, 133, 134).

Eine wichtige Komplikation der Erkrankung ist die refraktäre Zöliakie, welche etwa 1-2% der Patienten betrifft und sich durch persistierende Symptome und Zottenatrophie trotz mindestens zweijähriger glutenfreier Diät unter Ausschluss eines Lymphoms und anderer Ursachen auszeichnet (37, 135). Die refraktäre Zöliakie kann anhand der Abwesenheit (Typ 1) beziehungsweise Anwesenheit (Typ 2) monoklonaler T-Lymphozyten in der Darmschleimhaut unterteilt werden. Die Prognose der beiden Formen unterscheidet sich drastisch. Der häufigere Typ 1 bringt meist kaum eine Einschränkung der Lebenserwartung

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

mit sich, wohingegen bei Typ 2 eine 5-Jahresmortalität von circa 50% beschrieben wird, unter anderem aufgrund der Tatsache, dass diese Form häufig in ein EATL übergeht (136). Die Therapie beider Erkrankungen basiert auf dem Einsatz systemischer Steroide oder anderer immunsuppressiver Medikamente wie Azathioprin und TNF- $\alpha$ -Antagonisten und wird überwiegend in spezialisierten Zentren durchgeführt (135).

## 1.2 Mikrobielle Transglutaminase

Die mikrobielle Transglutaminase (EC 2.3.2.13, mTG) gehört wie die menschliche Gewebstransglutaminase der Enzymklasse der Transferasen an. Es handelt sich um ein rund 38 kD großes Protein, welches erstmals von *Ando et al.* im Kulturmedium von *Streptovercillium sp. S-8112*, einer Variante von *Streptovercillium mobaraense* (heute *Streptomyces mobaraensis*, *S. mobaraensis*), nachgewiesen wurde (137).

Die Struktur der mikrobiellen Transglutaminase von *S. mobaraensis* wurde in den letzten Jahrzehnten genau erforscht. In seiner Aminosäuresequenz zeigt dieses Enzym keine signifikanten Übereinstimmungen mit Transglutaminasen von Säugetieren und auch in seiner dreidimensionalen Struktur bestehen keine Parallelen zu bekannten tierischen Isoformen (138). Allerdings weist das aktive Zentrum um die Aminosäure Cystein in seiner Sekundärstruktur und Ladung Ähnlichkeiten mit denen der GPLT (guinea pig liver transglutaminase) und des Gerinnungsfaktors XIII auf (138, 139).

Schnell wurde erkannt, dass sich für die mikrobielle Transglutaminase viele Einsatzmöglichkeiten in der Lebensmittelindustrie bieten. Hierfür ist dieses Enzym weitaus besser geeignet als andere Transglutaminasen, da sie Calcium-unabhängig katalysiert und im Vergleich zu tierischen Isoformen eine geringe Substratspezifität bei hohen Reaktionsraten aufweist (137, 140–143). Ein weiterer Vorteil ist die vergleichsweise kostengünstige Produktion durch mikrobielle Fermentation und rekombinante Produktion in *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* (144, 145).

Wie die TG2 katalysiert die mTG sowohl die Deamidierung als auch die Transamidierung von Proteinen (siehe 1.1.4.2.2). Für die Verwendung im Rahmen der Lebensmittelindustrie spielt die Transamidierung die entscheidende Rolle, die Deamidierung findet zu einem geringen Teil statt (146–148).

Aufgrund der breiten Substratspezifität reagiert die mikrobielle Transglutaminase mit einer breiten Palette an Proteinen, sodass sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der Lebensmittelproduktion anbieten. Häufig wird sie in der Fleischindustrie genutzt, kleine Fleischabschnitte zu größeren, verwertbaren Stücken zusammenzusetzen, ohne dass dafür größere Mengen Salz und Phosphat benötigt werden (149–151). Die mTG findet jedoch nicht nur in der Herstellung von Formfleisch Verwendung, sondern wird auch in der Fertigung von Molkereiprodukten und Backwaren genutzt. So können durch ihre Nutzung die Textur von Joghurt, oder der Proteingehalt von Quark unter Zugabe von Molkenproteinen gesteigert werden (152, 153). Bei der Produktion von glutenfreien Backwaren wurden durch Anreichern mit Eiklarpulver, Sojaproteinisolaten oder Kasein unter Einwirkung von mTG ähnliche Textureigenschaften erreicht, wie sie charakteristisch für weizenhaltige Produkte sind (154). Auch bei der Herstellung von herkömmlichen Brot konnte die Textur des Teigs verbessert und so eine einfache, kostengünstigere Produktion ermöglicht werden (155).

Aufgrund der großen funktionalen Ähnlichkeit der mTG mit der TG2 wird ein möglicher Einfluss im Rahmen der Zöliakie diskutiert. Im Fokus steht hierbei die Deamidierung von Prolaminen und die Bildung von Neo-Epitopen durch Cross-Linking mit Nahrungsmittelpoteinen, ähnlich der TG2 (156, 157).

Laut Bundesinstitut für Risikobewertung bestehe durch mTG keine Gefährdung für gesunde Personen, ein krankheitsfördernder Effekt bei Zöliakiepatienten scheint jedoch möglich zu sein (158). Auch wenn davon ausgegangen werden kann, dass die mTG nach Erhitzung während der Lebensmittelproduktion nicht mehr enzymatisch aktiv ist, werden die gebildeten Neo-Epitope mit der Nahrung aufgenommen (148). Eine ausreichende Studienlage, um eine verlässliche Aussage über das Gefährdungspotential der mTG zu treffen, liegt allerdings derzeit nicht vor (158).

Auf EU-Ebene handelt es sich rechtlich gesehen bei der mTG nicht um einen Zusatzstoff, sondern um einen Verarbeitungshilfsstoff, der ohne technologische Wirkung im Endprodukt verbleibt (159, 160). Als Verarbeitungshilfsstoff muss die mTG daher nicht in der Zutatenliste aufgeführt werden und ist so im Endprodukt für den Verbraucher nicht identifizierbar, ein Punkt, der im Laufe dieser Arbeit noch kritisch hinterfragt werden soll.

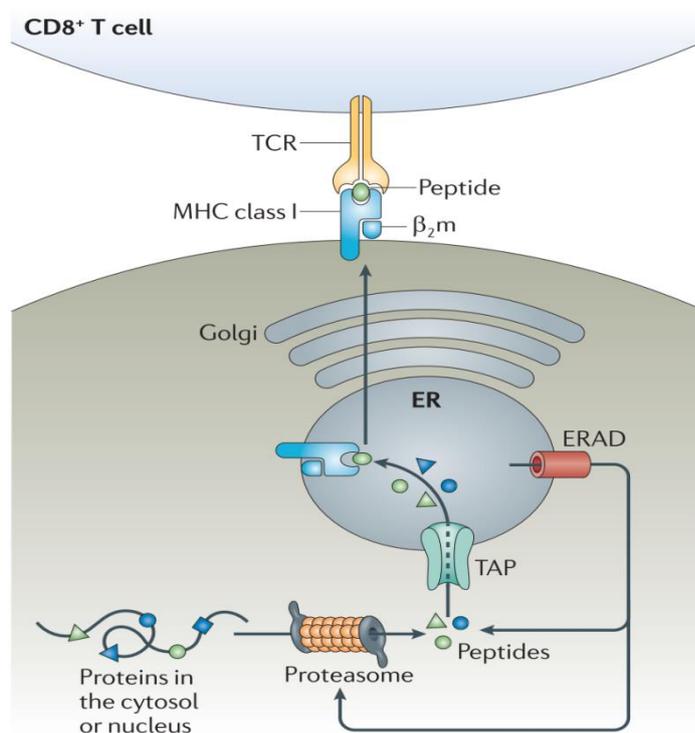
Schließlich scheint es weiterhin möglich, dass die mTG auch in einer enzymatisch aktiven Form durch die intestinale Mikrobiota des Menschen freigesetzt wird und so in direkten Kontakt mit den Enterozyten der Darmschleimhaut tritt (161). *Makarova et al.* konnten

zeigen, dass transglutaminase-ähnliche Proteine von einer Vielzahl an Bakterien produziert werden. Hierbei wiesen die Transglutaminasen verschiedener Streptomycceten weitgehend übereinstimmende Primärstrukturen auf (162). Daneben gibt es auch einige verwandte Transglutaminasen, wie beispielsweise der Cytotoxische Nekrotisierende Faktor (CNF-1) aus *Escherichia Coli*, für den sowohl die Deamidierungs- als auch die Transamidierungsaktivität nachgewiesen wurde (162, 163). Es ist daher wahrscheinlich, dass die mTG, oder verwandte bakterielle Transglutaminasen in einer enzymatisch aktiven Form im Gastrointestinaltrakt vorkommen und möglicherweise eine pathogenetisch relevante Rolle im Rahmen der Zöliakie spielen.

### 1.3 Präsentation von Antigenen

#### 1.3.1 Präsentation endogener Antigene durch MHC-I-Moleküle

MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dienen der Präsentation nukleärer und zytosolischer Antigene. Über diesen Mechanismus werden ständig zelleigene Peptide CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentiert. Sofern diese Antigenfragmente von gesunden Zellen stammen, bleiben die T-Zellen inaktiv und es resultiert eine Selbsttoleranz. Werden jedoch virale oder mutierte Peptide präsentiert, so erfolgt die Zerstörung der betroffenen Zelle durch CTL (zytotoxische T-Lymphozyten) (164).



Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

### **Abb. 1-8: Präsentation endogener Antigene.**

Vereinfachte Darstellung der Präsentation endogener Antigene mittels MHC-I-Molekülen. Endogene Proteine werden durch das Proteasom gespalten und über TAP (transporter associated with antigen presentation) in das ER transportiert. Dort binden sie an MHC-I-Moleküle und werden anschließend an die Zelloberfläche dirigiert. Hier wird das Antigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Fehlgefaltete Proteine innerhalb des ER werden durch das ERAD-System (ER-associated protein degradation) in das Zytosol transportiert. TCR = T-Zell Rezeptor,  $\beta_2\text{-m}$  =  $\beta_2$ -Mikroglobulin, ER = endoplasmatisches Retikulum. Quelle: (165).

Zelleigene Proteine werden innerhalb des Zytosols durch das multikatalytische Proteasom in kurze Peptide gespalten und gelangen dann über den spezifischen Transporter TAP (transporter associated with antigen presentation) in das ER (165). Die Bindung der Peptide durch die entsprechenden MHC-I-Moleküle wird unter anderem durch das Chaperon PDI (Protein Disulfid Isomerase), einem Bestandteil des MHC-Klasse-I-Ladungskomplexes, vermittelt (166). Das beladene MHC-I-Molekül wird anschließend über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) an die basolaterale Membran transportiert und dort zytotoxischen T-Zellen präsentiert (Abb. 1-8) (167).

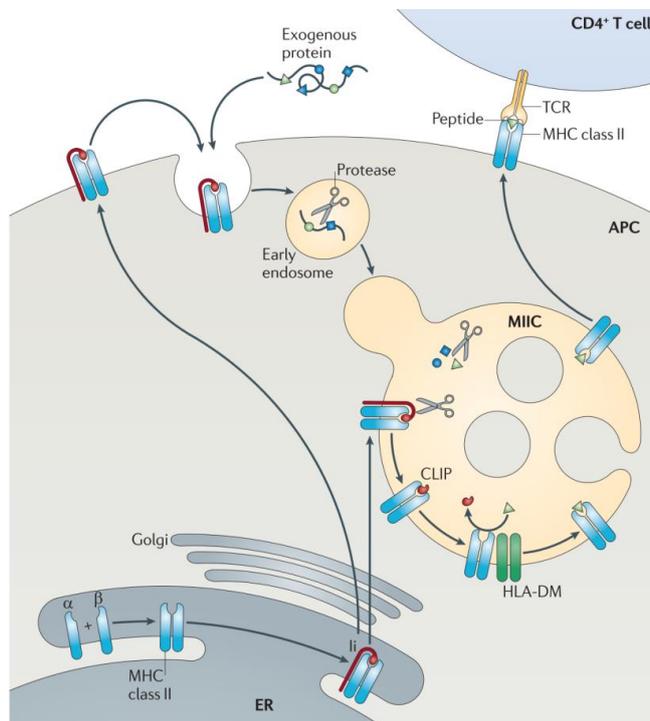
### **1.3.2 Präsentation exogener Antigene durch MHC-II-Moleküle**

Im Unterschied zu MHC-I-Molekülen werden MHC-II-Moleküle vornehmlich von sogenannten professionellen APZ (dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen) und einigen nicht professionellen APZ (unter anderem Enterozyten) exprimiert. Über den folgenden Mechanismus können beispielsweise bakterielle Proteine durch Makrophagen prozessiert und mittels MHC-II-Molekülen CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden. Hieraus resultieren die Phagozytose des Erregers sowie die Aktivierung der Antikörperproduktion durch B-Zellen (168).

MHC-II-Moleküle werden im ER produziert und bestehen anfangs aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ -, sowie einer invarianten Kette (Ii). Letztere verhindert die vorzeitige Anlagerung von Antigenen und dirigiert den Transport des Komplexes über den Golgi-Apparat in das endosomale Kompartiment (169). Dort befinden sich endozytotisch aufgenommene Proteine, die durch saure Proteasen wie Cathepsin S degradiert wurden. Diese Proteasen spalten nun auch die invariante Kette in mehreren Schritten, bis nur das sogenannte CLIP-Fragment (class II-associated li peptide) an der Antigenbindungsstelle verbleibt. Die Interaktion der MHC-II-Moleküle mit dem Chaperon HLA-DM führt schließlich zur Freisetzung des CLIP-Fragments und zur Anlagerung des Antigens. Anschließend werden die Komplexe

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

an die basolaterale Membran transportiert und  $CD4^+$  T-Zellen präsentiert (Abb. 1-9) (164, 165).



**Abb. 1-9: Präsentation exogener Antigene.**

Dargestellt ist die Präsentation exogener Antigene mittels MHC-II-Molekülen. Nach endozytotischer Aufnahme und Spaltung des Proteins bindet es innerhalb des MIIC (MHC class II-containing compartment) an MHC-II-Moleküle. Die invariante Kette dirigiert den Transport der MHC-II-Moleküle und blockiert deren Bindungsstelle. Im MIIC erfolgt die proteolytische Spaltung der invarianten Kette, sodass lediglich das CLIP-Fragment (class II-associated li peptide) verbleibt. Dieses wird durch das Chaperon HLA-DM verdrängt und das Antigenfragment bindet an das MHC-II-Molekül. Der Komplex wird an die Zelloberfläche transportiert und  $CD4^+$  T-Zellen präsentiert. APC = antigenpräsentierende Zelle. Quelle: (165).

### 1.3.3 Antigenkreuzpräsentation

Die Antigenkreuzpräsentation stellt die Verbindung der beiden oben genannten Mechanismen dar. Hierbei werden exogene Antigene mittels MHC-I-Molekülen  $CD8^+$  T-Zellen präsentiert. Im Besonderen sind bestimmte dendritische Zellen dazu fähig, allerdings ist es wahrscheinlich, dass eine Vielzahl von endozytotisch aktiven Zellen per Kreuzpräsentation zytotoxische T-Zellen aktivieren können (170–173).

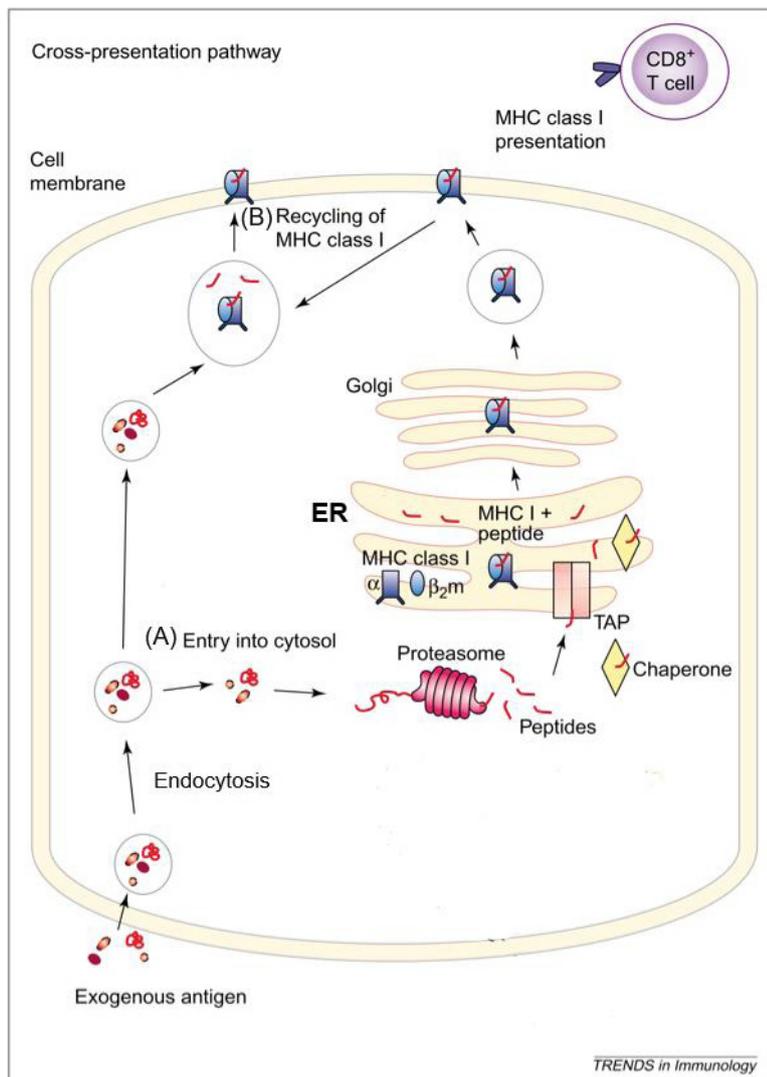
Um ihre Zytotoxizität auszuüben, müssen  $CD8^+$  T-Lymphozyten durch dendritische Zellen aktiviert werden. Wenn ein endogenes Pathogen oder eine Mutation nicht von APZ präsentiert, oder die Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle durch intrazelluläre Erreger

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

unterdrückt wird, besteht die einzige Möglichkeit der Initiation einer Immunantwort in der Kreuzpräsentation durch APZ. Somit nimmt dieser Mechanismus eine zentrale Rolle in der Abwehr intrazellulärer Pathogene und der Zerstörung mutierter Zellen ein. Allerdings konnte auch festgestellt werden, dass Kreuzpräsentation zur Deletion autoreaktiver T-Zellen und so zum Phänomen der Kreuztoleranz führt. Die genauen Mechanismen, die zu Immunisierung und Selbsttoleranz beitragen, sind jedoch derzeit nicht vollständig entschlüsselt (172, 174).

Aktuell werden zwei verschiedene Modelle der Kreuzpräsentation kontrovers diskutiert:

Das **Modell der zytosolischen Degradierung** geht davon aus, dass exogene Antigene aus dem endosomalen Kompartiment in das Zytosol gelangen und dort durch das Proteasom gespalten werden (175). Anschließend erfolgt die TAP-abhängige Translokation in das ER, wo die Antigenfragmente auf MHC-I-Moleküle treffen (170). Die restlichen Schritte entsprechen denen der klassischen Antigenpräsentation endogener Antigene (Abb. 1-10).



Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

**Abb. 1-10: Modelle der Antigenkruzpräsentation.**

Dargestellt sind die Modelle der zytosolischen Degradierung (A) sowie der vakuolären Kreuzpräsentation (B). Bei der zytosolischen Degradierung gelangen endozytierte Antigene in das Zytosol, werden dort durch das Proteasom gespalten und via TAP in das ER transportiert. Der restliche Weg gleicht dem der Präsentation endogener Antigene. Bei der vakuolären Kreuzpräsentation verbleiben exogene Antigen innerhalb spezieller endozytotischer Kompartimente, in denen sie Anschluss an recycelte MHC-I-Moleküle erhalten. Alternativ können Antigenfragmente auch an die Zelloberfläche transportiert werden. Dort verdrängen sie an MHC-I-Moleküle gebundene Peptide. Abbildung adaptiert nach: (176).

Das **Modell der vakuolären Kreuzpräsentation** nimmt an, dass Antigene innerhalb spezieller endozytotischer Kompartimente (MIIC) an MHC-I-Moleküle binden, wobei die genauen Mechanismen dieses Pfades noch unklar sind (177–179).

Möglicherweise ist die Art der Antigenaufnahme entscheidend. *In vitro*-Versuche zeigten, dass durch den Mannose-Rezeptor (MR) aufgenommenes Ovalbumin über MHC-I-Moleküle CTL präsentiert wurde. Erfolgte die Aufnahme hingegen über Pinozytose oder Scavenger-Rezeptoren (SR), wurde das Antigen über MHC-II-Moleküle CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert (177).

Derzeit sind die genauen Mechanismen der Antigenkruzpräsentation noch nicht endgültig geklärt und es bleiben viele offene Fragen. Wahrscheinlich ist, dass beide oben genannten Mechanismen zu diesem Phänomen beitragen und sich gegenseitig ergänzen (173).

**1.4 Die Rolle der Enterozyten als antigenpräsentierende Zellen**

Das Epithel des Dünndarms besteht zu >80% aus Enterozyten. Es gewährleistet die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Darmlumen und bildet eine natürliche Barriere zwischen luminalen Antigenen und den Immunzellen der *Lamina propria*. Enterozyten scheinen aber auch eine wichtige Rolle als sogenannte nicht-professionelle APZ einzunehmen. Wie klassische APZ zeichnen sie sich durch das Vorhandensein von MHC-II-Molekülen aus, deren Expression bei einer Inflammation IFN- $\gamma$ -abhängig verstärkt werden kann (180, 181). Mehrere Studien konnten *in vivo* eine Kolo-kalisation von exogenen Antigenen und MHC-II-Molekülen in Enterozyten nachweisen (182, 183). Außerdem zeigten *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Versuche, dass Darmepithelzellen in der Lage sind, HLA-restringierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der *Lamina propria* zu aktivieren (184, 185).

Neben dem klassischen Mechanismus der Antigenpräsentation mittels MHC-II-Molekülen scheint auch die Kreuzpräsentation durch Enterozyten eine Rolle zu spielen. *Hundorfean et al.* stellten *in vivo* eine Kolo-kalisation von MHC-I-Molekülen und Ovalbumin in Enterozyten dar, während *Gianfrani et al.* durch ein bestimmtes Gliadin-Epitop aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Zöliakiepatienten nachweisen konnten (171, 186).

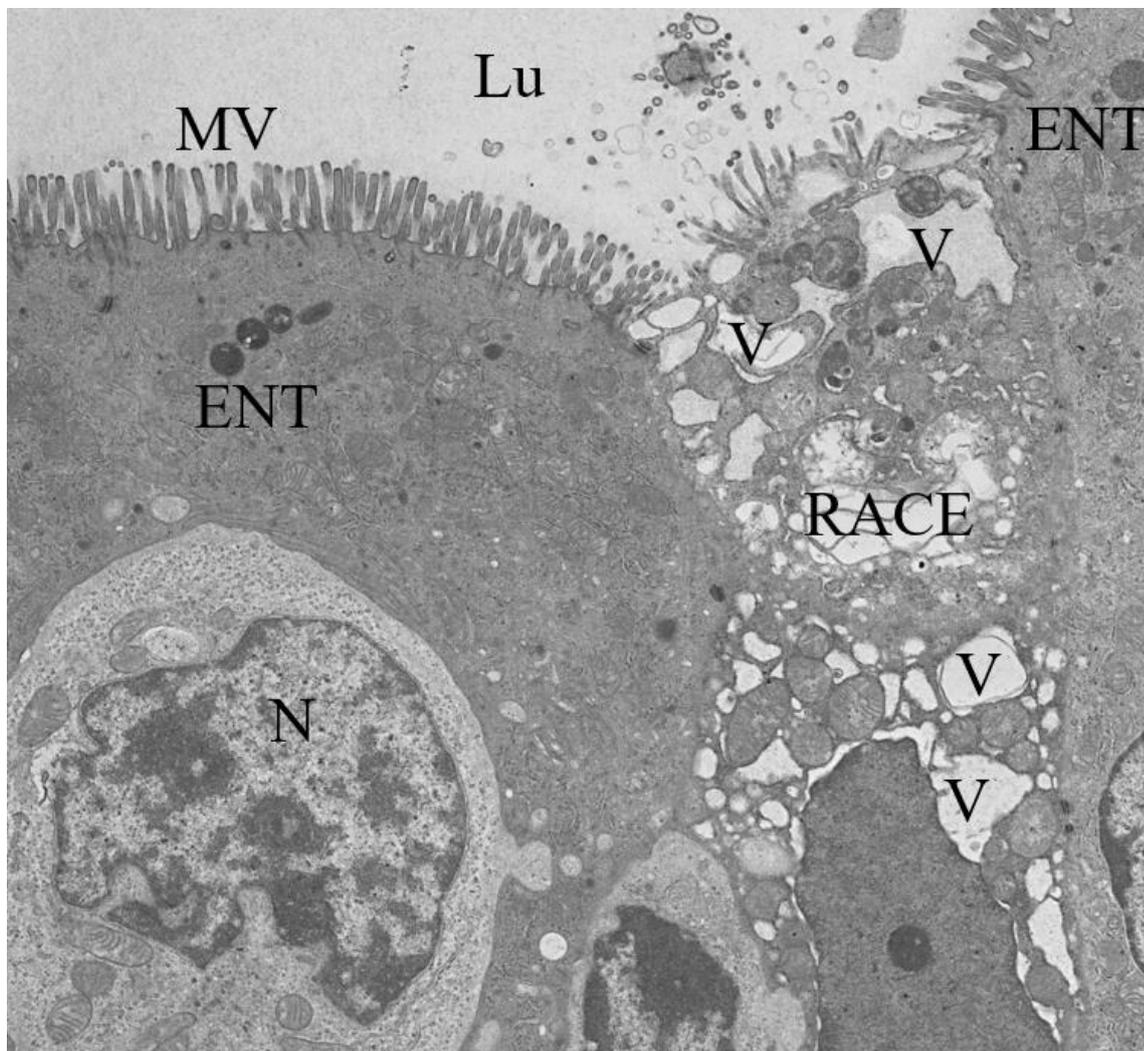
Allgemein wird der Antigenpräsentation der Enterozyten eine tolerogene Wirkung zugesprochen, da ihnen im Gegensatz zu APZ die kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 fehlen (181, 187). Präsentieren Enterozyten ihr entsprechendes Antigen ohne diese kostimulatorischen Signale, resultiert daraus eine Anergie. Allerdings exprimieren Enterozyten auch das Oberflächenmolekül CD58, welches mit dem CD2-Rezeptor der LPL (*Lamina propria* Lymphozyt) interagiert und eine Zytokinausschüttung und Proliferation der Lymphozyten bewirkt (188).

Da die genauen Abläufe der Antigenpräsentation durch Enterozyten über klassische und nicht-klassische Pfade weitgehend ungeklärt sind, bleibt die Frage nach den Effekten, die durch die Interaktion der Epithelzellen mit den Immunzellen der Mukosa hervorgerufen werden, zurzeit noch unbeantwortet.

## 1.5 RACE-Zellen

RACE-Zellen (*rapid antigen uptake into the cytosol of enterocytes*) stellen eine spezielle, von Enterozyten abstammende Zellpopulation innerhalb des Darmepithels dar, die sich durch eine enorme Antigenaufnahme in Zytosol und Zellkern auszeichnet (189). Innerhalb des hochprismatischen Epithels treten sie einzeln oder in kleineren Gruppen in direkter Nachbarschaft zu Enterozyten auf. RACE-Zellen zeigen eine verringerte Expression differenzierungs-abhängiger Proteine wie zum Beispiel Sucrase-Isomaltase oder Villin. Weiterhin weist die geringe Expression der mitochondrialen ATP-Synthetase in RACE-Zellen auf einen reduzierten Energiestoffwechsel hin. Morphologisch unterscheiden sie sich von normalen Enterozyten durch geringere Elektronendichte des Zytosols, verminderten Bürstensaum an der apikalen Membran sowie marginale Kondensation des Heterochromatins (Abb. 1-11). Da diese Merkmale auch bei Zellen beobachtet wurden, die den programmierten Zelltod durchlaufen, wurde angenommen, dass es sich bei RACE-Zellen um apoptotische Zellen handelt. Gegen einen aktiven Zelluntergang spricht jedoch, dass bei RACE-

Zellen keine verstärkte Markierung des Apoptose-Markers Caspase-3 nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise handelt es sich um Zellen, die sich in einem präapoptotischen Zustand befinden oder einen Caspase-3-unabhängigen Zelltod durchlaufen (190). Da sie eine enorme Menge exogener Proteine aufnehmen, könnten RACE-Zellen eine bedeutende Rolle im Rahmen der Antigenpräsentation einnehmen. Weiterhin könnte auch das Ausstoßen von RACE-Zellen aus dem Epithelverband zu vorübergehender erhöhter Permeabilität und Antigeneinstrom in die Submukosa führen. Eine *Ex-vivo*-Studie zeigte, dass in Biopsien von CED-Patienten mehr RACE-Zellen zu finden waren und sich ihre Anzahl proportional zum Entzündungsgrad verhielt (189).



**Abb. 1-11: RACE-Zelle zwischen zwei Enterozyten.**

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer RACE-Zelle (RACE) zwischen zwei Enterozyten (ENT) innerhalb einer in Epon eingebetteten Schleimhautbiopsie des menschlichen Darmepithels. Die RACE-Zelle

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

zeigte eine charakteristische Verminderung der Mikrovilli im Bereich der apikalen Membran sowie ein Zytosol mit geringer Elektronendichte und zahlreichen Vakuolen. Lu = Lumen, MV = Mikrovilli, N = Nucleus. Vergrößerung: x3100. Quelle: Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer.

## 1.6 Fragestellung

Trotz intensiver Forschung ist die Pathogenese der Zöliakie noch nicht vollständig aufgeklärt. Die innerhalb der letzten Jahrzehnte angestiegene Prävalenz macht exogene Einflussfaktoren als Ursache wahrscheinlich. Im Fokus dieser Arbeit steht die mTG, ein Enzym mit ähnlicher Funktion wie die menschliche Gewebstransglutaminase. Die Nutzung dieses Enzyms in der Lebensmittelindustrie hat in der Vergangenheit stark zugenommen, ohne dass ihr Einfluss auf die Zöliakie hinreichend erforscht wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die intrazelluläre Lokalisation der mTG, sowie ihr Einfluss auf die Transportwege von Gliadin im menschlichen Dünndarmepithel untersucht werden.

Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Transport der beiden Antigene in das ER, welches ein Kompartiment der Antigenkruzpräsentation darstellt. Im Rahmen der Zöliakie sind CD8<sup>+</sup> IEL maßgeblich an der Zerstörung des Epithels, einhergehend mit der typischen Zottenatrophie, beteiligt. Die genauen Mechanismen ihrer Aktivierung sind nur zum Teil bekannt. Diese Arbeit soll zeigen, inwieweit Gliadin und mTG in das ER von Enterozyten aufgenommen werden und so Anschluss an das System der Antigenkruzpräsentation erhalten. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass Enterozyten als APZ exogene Antigene mittels MHC-I-Molekülen zytotoxischen IEL präsentieren.

Des Weiteren soll ein möglicher Einfluss der mTG auf den Transport von Gliadin innerhalb des endozytotischen Pfades analysiert werden. Zentral ist hierbei das Vorkommen des Prolamins innerhalb HLA-DR-positiver später Endosomen, welche mit der Toleranzinduktion assoziiert sind.

Schließlich dient diese Arbeit einer weitergehenden Charakterisierung der RACE-Zellen sowie der intrazellulären Antigenlokalisierung in dieser Zellpopulation. In diesem Zusammenhang wird untersucht, ob RACE-Zellen, ähnlich wie M-Zellen, *in vitro* durch Stimulation mit dem Zytokin RANKL induziert werden können. Schlussendlich soll in dieser Studie untersucht werden ob der Marker GP2 (Glykoprotein 2), welcher bislang als M-Zell-Marker bekannt war, spezifisch von RACE-Zellen exprimiert wird, was somit auch auf eine mögliche Verwandtschaft dieser beiden Zellarten hindeuten könnte.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine experimentelle, explorative Arbeit, die sowohl *ex vivo* an Duodenalbiopsien als auch *in vitro* an einer intestinalen Zelllinie durchgeführt wurde.

### 2.2 Patientenkollektiv

In diese Studie wurden 18 Patienten eingeschlossen, die zur Abklärung des Verdachts auf Zöliakie oder aufgrund anderer Ursachen in der Abteilung allgemeine Pädiatrie und Neonatologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Gießen endoskopiert wurden.

Als Ausschlusskriterien dienten:

Alter über 18 Jahre, Grunderkrankung mit bekannter Beeinflussung enteraler Funktionen und histologische Anzeichen für eine Infektionskrankheit, oder Zottenatrophie des Duodenums aus einem anderen Grund als Zöliakie.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien konnten 7 Zöliakie- und 11 Kontrollpatienten eingeschlossen werden.

Bei allen Probanden wurde eine komplette Ösophago-Gastro-Duodenoskopie im Rahmen der Diagnostik vollzogen. Aufgrund der Tatsache, dass bei der Zöliakie die Schädigung der duodenalen Mukosa regional stark unterschiedlich sein kann, müssen routinemäßig mehrere Biopsien aus verschiedenen Bereichen entnommen werden (siehe 1.1.6). Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben stereomikroskopisch untersucht und die Entzündungsaktivität beurteilt. Die Biopsien mit den größeren Schleimhautschäden wurden, wie üblich, zum Zweck der Diagnostik an die Pathologie gesandt, wohingegen die Proben mit weniger Krankheitsaktivität, die sonst verworfen worden wären, in diese Studie eingeschlossen wurden. Alle Patienten (und/oder deren Sorgeberechtigte) wurden über die Durchführung der Studie aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Verwendung der überschüssigen Proben hierfür.

Der entsprechende Ethikantrag mit dem Aktenzeichen 119/16 wurde von der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Gießen angenommen.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Die Diagnosestellung der Zöliakiefälle erfolgte nach den neuesten Leitlinien der ESPGHAN (1).

## 2.3 Material

### 2.3.1 Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Diamantmesser „Cryo Immuno“	Diatome AG, Biel, Schweiz
Dispergiergerät Ultra Turrax T25 basic	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Einschweiß-Folie	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Elektronenmikroskopienetze FCF-100-Ni	Science Services GmbH, München, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Folienschweißgerät	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Glasmesserbrecher KMR2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Heizblock ThermoStat 3401	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Impfösenhalter	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Inkubationskammer	Laborbedarf-Fachhandel Erwin Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Inkubator Heracell 150	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kodak electron image film SO-163	Kodak, Rochester, USA

Kryokammer Leica EM FC6	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laminar Flow Werkbank	VWR International GmbH, Wien, Österreich
Laser-Scanning-Konfokalmikroskop TE2000-E	Nikon Europe B. V., Amsterdam, Niederlande
Mikropipetten (0,1-2,5; 0,5-10; 10-100; 50-200; 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträger mit Aufnahmebohrung (Präparatträgerstift)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger SuperFrost	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm "M"	Pechiney, Chicago, USA
Pinzette	PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland
Platinöse	PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Scanner G4050	Hewlett-Packard, Böblingen, Deutschland
Silikonstift Pap Pen	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt Deutschland
Slot-Blot-Apparatur PS600	Hoefer Scientific Instruments, Holliston, USA
Spiegelreflexkamera	Pantex
Stereomikroskop	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Tischzentrifuge Minispin Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Transmissionselektronenmikroskop EM 410	Philips, Eindhoven, Niederlande
Trimmdiamant „Trim 20“	Diatome AG, Biel, Schweiz
Untertisch-Lichtmikroskop, Zeiss Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Ultrakryomikrotom Leica EM UC6	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ussing-Kammer-Slider (Gewebeträger)P2407B	Physiologic Instruments Inc., San Diego, USA
Zellkulturschalen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellulosenitratmembran	Whatman, Dassel, Deutschland

### 2.3.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Ort, Land
Aqua B. Braun Ecotainer (bidest H <sub>2</sub> O)	B. Braun Medical AG, Melsungen Deutschland
CWFS (Cold Water Fish Skin) Gelatine Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)	B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland
Dinatriumtetraborat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Gluten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glutamin 1%	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Goat-Serum	Thermo Fischer Scientific, Langensfeld, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hoechst 33258	Thermo Fischer Scientific, Langensfeld, Deutschland
Meerschweinchentransglutaminase (guinea pig liver transglutaminase, GPLT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methylcellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun Medical AG, Melsungen, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tergitol Type NP-40 0,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS 10-fach (Phosphate Buffered Saline)	Thermo Fischer Scientific, Langensfeld, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 1%	Thermo Fischer Scientific, Langensfeld, Deutschland
Pepsin (P6877)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PIPES minimum 99% Titration	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Prolong Gold	Thermo Fischer Scientific, Langensfeld, Deutschland
Protease-Inhibitoren	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland

PVP (Polyvinylpyrolidone)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pyronin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand)	PeptoTech GmbH, Hamburg, Deutschland
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Toluidinblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl pH 7,5 (20mM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trockenmilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Trypsin (T4799) (Proteinextrakt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,25%) (Zellkultur)	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland

### 2.3.3 Lösungen und Puffer

- **AEC-Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazol)**

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

AEC-Kit (Invitrogen, Deutschland, Karlsruhe). Der rote Farbstoff entsteht durch die Reaktion des Zweikomponentensystems bestehend aus AEC-Chromogen und AEC-Substrat mit der Horseradish-Peroxidase (HRP).

- **Blockierungsmilch**

Die hier als Blockierungsmilch bezeichnete Lösung besteht aus PBST mit 5% Trockenmilchpulver.

- **Cold Water Fish Skin-Gelatine (CWFS)**

0,1g CWFS-Gelatine Pulver werden in 100 ml PBS 1-fach gelöst und über Nacht bei 4°C quellen gelassen. Daraufhin wird die Lösung gerührt und durch einen Spritzenfilter filtriert. Dann werden 5 ml fetales Kälberserum (FKS) und 5ml Goat-Serum (oder anderes Serum, je nach Wirtstier) zu 90 ml 0,1%iger CWFS-Gelatine-Lösung gegeben und gut gemischt.

- **Saccharose-Lösung**

Zur Herstellung einer 2,3-molaren Lösung werden 78,73 g Saccharose eingewogen und auf 100 ml mit PBS aufgefüllt.

- **Methylcellulose**

200 ml dH<sub>2</sub>O werden auf 95° C erhitzt und 4 g Methylcellulose hinzugegeben. Dann wird die Lösung drei Tage im Kühlraum gerührt. Abschließend wird die Methylcellulose bei 65.000xg und 4°C für 90 Minuten zentrifugiert.

- **Paraformaldehyd/ PIPES 5%**

100 ml dH<sub>2</sub>O werden auf 60°C erhitzt und dann 10 g Paraformaldehyd hinzugefügt. Dann wird 1 M NaOH zugegeben, bis die Lösung klar ist.

Der PIPES-Puffer wird angesetzt in dem 0,4 M PIPES (12,096 g auf 100 ml dH<sub>2</sub>O) in 80 ml dH<sub>2</sub>O gelöst werden. Anschließend wird mit hochkonzentriertem NaOH der pH auf 7,0 eingestellt.

Paraformaldehyd und PIPES im Verhältnis 1:1 mischen und bei -20°C lagern.

- **Phosphate Buffered Saline (PBS)**

10-fach konzentrierte PBS wird mit dH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt und bei 4°C gelagert.

- **Phosphate Buffered Saline-Tween (PBST)**  
10-fach PBS wird mit dH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt und bei 4°C gelagert. Anschließend wird 5% Tween hinzugefügt.
- **PVP-Saccharose**  
Polyvinylpyrolidone (Sigma, PVP-10, M.W. 10 kD), 2,4 ml dH<sub>2</sub>O und 0,6 ml 1.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in ein Gefäß geben und unter ständigem Rühren 3 g PVP zugeben. Nach dem PVP vollständig aufgelöst ist werden 70 ml 2,3 M Saccharose (in PBS gelöst) zugefügt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Vor Verwendung über mindestens eine Woche bei 4°C lagern.
- **Saures Uranylacetat (UA) 4%-ige Lösung**  
2 g Uranylacetat in 50 ml dH<sub>2</sub>O lösen, anschließend eine 3-fache Filtration mittels Filterpapier vornehmen und bei 4°C lagern.
- **Toluidinblau**  
Zuerst werden 2 g Toluidinblau mit 200 ml dH<sub>2</sub>O gemischt. Dann werden 2 g Dinatriumtetraborat mit 200 ml dH<sub>2</sub>O gemischt. Zuletzt werden 0,5 g Pyronin 1% in 50 ml dH<sub>2</sub>O gegeben und die drei Lösungen miteinander vermischt. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur, vor dem Gebrauch muss die Lösung filtriert werden.
- **Triton 0,5%**  
Triton-X-100 wird zuerst im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt. Später folgt eine erneute Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:2.

#### 2.3.4 Spezielle Enzyme und Proteinfractionen

- **Frazer's Fraction (FF)**  
30 g Gluten werden mit 300 ml 0,1 M HCl und 150mg Pepsin gemischt. Da Pepsin bei einem pH-Wert unter 1,3 inaktiv ist, wird dieser mittels NaOH auf 1,8 eingestellt. Die Lösung wird bei 37°C für vier Stunden unter dem Abzug gerührt. Danach wird

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

der pH-Wert wiederum mithilfe von 10 ml NaOH auf 7,8 eingestellt und 150 mg Trypsin zugegeben. Dann folgt erneutes Rühren über vier Stunden bei 37°C und dann für zehn Minuten bei 100°C. Nun lässt man die Lösung abkühlen, um dann durch Zugabe von 1 M HCl einen pH-Wert von 4,5 zu erreichen. Die Lösung wird für 10 Minuten bei 2500xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen (= Frazer's Fraction III) (191). Im Folgenden wird Frazer's Fraction III zur Vereinfachung als Frazer's Fraction (FF) bezeichnet.

- **Mikrobielle Transglutaminase (mTG)**

In dieser Studie wurde die mikrobielle Transglutaminase von Zedira (T001, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das ursprünglich aus dem Bakterium *Streptomyces mobaraensis* stammende Protein wurde rekombinant in *Escherichia coli* produziert.

- **Proteinextrakt aus Dünndarmbiopsien (Slot-Blot)**

Das Medium, in dem sich die Biopsien befinden, wird abgesaugt und die Probe zweimal in kaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS werden die Biopsien mittels Dispergiergerät in Lysis-Puffer (20mM Tris-HCl pH 7,5; 200mM NaCl; 0,5% NP-40; Protease-Inhibitoren) bei 16000 rpm homogenisiert. Nun wird der Überstand überführt und zentrifugiert und anschließend die Lösung mit Dilutions-Puffer (20mM Tris-HCl pH 7,5) im Verhältnis 1:1 verdünnt.

## 2.4 Zellkultur

Für die Zellkulturarbeiten wurde die Zelllinie HT-29 verwendet, welche aus einem Kolonadenokarzinom einer 44-jährigen Kaukasierin gewonnen wurde. HT-29-Zellen wachsen in Kultur in einem Monolayer und entwickeln, sobald sie das konfluente Stadium erreicht haben, die Eigenschaften differenzierter intestinaler Epithelzellen, das heißt, dass die Zellen eine für Enterozyten typische Polarität annehmen und ihre Proliferation einstellen.

Um eine Kontamination zu vermeiden, fanden sämtliche Arbeiten an der Zellkultur unter einer Laminar Flow Werkbank unter sterilen Bedingungen statt. Alle genutzten Lösungen wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in einem Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO<sup>2</sup>-Gehalt und 95%-Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nähr-

medium diente eine Mischung aus RPMI-Medium, 10% FKS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (Verhältnis 1:1), welches alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurden die Zellen gesplittet.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt und jede Zellkulturflasche mit ca. 4 ml PBS gewaschen. Um die Zellen von der Oberfläche zu lösen, erfolgte anschließend die Benetzung mit 1 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C, welche mittels Zugabe von 4 ml Nährmedium gestoppt wurde. Hiernach erfolgte das Auftragen der Zelllösung auf Chamber Slides oder alternativ auf sogenannte Transwells, welche als Objektträger für die Immunfluoreszenz dienen.

Von dieser Zelllösung wurden 20 µl zur Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Improved-Zählkammer verwendet und hierfür im ersten Schritt in 80 µl Trypanblau gelöst.

Dann wurde ein Deckglas auf die Zählkammer gelegt und in Position geschoben. Zuletzt erfolgte das seitliche Aufpipettieren von 10 µl der mit Trypanblau versetzten Zelllösung.

Bei der Auszählung konnten dunkelblau angefärbte Zellen vernachlässigt werden, da diese als abgestorben gelten. Es wurden vier Gruppenquadrate ausgezählt und der Mittelwert in folgende Formel eingesetzt:

**Zellzahl: Zellzahl/Quadrat x Verdünnungsfaktor x Menge in µl x Neubauer-Koeffizient ( $10^4$ )**

$3 \times 10^3$  HT-29-Zellen wurden pro Well ausgesäht und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Um die Aufnahme der mTG durch epitheliale Zellen zu untersuchen sowie den Einfluss einer Stimulation mit RANKL auf den Antigen-Uptake zu analysieren, wurden die Zellen mit 200 ng/ml RANKL über vier Tage inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 200 µg/ml mTG über eine Stunde bei 37°C.

Direkt danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen, für 4 Minuten in PFA 3% fixiert und daraufhin erneut dreimal gewaschen.

Danach erfolgte die Markierung der Antigene mittels Immunfluoreszenz analog zum Vorgehen mit Duodenalbiopsien (siehe 2.7). Die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Expression von GP2 und der Aufnahme von mTG nach RANKL-Stimulation wurde dreimalig durchgeführt. Zur Auswertung der Versuche wurden pro Gruppe 10 Bilder mit durchschnittlich jeweils 200 abgebildeten Zellen angefertigt. In der Summe wurden somit 30 Bilder der Kontroll- und Stimulationsgruppe quantifiziert.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

## 2.5 Verarbeitung der Biopsien

### 2.5.1 Probengewinnung und Inkubation

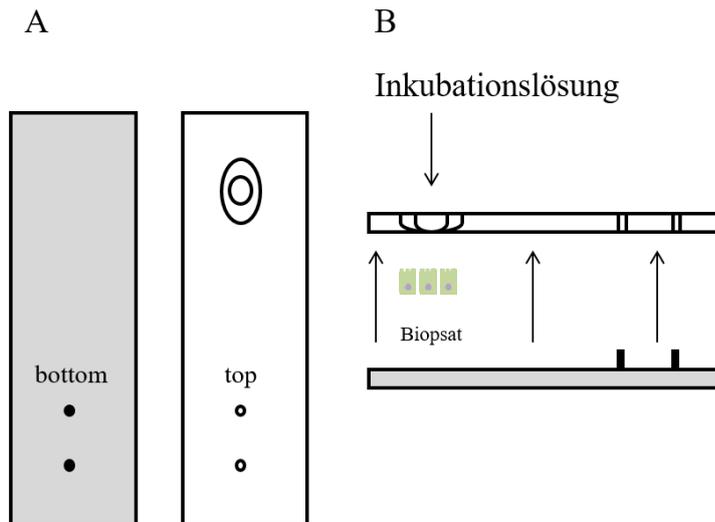
Die Gewebeproben wurden im Rahmen diagnostischer Endoskopien gewonnen. Während dieser Untersuchung erfolgte die routinemäßige Entnahme von sechs bis acht Biopsien, welche unmittelbar am Stereomikroskop begutachtet wurden. Für diese Arbeit wurden stets zwei Biopsate ausgesucht, die groß genug waren und möglichst viel intakte Schleimhaut (mit gut zu erkennenden Zotten) aufwiesen. Die restlichen Gewebeproben wurden wie üblich zur Diagnostik an das pathologische Institut geschickt.

Biopsien, welche für diese Studie in Frage kamen, wurden noch in der Endoskopie in RPMI-Medium auf Eis gelegt und dann unmittelbar im Labor weiterverarbeitet. Um die Methode der Kyroimmunelektronenmikroskopie erfolgreich zu verwenden, war es essentiell, dass die zu untersuchenden Proben ausreichend Schleimhaut enthielten. Weiterhin musste bei der Inkubation der Biopsate darauf geachtet werden, dass die apikale Membran mit der Inkubationslösung in Kontakt kam und die Mukosa später auch am Mikrotom angeschnitten wurde.

Zuerst wurde die Probe unter dem Stereomikroskop begutachtet und mittels Pinzetten vorsichtig in einer Petrischale flachgedrückt. Daraufhin wurde die Biopsie auf Filterpapier erneut glattgestrichen, sodass sie in einer einzigen Schicht auf den Ussing-Kammer-Slider gebracht werden konnte.

Sobald die Biopsie auf dem Slider positioniert war, wurde mittels Stereomikroskop überprüft, ob die Schleimhaut auf der richtigen Seite lag und ob die gesamte Öffnung des Objektträgers von der Probe ausgefüllt war. So wurde sichergestellt, dass die Proteine der Inkubationslösung streng von apikal durch die Enterozyten aufgenommen und nicht von basal in die Zellen gelangen konnten.

Wenn die Biopsie die richtige Lage aufwies, konnte der untere Ussing-Kammer-Slider aufgelegt werden (Abb. 2-1).



**Abb. 2-1: Aufbringen des Dünndarmbiopsats zwischen zwei speziellen Ussing-Kammer-Slidern (vereinfachte Darstellung).** (A) Aufsicht auf den unteren und oberen Ussing-Kammer-Slider. (B) Schematische Darstellung der Position des Biopsats. Durch die Lage der Probe wurde eine streng apikale Aufnahme der Inkubationslösung gewährleistet. Quelle: Eigene Darstellung

Bei der darauffolgenden Inkubation gab es zwei Vorgehensweisen. Im ersten Ansatz, wurde die Biopsie allein mit 20  $\mu$ l mTG (200  $\mu$ g/ml) inkubiert, im zweiten mit 20  $\mu$ l mTG (200  $\mu$ g/ml) sowie 20  $\mu$ l FF (100  $\mu$ g/ml). Anschließend wurden beide Proben zur Inkubation für eine Stunde bei 37°C in einem Brutschrank gelagert.

### 2.5.2 Probenaufbereitung und Lagerung

Nach Ablauf der Stunde konnten die Gewebeprobe, nach kurzem Waschen in PBS, aus der Apparatur entnommen und die nicht inkubierten Abschnitte mittels Skalpell entfernt werden. Diese waren stereomikroskopisch leicht zu identifizieren, da sie während der einstündigen Inkubation nicht innerhalb der Öffnung des Slider lagen und durch die Objektträger flachgedrückt wurden.

Das verbleibende Gewebe wurde daraufhin für eine Stunde in Paraformaldehyd/PIPES 5% (PFA) bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierung des Präparats diente dem Erhalt der Zellstruktur bei Arbeitsschritten, die notwendigerweise bei Raumtemperatur erfolgten. Die Verwendung von PFA war dabei schonend und konservierte die antigenen Eigenschaften des Gewebes, was für das Verfahren der Kryoimmunoelektronenmikroskopie unabdingbar ist.

Daraufhin wurden die Proben zur Vorbereitung auf das Einfrieren für eine Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C, in PVP-Saccharose gelegt. Dies verhinderte während des Einfrierens die Bildung von Eiskristallen und Gefrierartefakten.

Zum Schluss wurden die Biopsien auf Filterpapier getupft, um die restliche PVP-Saccharose zu entfernen und mit der Schleimhaut nach oben zeigend mittels Tissue-Tek auf Präparatträgerstifte aufgebracht. Wenn die Probe die gewünschte Lage hatte, wurde der Stift schnellstmöglich in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend wurde das Gewebe bis zur weiteren Analyse bei -196°C gelagert.

## **2.6 Slot-Blot**

### **2.6.1. Grundlagen des Slot-Blot-Verfahrens**

Die Grundlage des Slot-Blot-Verfahrens stellt die Immobilisierung von Proteinen oder Proteingemischen auf einer Membran (z. B. Nitrozellulose) dar, um diese in einer anschließenden Immunreaktion colorimetrisch nachzuweisen. Im Unterschied zum Western-Blot-Verfahren findet jedoch keine gelelektrophoretische Auftrennung der Proben statt, sodass keine Aussage über das Molekulargewicht des markierten Proteins getroffen werden kann.

Ähnlich dem Western-Blot wird das gesuchte Protein durch einen primären Antikörper gebunden. Dieser wird dann durch einen sekundären Antikörper, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist, detektiert. Durch Zugabe des entsprechenden Substrats kommt es zu einer Farbentwicklung. Je mehr Protein detektiert wird, desto intensiver erscheint der Farbton.

### 2.6.2. Versuchsdurchführung

Für das Slot-Bot-Verfahren wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Tab. 2-1: Primäre und sekundäre Antikörper für das Slot-Blot-Verfahren.

Antikörper	Klonalität/Wirt	Firma	Konzentration
<b>Primäre Antikörper</b>			
Anti-mTG-AK (A019)	Polyklonal, Kaninchen	Zedira, Darmstadt, Deutschland	1:1000
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Goat-anti-Rabbit, konjugiert mit HRP	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	1:1000

Zuerst wurde die Nitrozellulosemembran in PBS befeuchtet und dann in eine mit dH<sub>2</sub>O gespülte Kammer eingespannt. Im Anschluss wurde ein Vakuum mittels Wasserstrahlpumpe angelegt und die zu analysierenden Lösungen auf die vorgesehenen Slots aufgetragen. Das Vakuum ermöglichte hierbei die Übertragung der Proben auf die Membran. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in PBS gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5%-iger Blockierungsmilch inkubiert. Dann folgten das Einschweißen der Membran in eine Folie sowie die einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper auf einem Schüttler. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Proben anschließend dreimal 10 Minuten in PBS gewaschen und die Membran vollständig mit dem sekundären Antikörper benetzt. Nach einer 45-minütigen Inkubation wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gespült. Anschließend wurde das Enzym-Konjugat auf die Proben aufgetragen und für 10 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 2 Minuten in PBS konnte das AEC-Substrat angesetzt und auf die Slots gegeben werden. Sobald die Membran anfang, sich zu verfärben, wurde die Reaktion durch gründliche Spülung mit dH<sub>2</sub>O gestoppt.

Durch die Reaktion der HRP wurde das rot erscheinende Chromogen sichtbar. Die Auswertung erfolgte rein optisch anhand der Intensität der Färbung. Die Ergebnisse wurden möglichst zeitnah mittels einer digitalen Spiegelreflexkamera dokumentiert, da sich die Membran im Laufe der Zeit verfärbt und die Farbintensität nachlässt.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

## 2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

### 2.7.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie stellt eine Methode dar, um Proteine in Geweben auf lichtmikroskopischer Ebene nachzuweisen. Hierbei bedient man sich Fluoreszenzfarbstoffen, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind. Bei der direkten Methode ist das Fluorochrom an den primären, antigenspezifischen Antikörper gebunden, bei der indirekten Methode werden die Primärantikörper durch fluoreszierende sekundäre Antikörper (Anti-IgG-AK) detektiert. Letztere Technik wurde im Zuge dieser Arbeit verwendet.

Die Fluoreszenz der gekoppelten Farbmoleküle wird im Konfokalmikroskop durch Anregung mittels Licht einer bestimmten Wellenlänge dargestellt. Das in der Folge emittierte Licht liegt je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff in einem bestimmten Bereich des sichtbaren Spektrums.

Durch den Einsatz verschiedener fluorochromgekoppelter Antikörper können mehrere Antigene im Gewebe markiert und mittels unterschiedlicher Farbfilter einzeln oder zeitgleich im sogenannten *Overlay* untersucht werden.

### 2.7.2 Versuchsdurchführung

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Tab. 2-2: Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie.

Antikörper	Klonalität/Wirt	Firma	Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>			
Anti-mTG-AK (A019)	Polyklonal, Kaninchen	Zedira, Darmstadt, Deutschland	1:400
Anti-GP2-AK	Monoklonal, Maus	Dr. Komorowski, Lübeck, Deutschland	1:10
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Goat-anti-Rabbit, Alexa 555 rot	Polyklonal, Ziege	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland	1:200
Goat-anti-Mouse, Alexa 488 grün	Polyklonal, Ziege	Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland	1:200
Höchst 33258	-	Invitrogen AG, Karlsruhe Deutschland	1:1000

Sämtliche Antikörper wurden in 0,1% CWFS verdünnt und für 30 Sekunden bei 9400 g zentrifugiert.

Der Höchst-Farbstoff ist ein membrangängiges Fluorochrom, welches an spezifische Regionen der DNA bindet. Das emittierte Licht des Farbstoffs kann bei einer Wellenlänge von 450 nm im Konfokalmikroskop sichtbar gemacht werden und dient der Markierung von Zellkernen. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde der Farbstoff im Verhältnis 1:1000, in PBS verdünnt, eingesetzt.

Für die Versuchsdurchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die HT-29 Zelllinie und Dünndarmbiopsien verwendet, welche nach den in 2.4 und 2.5 beschriebenen Methoden aufbereitet und inkubiert wurden.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Die Herstellung der Schnitte aus Dünndarmbiopsien für die Versuchsdurchführung erfolgte analog zum Vorgehen in Abschnitt 2.8.4, allerdings wurden die Schnitte bei einer Kamertemperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  angefertigt, die Schnittdicke lag bei 800 nm.

Jeweils 4 Schnitte wurden auf einen speziellen Objektträger (Objektträger SuperFrost) aufgenommen und in einer zuvor angefeuchteten Inkubationskammer gelagert. Anschließend wurden die Proben dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, die Präparate gut abgetropft und mittels eines Silikonstifts umfahren, um ein Verlaufen der Lösungen während des Versuchs zu verhindern.

Nach einer 10-minütigen Permeabilisierung des Gewebes durch Triton 0,5% in der Inkubationskammer wurde die Flüssigkeit gut abgetropft. Daraufhin wurden unspezifische Bindungsstellen durch 10-minütiges Inkubieren mit 0,1% CWFS blockiert und daraufhin die Schnitte bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert.

Am nächsten Tag fand zuerst ein Waschschriff statt, bei dem die Objektträger einmalig kurz und danach dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen wurden. Nachdem die Schnitte gut abgetropft waren, erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur. Danach wurden die Präparate einmalig kurz und dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, wobei die Objektträger mit einer Box abgedunkelt wurden. Anschließend fand eine 10-minütige Inkubation mit Höchstfarbstoff (1:1000) in der Inkubationskammer statt. Nach einmaligem kurzem Waschen und einem Waschschriff für 5 Minuten in PBS, wurden die Schnitte mit  $\text{dH}_2\text{O}$  abgespült, gut abgetropft und trockenge wischt.

Schließlich wurden die Objektträger mit 20  $\mu\text{l}$  ProLong Gold benetzt, um sie vor einem schnellen Verblässen (Photobleaching) zu schützen und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Das Deckglas wurde mittels klaren Nagellacks fixiert und die Proben bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunkeln getrocknet.

Die Proben konnten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, allerdings empfahl sich die zeitnahe Auswertung am Laser-Scanning-Konfokalmikroskop LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), welche bei 63-facher Vergrößerung durchgeführt wurde.

Der Versuchsablauf mit der intestinalen Zelllinie HT-29 glich demjenigen mit den Biopsien, allerdings wurden die Zellen jeweils für 1 Stunde (primärer Antikörper), respektive 45 Minuten (sekundärer Antikörper) inkubiert und die Benetzung mit Prolong Gold erfolgte nicht.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

## 2.8 Kryoimmunelektronenmikroskopie

### 2.8.1 Grundlagen der Kryoimmunelektronenmikroskopie

Die Entwicklung des Verfahrens des Kryoimmunlabelings beruht auf den Arbeiten von *Tokuyasu* und *Griffiths* aus den siebziger Jahren (192–194). Die Methode ermöglicht nicht nur den Nachweis definierter Moleküle in subzellulären Organellen, sondern erlaubt vor allem ihre genaue Lokalisierung sowie Quantifizierung der Antigenverteilung innerhalb der Zelle. Außerdem können mit diesem Vorgehen besonders gut Erkenntnisse über intrazelluläre Transportprozesse gewonnen werden. Mit Hilfe des Kryomikrotoms werden bei Temperaturen von  $-100^{\circ}\text{C}$  Schnitte mit einer Dicke von bis zu 55 nm von den zuvor eingefrorenen Präparaten angefertigt. Diese äußerst geringe Schnittdicke erlaubt bei der elektronenmikroskopischen Auswertung einen sehr differenzierten und überlagerungsfreien Einblick in die Ultrastruktur der Zelle.

Ein weiterer Vorteil der Kryoimmunelektronenmikroskopie liegt darin, dass die Einbettung des Gewebes in ein Medium wie Kunstharz (zum Beispiel Epon) umgangen wird. Die Einbettung der Proben ist von großer Bedeutung, da sie für den Schneideprozess gehärtet werden müssen. Problematisch ist jedoch, dass bei anderen Einbettungstechniken mitunter hohe Temperaturen oder aggressive Trägermedien verwendet werden, welche die Antigenität des Präparats beeinflussen, was für Immunlabeling-Verfahren problematisch sein kann. Aufgrund der Tatsache, dass bei der hier verwendeten Methode meist bei sehr niedrigen Temperaturen ( $-100$  bis  $-110^{\circ}\text{C}$ ) gearbeitet und als Medium zur schonenden Fixierung Paraformaldehyd genutzt wurde, gewährleistet gegenüber dem lebenden Gewebe nahezu unveränderte antigene Eigenschaften und Ultrastruktur.

### 2.8.2 Primäre Antikörper

Im Rahmen der Kryoimmunelektronenmikroskopie wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper genutzt, um die gesuchten Antigene mTG beziehungsweise Gliadin zu markieren. Weiterhin kamen monoklonale Maus-Antikörper zum Einsatz, um bestimmte Zellkompartimente dazustellen. Diese Methode nennt sich Doppelmarkierungstechnik (engl. Double-Labeling) und erlaubt eine genaue Lokalisierung von gesuchten Antigenen innerhalb der Zelle sowie ihre Quantifizierung. Hierzu wurden ein Anti-PDI-AK und ein Anti-LAMP2-

AK verwendet, um das endoplasmatische Retikulum, beziehungsweise späte Endosomen zu markieren. Alle verwendeten Antikörper waren Immunglobuline der Klasse G.

Im Falle des Anti-mTG-AK sowie des Anti-Gliadin-AK wurden die Wirte mit dem gesamten Protein, respektive der gesamten  $\alpha$ -Gliadin-Fraktion immunisiert. Anti-LAMP2-AK und Anti-PDI-AK wurden durch Immunisierung mit Peptiden der namensgebenden Proteine hergestellt.

Im Rahmen der Kryoelektronenmikroskopie wurden folgende Primärantikörper eingesetzt:

**Tab. 2-3: Primäre Antikörper für die Immunelektronenmikroskopie.**

Antikörper	Klonalität/Wirt	Firma	Verdünnung
<b>Primäre Antikörper</b>			
Anti-mTG-AK	Polyklonal, Kaninchen	Zedira, Darmstadt, Deutschland	1:20
Anti-Gliadin-AK	Polyklonal, Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	1:30
Anti-PDI-AK	Monoklonal, Maus	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland	1:10
Anti-LAMP2- AK (CD 107b)	Monoklonal, Maus	BD Pharmingen, New Jersey, USA	1:5

### 2.8.3 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper werden genutzt, um die Bindung des primären Antikörpers an sein Antigen sichtbar zu machen. Hierfür dienen im Rahmen der Kryoelektronenmikroskopie ausschließlich polyklonale Antikörper des Typs IgG. Für ihre Produktion wurden Ziegen mit IgG-Immunglobulinen von Kaninchen oder Mäusen immunisiert und die erhaltenen Antikörper mit kolloidalem Gold konjugiert. Da Gold ein elektronendichtes Material ist, stellen sich die Partikel bei der Elektronenmikroskopie als schwarze Punkte dar und können in der Zelle gut abgegrenzt werden. Die Kopplung mit kolloidalem Gold eignet sich hervorragend für Doppelbestimmungsverfahren, da mehrere Antikörper verwendet

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

werden können, welche gegen unterschiedliche Spezies gerichtet und mit verschiedenen großen Goldpartikeln verbunden sind (195, 196).

Im Rahmen der Kryoimmunelektronenmikroskopie wurden folgende sekundäre Antikörper verwendet:

**Tab. 2-4: Sekundäre Antikörper für die Immunelektronenmikroskopie.**

Antikörper	Klonalität/Wirt	Firma	Verdünnung
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Goat-anti-Rabbit (GaR) 12nm	Polyklonal, Ziege	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK	1:40
Goat-anti-Mouse (GaM) 6nm	Polyklonal, Ziege	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK	1:2,5

#### 2.8.4 Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte

Die Fertigung der Semi- und Ultradünnschnitte erfolgte am Ultrakryomikrotom Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland).

Die an das Ultrakryomikrotom angeschlossene Kryokammer sorgte über eine Pumpe für eine konstante Stickstoffzufuhr aus einem Dewargefäß. So konnte während des gesamten Schneideprozesses eine Präparatblock- und Kammertemperatur von  $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sowie eine Messertemperatur von  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufrechterhalten werden. Diese gleichmäßig niedrige Temperatur verhinderte ein Auftauen oder gar Ablösen des Gewebes vom Präparatträgerstift und sicherte eine gleichmäßige Schnittdicke.

Sobald die Kryokammer die benötigte Temperatur erreicht hatte, konnte der Präparatträgerstift in den Block eingespannt werden. Zunächst wurde die Probe bei vierfacher Vergrößerung gemustert und ein Bereich, der Schleimhaut enthielt, identifiziert. Daraufhin wurden zuerst sogenannte Semidünnschnitte mit einer Dicke von 160 nm angefertigt. Bei diesen handelte es sich gewissermaßen um Probeschnitte, anhand derer beurteilt werden konnte, ob die angeschnittene Stelle Schleimhaut enthielt. Wenn bei einem der Schnitte genügend Mukosa zu sehen war, konnte mit der weiteren Bearbeitung der Proben fortgefahren werden.

Um Semidünnschnitte am Ultrakryomikrotom herzustellen, musste zuerst vorsichtig mit dem Glasmesser an den Gewebeblock herangefahren werden. Dann wurde das Präparat

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

manuell oder automatisch angeschnitten. Die Schnitte, die sich an der Klinge sammelten, wurden mittels Wimpernpinsel von der Schneide weggeschoben und auf der Messerfläche gesammelt. Wenn drei bis vier glatte, durchsichtige Schnitte mit leichten Interferenzfarben auf dem Messer lagen, wurden sie mit Hilfe einer mit 2,3-molaren Saccharose-lösung benetzten Platinöse zügig aufgenommen und auf einen Objektträger transferiert. Das rasche Arbeiten war in diesem Falle nötig, da sonst die Saccharose in der Kryo-kammer gefroren wäre, was zur Bildung von Eiskristallen geführt hätte.

Die Schnitte wurden daraufhin auf einer Heizplatte getrocknet und mit Toluidinblau angefärbt. Nach erneuter Trocknung konnten die Farbreste mit dH<sub>2</sub>O abgespült und das Präparat bei 10-, bis 40-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop begutachtet werden.

Wenn im Semidünnschnitt genügend Schleimhaut zu sehen war, wurde die angeschnittene Stelle mit einem Trimmdiamanten (Diatome AG, Biel, Schweiz) quadratisch herausgetrimmt.

Nach diesem Schritt konnte die Anfertigung von Ultradünnschnitten beginnen. Diese wurden bei einer Schnittdicke von 55 nm mit Hilfe eines Diamantmessers hergestellt. Die Vorgehensweise entsprach weitestgehend der oben beschriebenen, allerdings wurden die Schnitte nun nicht auf Objektträger, sondern auf spezielle Elektronenmikroskopienetze aufgetragen und bis zum Immunogold-Labeling mit der beschichteten Seite nach unten in PBS auf Eis gelagert.

### **2.8.5 Antikörperbeschichtung**

Der gesamte Vorgang der Antikörperbeschichtung erfolgte bei Raumtemperatur auf einer Folie (Parafilm M), in welche mit Hilfe einer Schablone Vertiefungen gedrückt wurden. In diese Vertiefungen wurden während des Versuchs die jeweiligen Reagenzien gegeben. Während des gesamten Versuchs mussten die Elektronenmikroskopienetze stets mit der Seite, auf der sich die Schnitte befanden, nach unten, auf den Tropfen der entsprechenden Flüssigkeit gelegt werden.

Zuerst wurden die Netze für 15 Minuten in 0,1% CWFS-Blockpuffer gelegt, um unspezifische Bindungsstellen im Gewebe zu blockieren. Anschließend erfolgte die 45-minütige Inkubation mit in CWFS verdünntem primärem Antikörper (Tab. 2-5). Um die nicht gebundenen Immunglobuline von den Präparaten zu entfernen, wurden die Netze danach für

15 Minuten über 5 Tropfen PBS gewaschen. Daraufhin fand die Inkubation mit dem sekundären, mit kolloidalem Gold gekoppelten Antikörper, analog zur Inkubation der primären Antikörper, statt. Dann folgte ein erneuter Waschschrift für 30 Minuten über 6 Tropfen PBS und anschließend für 5 Minuten über 3 Tropfen dH<sub>2</sub>O.

**Tab. 2-5: Antikörperkombinationen zur Doppelbestimmung für die verschiedenen Versuchsansätze.** Bei den primären Antikörpern wurde stets ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper mit einem monoklonalen Maus-Antikörper kombiniert. Hierbei wurden die Proteine mTG und Gliadin durch sekundäre Antikörper mit 12 nm Goldpartikeln sowie die Zellkompartimente ER und LE mittels 6nm Goldpartikeln markiert.

<b>Antikörperkombinationen</b>	
<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Sekundäre Antikörper</b>
p-mTG + m-PDI	→ GaR 12nm + GaM 6nm
p-Gliadin + m-PDI	→ GaR 12nm + GaM 6nm
p-Gliadin + m-LAMP2	→ GaR 12nm + GaM 6nm

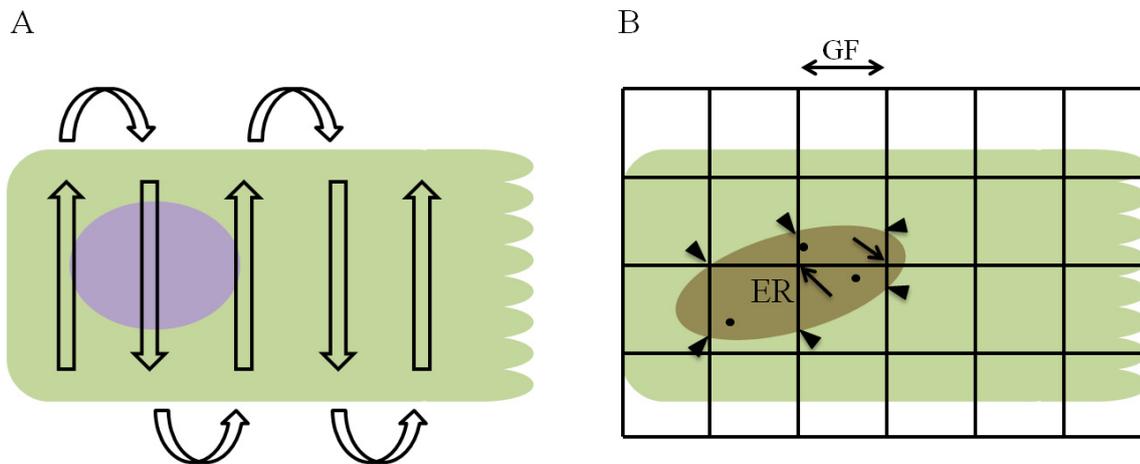
### 2.8.6 Einbettung und Kontrastierung

Um die Gefrierschnitte für die Lufttrocknung vorzubereiten, war eine Einbettung in Methylcellulose notwendig. Dieser Arbeitsschritt verhinderte die Bildung von Artefakten während der Trocknung und wurde mit einer Kontrastierung durch Uranylacetat kombiniert. Hierzu wurde ein Abschnitt Parafilm auf Eis gelegt und das Gemisch aus Methylcellulose/Uranylacetat im Verhältnis 9:1 auf drei Tropfen pipettiert. Nach 5-minütiger Einbettung konnten die Netze mit einer gestielten Platinöse aufgenommen werden. Die überschüssige Methylcellulose wurde sorgfältig mittels Filterpapier entfernt, um Artefakte zu vermeiden. Zum Schluss konnten die Netze auf den Platinösen in eine Plastikkammer gesteckt werden, um dort für 30 Minuten an der Luft zu trocknen.

### 2.8.7 Quantitative Auswertung der antikörperbeschichteten EM-Netze

Die Auswertung der Elektronenmikroskopienetze erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (TEM, Philips, Model EM 401). Das Labeling der Antikörper wurde durch die elektronendichten Goldpartikel, welche an die sekundären Antikörper gebunden waren, visualisiert. Die Partikel stellten sich am Mikroskop als dunkle Punkte von 6nm, beziehungsweise 12 nm dar und konnten gut gegenüber anderen Strukturen abgegrenzt werden. Um

die Markierungen auszuzählen, wurde ein Enterozyt angesteuert und mäanderförmig durchmusterter (Abb. 2-2).



**Abb. 2-2: Mäanderförmige Durchmusterung der Zelle sowie Bestimmung der Oberflächen- und Markierungsdichte des ER.** (A) Mäanderförmige Durchmusterung der Zelle während der Quantifizierung. (B) Bestimmung der Schnittstellen des Gitters an der ER-Membran sowie im ER-Lumen zur Flächenberechnung. Pfeile = Schnittstellen im Lumen, Pfeilspitzen = Schnittstellen an der Membran, GF = Gitterfaktor (Abstand zwischen Gitterlinien, hier 4000  $\mu\text{m}$ ), Punkte = 12 nm Goldpunkte.

Diese Art der Durchmusterung des Präparats verhinderte eine akzidentelle Mehrfachzählung einzelner Goldpartikel. Es wurden stets 100 Goldpunkte der Größe 12 nm ausgezählt. Diese markierten, je nach Versuchsreihe, entweder mTG oder FF. Für jeden ausgezählten Goldpunkt wurde auf einem standardisierten Bogen notiert, in welchem Zellkompartiment er sich befand. Zählte man in einer Epithelzelle weniger als 100 Goldpunkte, so wurde die Auswertung im benachbarten Enterozyt fortgesetzt.

Die Erkennung der zellulären Kompartimente erfolgte zum einen anhand spezifischer ultrastruktureller Merkmale, zum anderen durch die Markierung mittels Antikörpern (Tab. 2-6). So wurde in den ersten beiden Versuchsansätzen das raue endoplasmatische Retikulum durch einen Anti-PDI-AK sowie in der letzten Versuchsreihe späte Endosomen durch einen Anti-LAMP2-AK markiert.

Als Negativkontrolle wurden in dieser Arbeit die Zellkerne von Lymphozyten genutzt, welche für gewöhnlich keine Aufnahme von Proteinen zeigen.

Tab. 2-6: Zelluläre Strukturen und ihre Definition.

Abkürzung	Zelluläres Kompartiment	Identifizierung
AM	Apikale Membran	Mikrovilli, begrenzt durch <i>tight junctions</i>
BL	Basolaterale Membran	Basale und laterale Zellgrenze
EE	Frühe Endosomen	Membranbegrenzte, rundliche Struktur, Anti-LAMP2-AK negativ (3. Versuchsreihe)
ER	Raues endoplasmatisches Retikulum	Membranbegrenzt, Anti-PDI-AK positiv (1. und 2. Versuchsreihe)
Go	Golgi-Apparat	Membranstapel mit Vesikeln
LE	Späte Endosomen	Membranbegrenzte, rundliche Struktur, anti-LAMP2-AK positiv (3. Versuchsreihe)
Ly	Lymphozyten	Einzelne Zellen mit schmalen Zytoplasmasaum
Mi	Mitochondrien	Membranbegrenzt, Ultrastruktur mit Cristae
N	Zellkerne	Membranbegrenzt, basale Lage, Eu- und Heterochromatin
V	Vakuole	Membranbegrenzte, rundliche Struktur
Zy	Zytosol	Umgibt restliche Strukturen

RACE-Zellen innerhalb des Epithelverbands wurden nach den folgenden Kriterien identifiziert (siehe 1.5):

1. Geringe Elektronendichte des Zytosols
2. Verminderte Mikrovilli
3. Randständig kondensiertes Heterochromatin

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Die Quantifizierung der Antigenaufnahme von RACE-Zellen erfolgte durch Auszählung von jeweils 10 RACE-Zellen zweier Kontroll- und Zöliakiepatienten. Um die Oberflächen- und Markierungsdichte des ER in RACE-Zellen und Enterozyten zu bestimmen, wurden 10 elektronenmikroskopische Aufnahmen jeder Zellart in 3 Kontroll- und 3 Zöliakieproben bei einer 24.400-fachen Vergrößerung erstellt. Anschließend wurde die Fläche des ER in jedem Bild durch Auszählung der Schnittstellen mittels eines speziellen Gitters bestimmt (Abb. 2-2). Da es sich bei der Bestimmung der Oberflächendichte um eine antikörperunabhängige Quantifizierung handelte, wurden die Aufnahmen der Proben, welche mit mTG allein oder gemeinsam mit FF inkubiert waren, gemeinsam ausgewertet. Schlussendlich wurden die Oberflächen- und Markierungsdichte mithilfe folgender Formeln errechnet:

<p><b>A</b></p> <p>Oberflächendichte (<math>\mu\text{m}^{-1}</math>):</p> $\frac{\text{SS Membran} \times \text{VG}}{(\text{SS Lumen} \times \text{GF})}$	<p><b>B</b></p> <p>Markierungsdichte (<math>\text{GP}/\mu\text{m}^2</math>):</p> $\frac{(\text{GP} \times \text{VG}^2)}{(\text{SS Lumen} \times \text{GF}^2)}$
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Abb. 2-3: Formeln zur Berechnung von Oberflächen- und Markierungsdichte.**

(A) Berechnung der Oberflächendichte (surface density), welche antiproportional zur Oberfläche ist. (B) Berechnung der Markierungsdichte (labelling density), diese gibt die Anzahl an Goldpunkten pro  $\mu\text{m}^2$  Fläche an. SS Membran = Schnittstellen der ER-Membran mit dem Gitter, SS Lumen = Schnittstellen des ER-Lumens mit dem Gitter, VG = Vergrößerung (hier 24.400x), GF = Gitterfaktor (Abstand zwischen Gitterlinien, hier 4000  $\mu\text{m}$ ), GP = Anzahl Goldpunkte im ER.

Die Oberflächendichte ist hierbei antiproportional zu der durch das ER eingenommenen Fläche, da mit zunehmender Größe des Organells die Schnittstellen innerhalb des Lumens stärker zunehmen, als die Schnittstellen der Membran des ER, das heißt, je kleiner die Oberflächendichte, desto größer die jeweilige Oberfläche (197).

### 2.8.8. Statistische Auswertung

Die Auszählung der antikörpermarkierten Proteine am Elektronenmikroskop wurde tabellarisch in Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) dokumentiert. Die statistische Analyse wurde mittels SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 21 (IBM, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Alle Daten wurden per Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft, da dieser sich besonders gut für Stichproben geringer Größe ( $n < 50$ ) eignet. Anschließend erfolgte die

Berechnung des Signifikanzniveaus bei normalverteilten Daten mittels T-Test für unabhängige Stichproben sowie bei nicht normalverteilten Daten mittels Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde in dieser Studie auf 0,05 festgelegt.

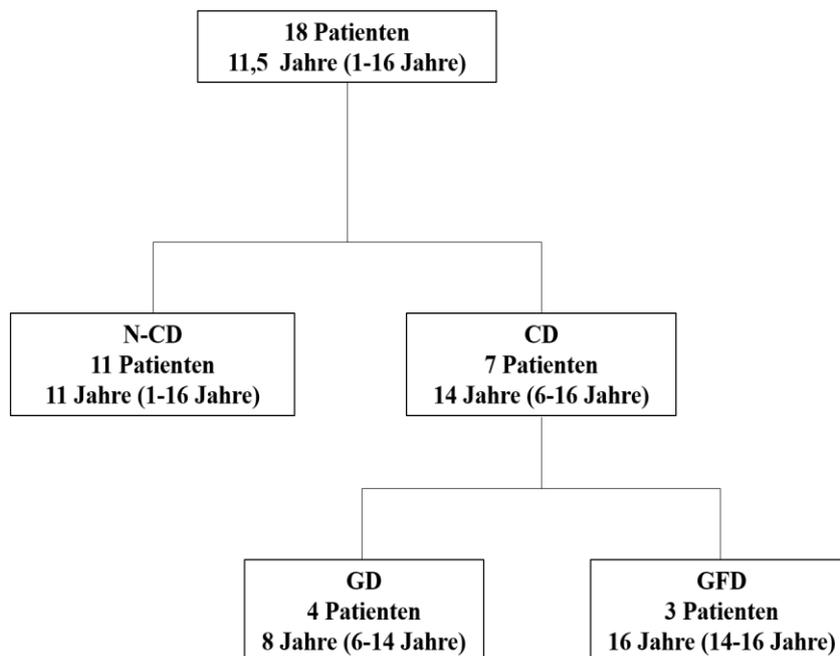
Für die graphische Darstellung wurde GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., La Jolla, USA) verwendet. Bei normalverteilten Daten wurde der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung, bei nicht normalverteilten Daten der Median und das Interquartilintervall als Verteilungsmaße angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patienten

#### 3.1.1 Patienteneinteilung

Das Studienkollektiv von 18 Patienten unterteilte sich in die Gruppen Nicht-Zöliakie (NCD) und Zöliakie (CD). Letztere wurde noch weiter gegliedert in die Gruppen glutenhaltige (GD) und glutenfreie Diät (GFD) (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1: Aufteilung der Patientengruppen.**

Median (Bereich).

#### 3.1.2 Nicht-Zöliakie-Patienten

Die Gruppe der Nicht-Zöliakie-Patienten (n = 11) umfasste die folgenden Erkrankungen:

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

- Eosinophile Ösophagitis (n=2)
- Colitis Ulcerosa (n=1)
- Helicobacter-assoziierte Gastritis (n=2)
- Typ C-Gastritis (n=2)

Jeweils zwei Patienten wurden zum Ausschluss einer CED oder einer Zöliakie biopsiert. Histologisch zeigten sich jedoch Normalbefunde, sodass in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik die Erkrankungen ausgeschlossen werden konnten. Bei sämtlichen Kontrollpatienten bestand keinerlei Hinweis auf eine glutensensitive Enteropathie.

### **3.1.3 Zöliakiepatienten**

Unter glutenhaltiger Diät wiesen alle Zöliakiepatienten stark erhöhte Anti-TG2-IgA-AK-Titer, sowie eine schwerwiegende Entzündung der Dünndarmschleimhaut von MARSH Grad IIIa-c auf. Die Patienten mit vorbekannter Zöliakie unter glutenfreier Ernährung zeigten Anti-TG2-IgA-AK-Titer sowohl im unauffälligen, als auch im stark positiven Bereich, während die Entzündungsaktivität des Duodenums von MARSH Grad 0-IIIa reichte. Hierbei stach vor allem der Patient ST016 heraus, welcher trotz anamnestisch eingehaltener glutenfreier Diät deutlich erhöhte TG2-IgA-AK sowie histologisch eine Entzündung Marsh IIIa-b aufwies. Dies ist am ehesten durch die bei diesem Patienten vorbekannte schlechte Adhärenz zur glutenfreien Diät begründet. Für die weitere Analyse spielt dies jedoch keine Rolle, da die Zöliakiepatienten stets als gesamte Gruppe, unabhängig von der Art der Ernährung, untersucht wurden.

### 3.1.4 Patientendaten

Tab. 3-1: Patientendaten. \* (U/ml).

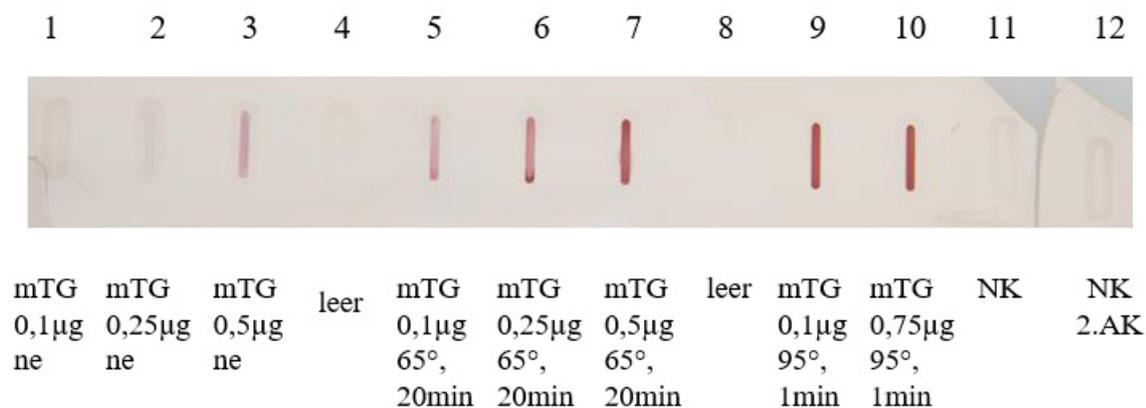
Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	GFD	Marsh	TG2-IgA-AK*	HLA
ST014	11	w	Kontrolle	Nein	0	<2	n.u.
ST015	6	m	Zöliakie	Nein	IIIa-b	637,7	n.u.
ST016	16	w	Zöliakie	Ja	IIIa-b	132,67	DQ2
ST019	12	m	Kontrolle	Nein	0	2,32	n.u.
ST020	11	m	Kontrolle	Nein	0	<2	n.u.
ST024	10	m	Kontrolle	Nein	0	<2	n.u.
ST027	14	w	Kontrolle	Nein	0	n.u.	n.u.
ST028	1	w	Kontrolle	Nein	0	<2	n.u.
ST029	16	m	Kontrolle	Nein	0	<2	n.u.
ST032	9	w	Zöliakie	Nein	IIIb-c	>200	DQ2
ST034	7	w	Zöliakie	Nein	IIIb-c	>200	n.u.
ST036	13	w	Kontrolle	Nein	0	<2	DQ2
ST037	14	w	Zöliakie	Nein	IIIb-c	>200	n.u.
ST038	16	w	Zöliakie	Ja	0	20,58	n.u.
ST039	7	w	Kontrolle	Nein	0	<2	DQ2
ST040	15	m	Kontrolle	Nein	0	n.u.	n.u.
ST041	14	w	Zöliakie	Ja	0-I	12,64	DQ2
ST042	7	m	Kontrolle	Nein	0	<2	DQ2/D Q8

### 3.2 Slot-Blot

Das Slot-Blot-Verfahren wurde genutzt, um den Effekt der Erhitzung, wie sie bei Einsatz der mTG im Rahmen der Lebensmittelproduktion vorkommt, auf die Antigenität des Proteins zu untersuchen.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Hierzu wurde die mTG für 20 Minuten auf 65°C, respektive für 1 Minute auf 95°C erhitzt. Wie erwartet, konnte eine dosisabhängige Steigerung der Immunreaktivität des p-mTG-AK dargestellt werden. Unabhängig davon kam es bei den erhitzten Proben zu einem intensiveren Farbumschlag als bei den nicht erhitzten. Dieser Effekt konnte besonders in den Slots beobachtet werden, bei denen das Protein auf 95°C erhitzt worden war (Abb. 3-2, Slots 9 und 10). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Antigenität der mTG und somit auch womöglich der mTG-Protein-Komplexe durch einen Erhitzungsprozess im Rahmen der weiteren Verarbeitung der Lebensmittel, gesteigert werden kann.



**Abb. 3-2: Erhöhte Immunreaktivität des p-mTG-AK gegenüber erhitzter mTG.**

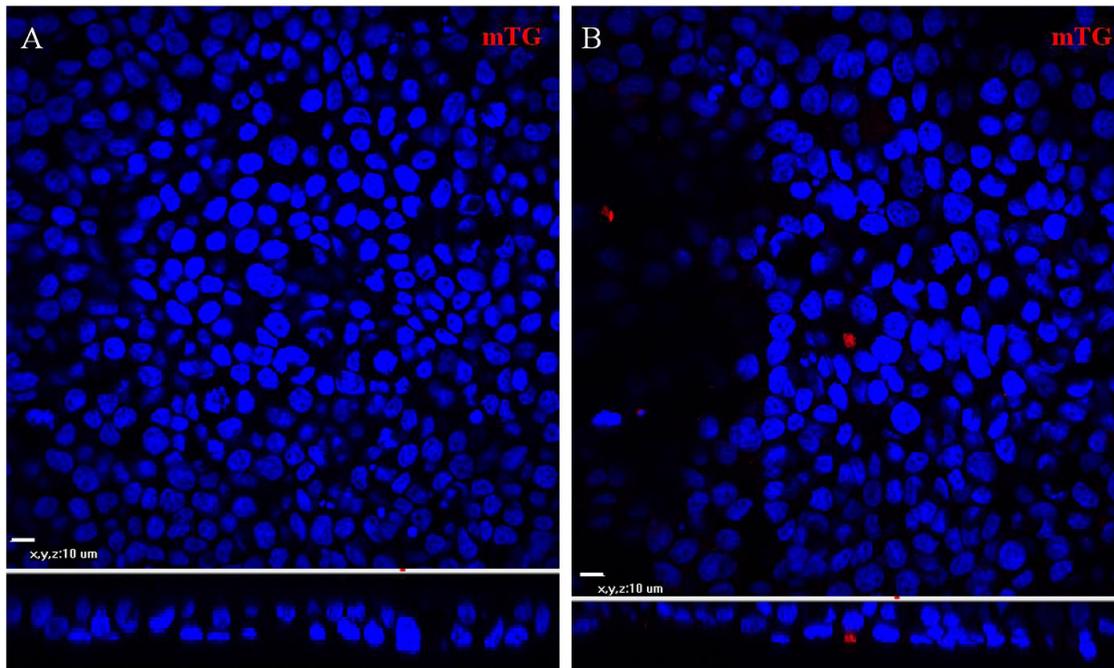
Die Abbildung zeigt einen dosisabhängigen Farbumschlag auf allen Slots, die mit mTG beladen waren. Dabei ließ sich eine intensivere Rotfärbung bei den Slots mit der erhitzten mTG nachweisen (Slot 5-7, 9-10). Die stärkste Reaktion des Antikörpers trat in den Slots, in denen die mTG für 1 min auf 95°C erhitzt wurde, auf (Slot 9-10). In den für die Negativkontrollen bestimmten Slots trat kein Farbumschlag auf (Slot 11-12). Abkürzungen: ne = nicht erhitzt, NK = Negativkontrolle.

### 3.3 Immunfluoreszenz

#### 3.3.1 Zeitabhängige Aufnahme von mTG durch HT-29-Zellen

HT-29-Zellen dienen als *in vitro*-Modell für adhärente intestinale Epithelzellen und nehmen wie diese Nahrungsmittelproteine via transzellulären Transport auf. Ziel dieser Versuchsreihe war es, die zeitabhängige Aufnahme der mTG unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen.

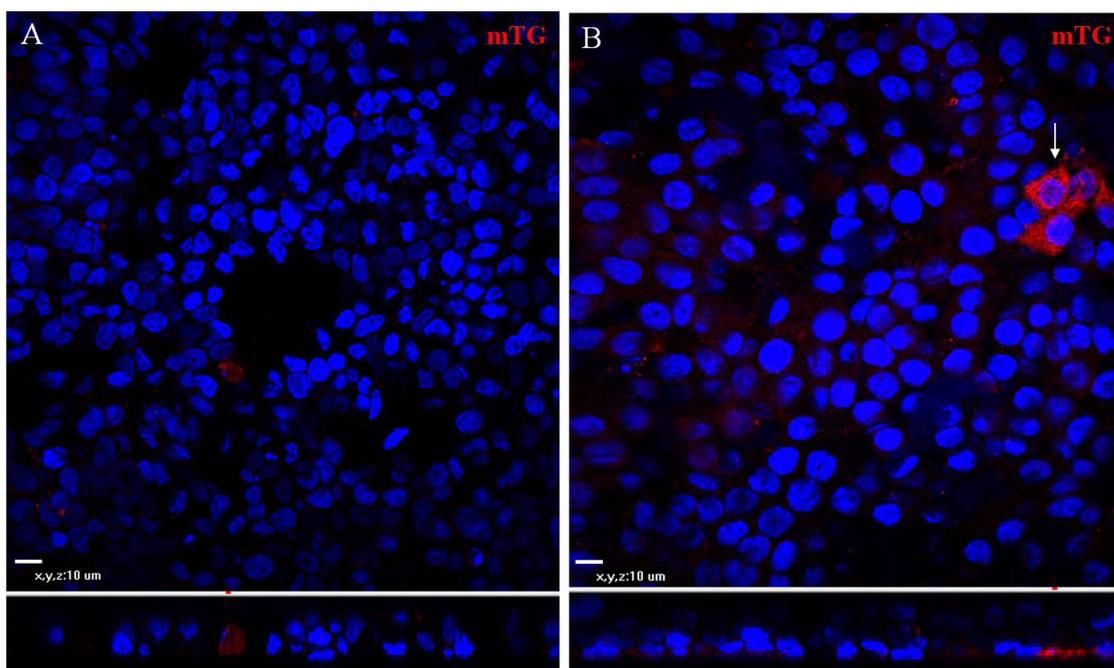
Während in nativen Proben keine mTG nachgewiesen werden konnte, zeigten sich in den Zellen, welche über 10 Minuten mit dem Protein inkubiert wurden, wenige intrazelluläre Signale (Abb. 3-3 A, B).



**Abb. 3-3: Nachweis der mTG in nativen HT-29-Zellen.**

Native und 10-minütig inkubierte HT-29-Zellen wurden in PFA fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet. Die mTG wurde mittels p-mTG-AK detektiert und mit dem Alexa Flour Farbstoff 555 rot angefärbt. Die Zellkerne erscheinen durch den Höchst-Farbstoff bläulich, im unteren Bildabschnitt ist eine Seitansicht dargestellt. (A) Keine Markierung der mTG in nativen HT-29-Zellen. Im Vergleich hierzu zeigte sich eine einzelne positive Zelle nach 10-minütiger Inkubation mit 200  $\mu\text{g/ml}$  mTG (B). Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

Bei 30- (Bild A) und 60-minütiger (Bild B) Inkubation mit mTG konnte zeitabhängig sowohl eine erhöhte Anzahl mTG-positiver Zellen als auch eine intensivere Markierung dieser festgestellt werden (Abb. 3-4 A, B).



Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

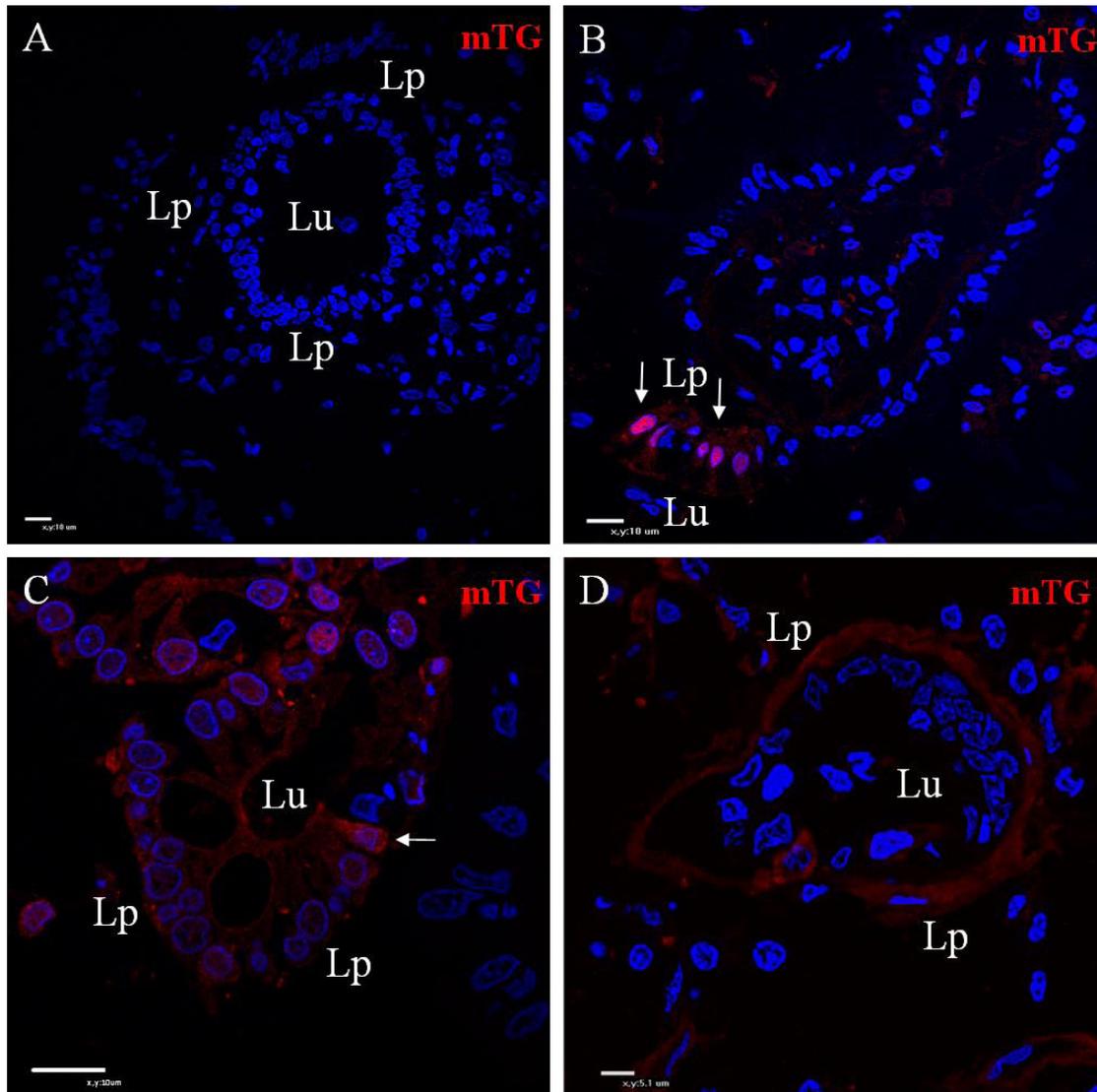
**Abb. 3-4: Nachweis der mTG in HT-29-Zellen nach 30- und 60-minütiger Inkubation.**

Die mTG wurde mittels p-mTG-AK detektiert und mit dem Alexa Flour Farbstoff 555 rot angefärbt. Die Zellkerne erscheinen durch den Höchst-Farbstoff bläulich, im unteren Bildabschnitt ist eine Seitansicht dargestellt. (A) Starkes Signal innerhalb einer Zelle nach 30-minütiger Inkubation mit mTG. (B) Drei stark positive Zellen, davon eine mit nukleärem Signal (Pfeil) nach 60-minütiger Inkubation mit mTG. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 mTG-Aufnahme in Enterozyten der Darmschleimhaut

Um die Aufnahme der mTG auf lichtmikroskopischer Ebene *ex vivo* zu charakterisieren wurden native und inkubierte Duodenalbiopsien mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Hierbei konnte mTG, wie auch in der Zellkultur, in nativem Gewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-5 A). Bei einstündiger Inkubation mit mTG ließ sich eine gleichmäßige Verteilung des Antigens in einzelnen Enterozyten darstellen. Hierbei zeigte sich eine intrazelluläre Markierung mit Hervorhebung der basolateralen und apikalen Membran. Weiterhin wurde die mTG auch extrazellulär, hier vor allem im subepithelialen Raum, detektiert (Abb. 3-5 D). Analog zu den Zellkulturversuchen konnten auch hier Zellen beobachtet werden, die eine intensive Markierung in Zytoplasma und Zellkern aufwiesen, wobei dieses Phänomen auf einzelne Zellen, oder kleinere Zellgruppen beschränkt blieb (Abb. 3-5 B, C). Hierbei handelt es sich um sogenannte RACE-Zellen mit charakteristischer nukleärer und zytoplasmischer Antigen-Aufnahme.



**Abb. 3-5: Nachweis der mTG in Duodenalbiopsien nach 60-minütiger Inkubation.**

Duodenalbiopsien nativ und nach 60-minütiger Inkubation mit 200  $\mu\text{g/ml}$  mTG. Die mTG wurde mittels p-mTG-AK detektiert und mit dem Alexa Fluor Farbstoff 555 rot angefärbt. Die Zellkerne erscheinen durch den Höchst-Farbstoff bläulich. (A) Kein Nachweis der mTG in nativer Biopsie. (B) Starke nukleäre Antigenaufnahme durch RACE-Zellen (Pfeile). (C) Homogenes Fluoreszenzmuster einer Krypte mit einer intensiv markierten RACE-Zelle (Pfeil). (D) Gleichmäßige Färbung der *Lamina propria* einer Krypte. LP = *lamina propria*, Lu = Lumen. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

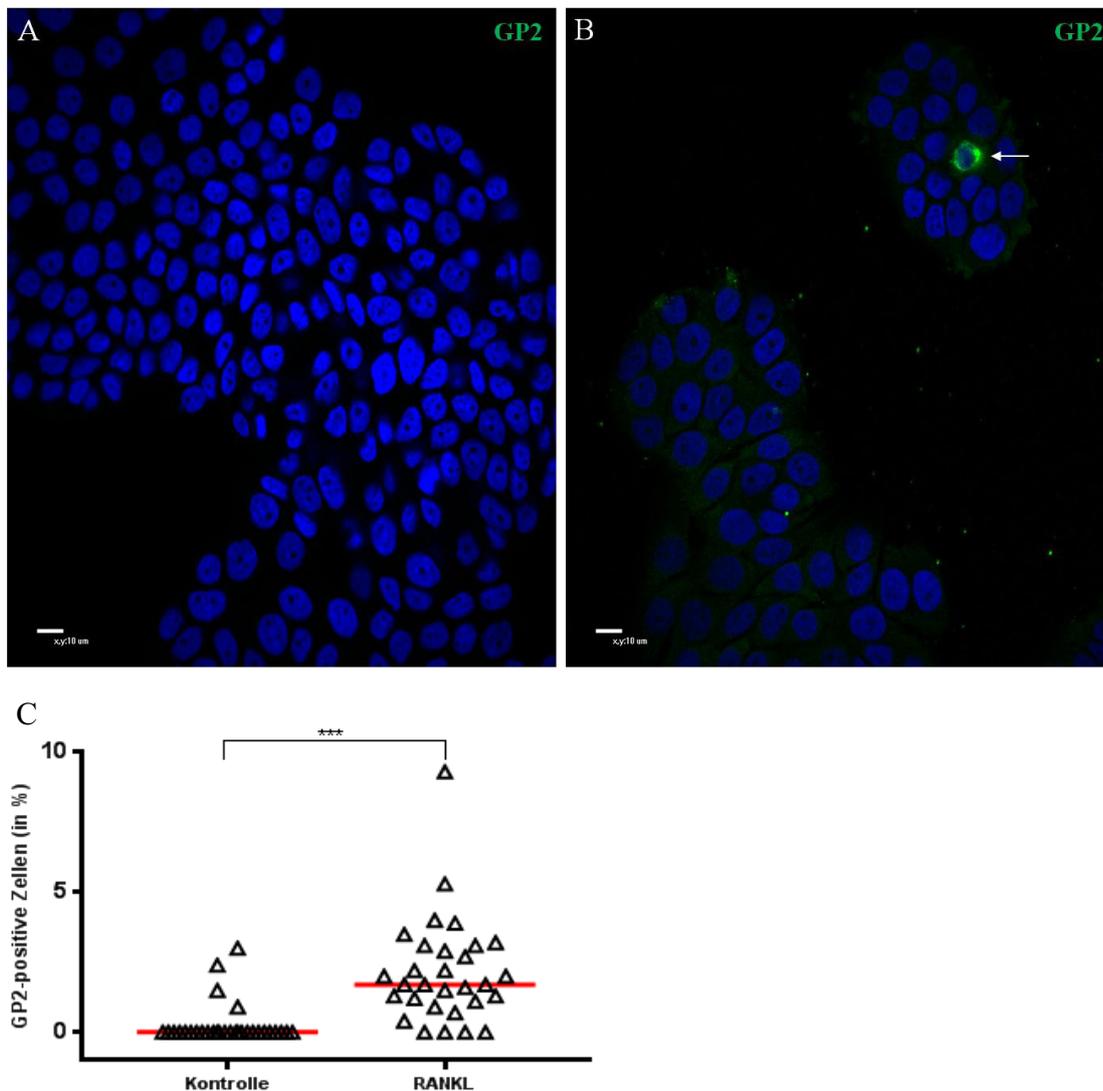
### 3.3.4 Gesteigerte GP2-Expression und Antigenaufnahme durch RANKL

Ein weiterer Versuchsaufbau unter Verwendung der Immunfluoreszenz wurde genutzt, um zu untersuchen, ob durch eine Zytokin-Stimulation *in vitro* RACE-Zellen entstehen können und ob sich diese durch eine vermehrte Expression des M-Zell-Markers GP2 (Glykoprotein 2) charakterisieren lassen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, erfolgte die Behandlung

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

differenzierter Darmepithelzellen mit RANKL, einem Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, welches bekannterweise die Differenzierung von intestinalen Stammzellen zu M-Zellen induzieren kann.

Als Marker für die Differenzierung der HT-29-Zellen zu RACE-Zellen diente hier die Expression von GP2, auf die native und viertägig mit RANKL inkubierte HT-29-Zellen untersucht wurden. Während in nativen Proben nur auf 4 von 30 Bildern eine leichte Expression des Moleküls beobachtet werden konnte, stellten sich nach Stimulation im Mittel 1,7% der Zellen GP2-positiv dar (IQA (Interquartilsabstand) 1,05; 3,1;  $p \leq 0,001$ , Abb. 3-6).

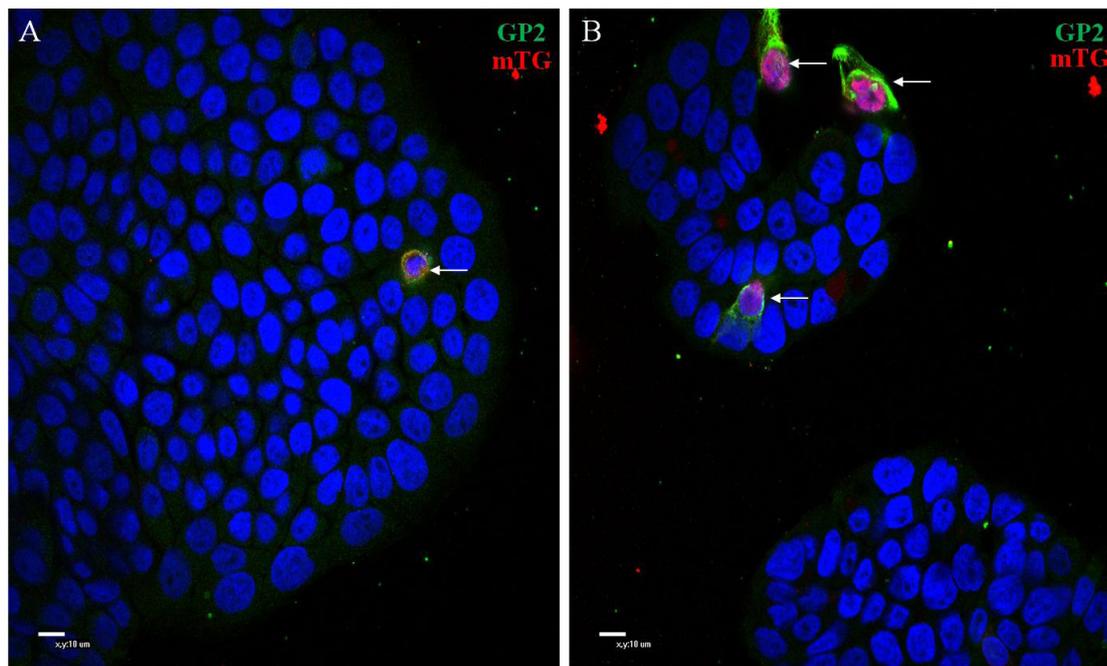


**Abb. 3-6: Steigerung der GP2-Expression in HT-29-Zellen durch RANKL.**

HT-29-Zellen nativ (A) und mit RANKL inkubiert (200 ng/ml, 4 Tage) (B). Die Markierung des M-Zell-Markers GP2 erfolgte mittels m-GP2-AK und Alexa Fluor Farbstoff 488 grün. (A) Fehlender Nachweis einer GP2-Expression in nativen Zellen. (B) Einzelne Zelle mit zytosolischem Nachweis von GP2 (Pfeil). Balken

= 10  $\mu\text{m}$ . (C) Es zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der Häufigkeit GP2-exprimierender Zellen nach RANKL-Stimulation. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Um den Einfluss von RANKL auf die Antigenaufnahme GP2-positiver Zellen zu untersuchen, wurden native und mit RANKL stimulierte HT-29-Zellen für eine Stunde mit mTG inkubiert und anschließend die Expression von GP2 und die Aufnahme der mTG untersucht.



**Abb. 3-7: Antigenaufnahme durch GP2-positive HT-29-Zellen nach RANKL-Stimulation.**

HT-29-Zellen nach RANKL-Stimulation (200 ng/ml, 4 Tage) und Inkubation mit mTG (200  $\mu\text{g/ml}$ , 1 Stunde). Die Markierung von GP2 erfolgte mittels m-GP2-AK und Alexa Fluor Farbstoff 488 grün, mTG wurde mittels p-mTG-AK und Alexa Fluor Farbstoff 555 rot detektiert. (A) Einzelne Zelle mit zytosolischer Markierung von mTG und GP2. (B) Drei Zellen mit zytosolischem Nachweis von GP2 und nukleärem mTG-Label (Pfeile). Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

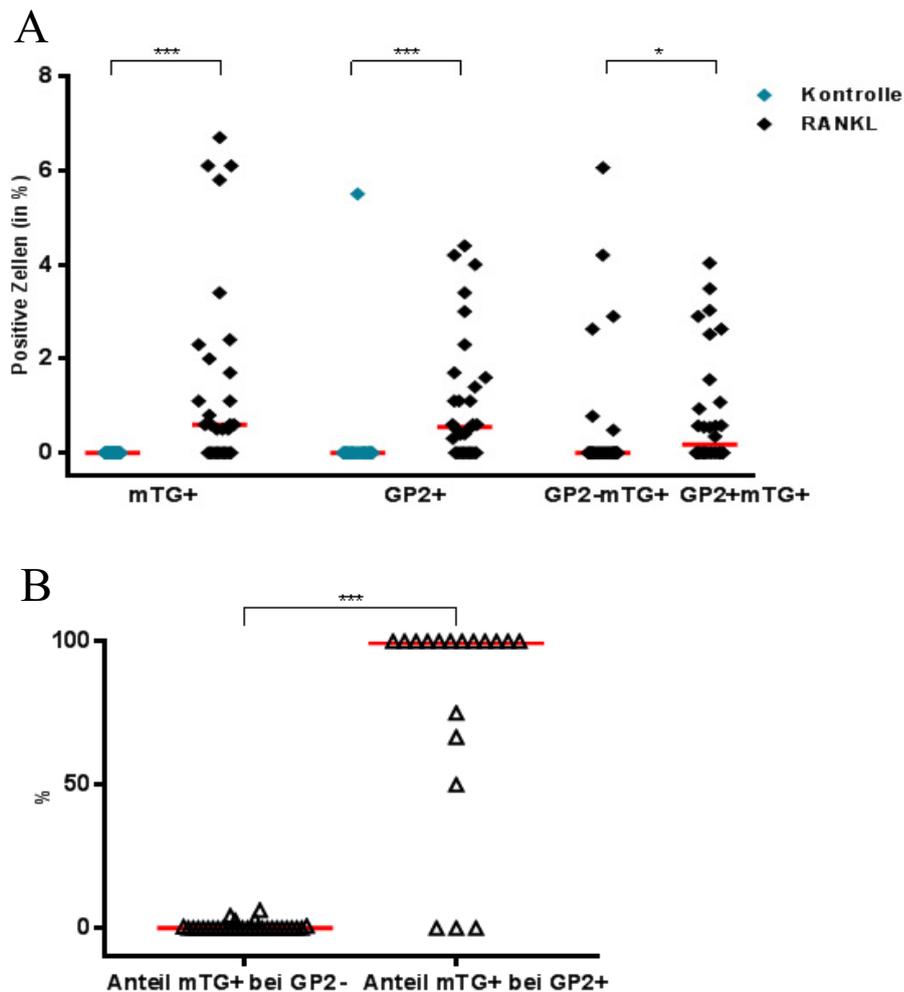
Es bestätigte sich die signifikante Steigerung der Häufigkeit GP2-exprimierender Zellen nach RANKL-Stimulation, wenn auch ihr Anteil hier nur auf 0,55% erhöht werden konnte (IQA 0; 1,6; Kontrolle: keine GP2-Expression bis auf einen Ausreißer (5,5%);  $p \leq 0,001$ ).

Während in der Kontrollgruppe keine Aufnahme der mTG zur Darstellung kam, waren nach RANKL-Stimulation rund 0,6% der Zellen mTG-positiv (IQA 0; 2,1;  $p \leq 0,001$ ). Es zeigte sich, dass GP2-exprimierende Zellen häufig eine starke Antigenaufnahme aufwiesen, wobei neben einer intensiven zytosolischen Markierung auch der Nachweis der mTG

innerhalb des Zellkerns auffiel. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich bei den GP2-positiven Zellen um RACE-Zellen handeln könnte (Abb. 3-7).

Um zu klären, ob die Expression von GP2 eine Voraussetzung für die Antigenaufnahme war, wurden GP2-negative und GP2-positive Zellen auf die Aufnahme von mTG untersucht. Da in der Kontrollgruppe keine GP2-positiven Zellen induziert werden konnten, wurden hierzu ausschließlich immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen stimulierter HT-29-Zellen ausgewertet.

Obwohl sich nach RANKL-Stimulation rund 99% der Zellen GP2-negativ darstellten, konnte bei diesen nur vereinzelt eine Aufnahme der mTG beobachtet werden (80% der Bilder 0% mTG-aufnehmende Zellen, 20% zwischen 0,48-6,06% mTG-Aufnahme, Abb. 3-8 A). Hingegen zeigten GP2-exprimierende Zellen, trotz ihrer sehr geringen Anzahl, eine verglichen mit GP2-negativen Zellen signifikant häufigere Aufnahme der mTG (0,17%; IQA 0; 1,2;  $p = 0,036$ ). Der Anteil mTG-aufnehmender Zellen, unter denen die GP2 exprimierten, war dabei deutlich höher als bei solchen ohne Expression dieses Moleküls ( $p \leq 0,001$ , Abb. 3-8 B).

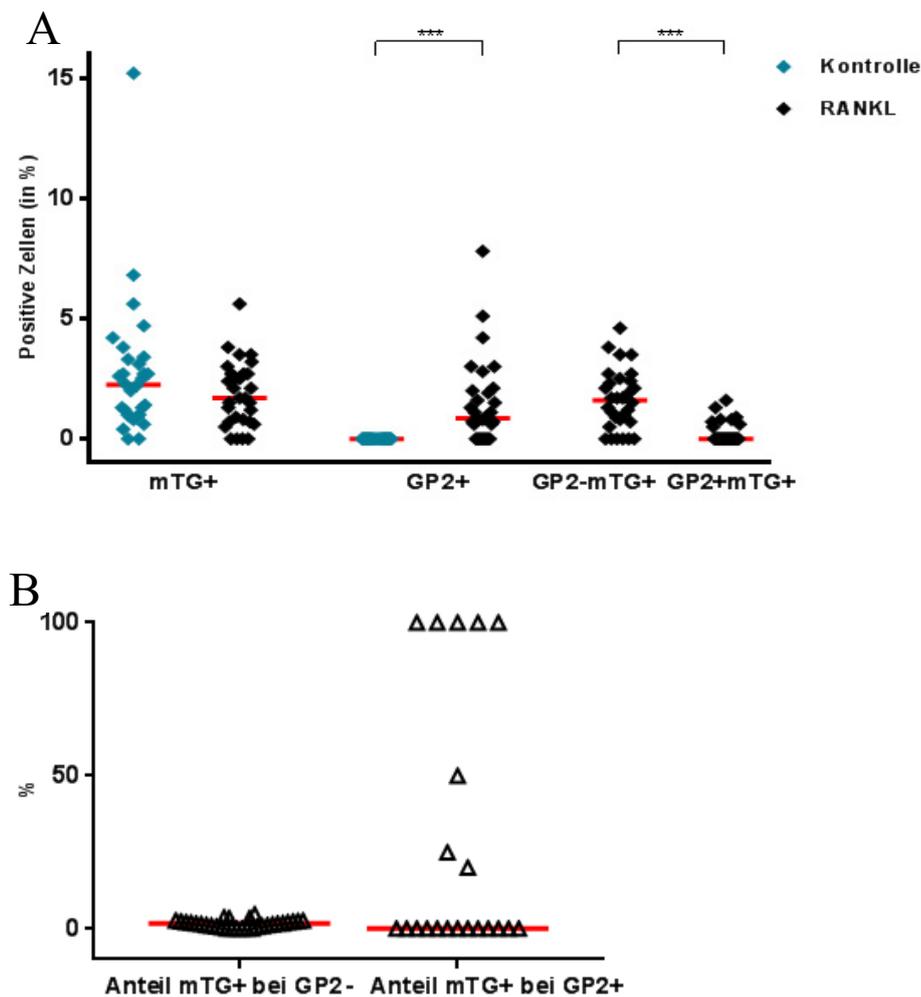


**Abb. 3-8: Einfluss von RANKL auf die Expression von GP2 und die Aufnahme von mTG bei einstündiger Inkubation mit mTG.** (A) Relative Anzahl GP2<sup>+</sup> und mTG<sup>+</sup>, sowie GP2<sup>-</sup>mTG<sup>+</sup> und GP2<sup>+</sup>mTG<sup>+</sup> Zellen mit und ohne Stimulation durch RANKL nach 1-stündiger Inkubation mit mTG. (B) Anteil mTG-aufnehmender Zellen mit und ohne GP2-Expression. (A) Es konnte eine signifikante Steigerung der Anzahl mTG<sup>+</sup> und GP2<sup>+</sup> Zellen durch RANKL-Stimulation nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich signifikant mehr GP2<sup>+</sup>mTG<sup>+</sup> Zellen als GP2<sup>-</sup>mTG<sup>+</sup>. (B) Anteil mTG<sup>+</sup> bei GP2<sup>-</sup> Zellen 80% der Fälle bei 0%, 20% zwischen 0-6,25%; Anteil mTG<sup>+</sup> bei GP2<sup>+</sup> Zellen 66% bei 100% und 33% zwischen 0-75% mTG-Aufnahme. Rote Linie = Median. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Um eine stärkere Antigenaufnahme und somit möglicherweise einen größeren Effekt der RANKL-Stimulation zu erreichen, wurde in der Folge die Inkubationszeit der mTG auf 6 Stunden verlängert. Hierauf zeigte sich eine deutliche Steigerung der Antigenaufnahme in der Kontroll- sowie Stimulationsgruppe im Vergleich zur einstündigen Behandlung mit mTG (Kontrolle 2,25%; IQA 0,98; 3,33 vs. RANKL-Stimulation 1,7%; IQA 0,7; 2,7;  $p = 0,3$ ). Ein Effekt der RANKL-Stimulation auf die Antigenaufnahme konnte in diesem Setting jedoch nicht bestätigt werden. Während native Zellen keine GP2-Expression zeigten,

ließ sich dieses Molekül bei 0,85% der stimulierten HT-29-Zellen nachweisen (IQA 0; 2,03;  $p \leq 0,001$ , Abb. 3-9 A).

Im Gegensatz zur einstündigen Inkubation mit mTG konnten hier signifikant häufiger GP2-negative Zellen mit Antigenaufnahme als GP2-positive beobachtet werden (GP2<sup>-</sup>mTG<sup>+</sup> 1,6%; IQA 0,65; 2,43 vs. GP2<sup>+</sup>mTG<sup>+</sup> 0%; IQA 0; 0,53;  $p \leq 0,001$ , Abb.3-9 A). Dabei unterschied sich die Häufigkeit der Aufnahme der mTG nicht zwischen Zellen mit und ohne GP2-Expression (GP2<sup>-</sup> 1,65%; IQA 0,65; 2,43 vs. GP2<sup>+</sup> 0%; IQA 0; 75;  $p = 0,485$ , Abb. 3-9 B).

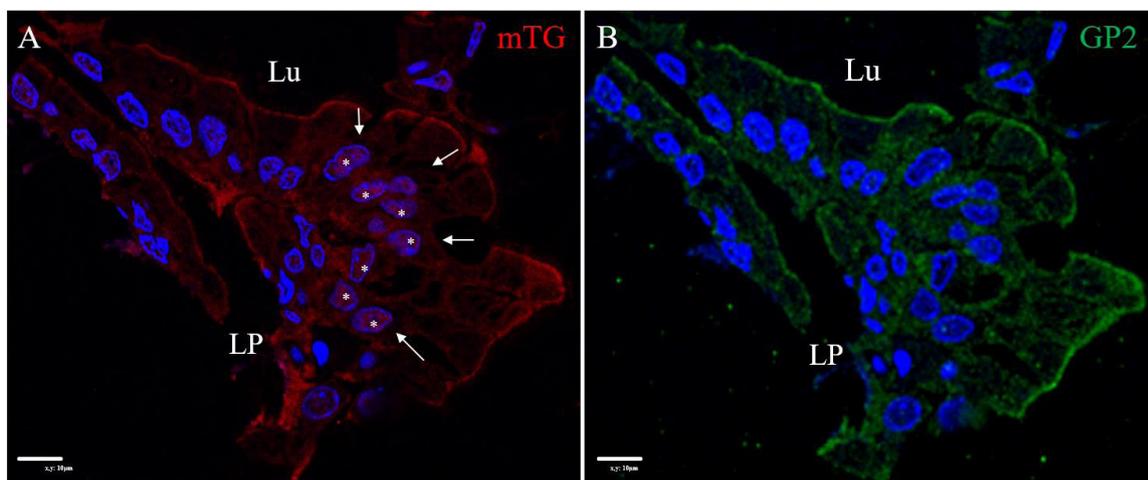


**Abb. 3-9: Einfluss von RANKL auf die Aufnahme von mTG bei 6-stündiger Inkubation mit mTG.** (A) Relative Anzahl GP2<sup>+</sup> und mTG<sup>+</sup> sowie GP2<sup>-</sup>mTG<sup>+</sup> und GP2<sup>+</sup>mTG<sup>+</sup> Zellen mit und ohne Stimulation durch RANKL, nach 6-stündiger Inkubation mit mTG. (B) Anteil mTG-aufnehmender Zellen bei GP2<sup>-</sup> und GP2<sup>+</sup> Zellen. (A) Nach 6-stündiger Inkubation zeigte sich keine RANKL-abhängig gesteigerte Aufnahme der mTG bei HT-29-Zellen. Allerdings konnte eine deutlich erhöhte Antigenaufnahme in beiden Gruppen im Vergleich zur 1-stündigen Inkubation mit mTG nachgewiesen werden. Die Expression von GP2 stieg wie im Vorversuch RANKL-abhängig an. (B) Kein Unterschied im Anteil mTG-aufnehmender Zellen mit und ohne GP2-

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Expression (mTG-Aufnahme bei GP2<sup>+</sup> Zellen: 62% bei 0% mTG-Aufnahme, 38% zwischen 20-100% mTG-Aufnahme). Rote Linie = Median. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Alle nicht aufgeführten  $p$ -Werte waren nicht signifikant.

Um den Zusammenhang zwischen der Expression des M-Zell-Markers GP2 und der Antigenaufnahme bei RACE-Zellen weiter zu analysieren, wurde eine immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der gewonnenen Duodenalbiopsien durchgeführt. Hierbei zeigten sich klassische RACE-Zellen innerhalb des Darmepithels mit starker zytosolischer und nukleärer Aufnahme der mTG. Weiterhin konnte in RACE-Zellen im Gegensatz zu normalen Enterozyten eine Expression von GP2, vor allem im Bereich der apikalen Membran, beobachtet werden (Abb. 3-10).



**Abb. 3-10: Expression von GP2 durch RACE-Zellen *ex vivo*.**

(A und B) Nachweis der Aufnahme von mTG mittels p-mTG-AK und Alexa Fluor Farbstoff 555 rot, sowie der GP2-Expression mittels m-GP2-AK und Alexa Fluor Farbstoff 488 grün innerhalb einer Duodenalbiopsie. Dargestellt ist der Nachweis des spezifischen M-Zell-Markers GP2 im Bereich der apikalen Membran sowie des Zytosols von RACE-Zellen mit typischer nukleärer und zytosolischer Antigenaufnahme. LP = *Lamina propria*, Lu = Lumen. \*Zellkerne mit starker Antigenaufnahme. Balken = 10 µm.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Zellkultur lässt sich daraus schließen, dass GP2 als spezifischer Marker für RACE-Zellen dienen kann. Weiterhin scheint ein Effekt des Zytokins RANKL auf die Differenzierung von Darmepithelzellen vorzuliegen, zumindest ließ sich im Rahmen dieses Versuchssettings eine RANKL-abhängige Steigerung der Antigenaufnahme nachweisen, welche über GP2-exprimierende Zellen vermittelt wurde.

### 3.4 Kryoelektronenmikroskopie

#### 3.4.1 Hintergrundmarkierung und Quantifizierung der Antigenaufnahme

Zur Detektion der gesuchten Antigene innerhalb der Enterozyten wurden ein polyklonaler Anti-mTG-AK sowie ein polyklonaler Anti-Gliadin-AK verwendet. Die Bindung dieser spezifischen Antikörper an ihr entsprechendes Antigen wurde durch einen mit 12 nm Goldpartikeln gekoppelten sekundären Antikörper visualisiert. Die Markierung des endoplasmatischen Retikulums und der späten Endosomen erfolgte durch sekundäre Antikörper, die mit 6 nm großen Goldpartikeln verbunden waren und an die primären m-PDI-AK und m-LAMP2-AK banden.

Wie bereits bei der Immunfluoreszenzmikroskopie, konnte auch elektronenmikroskopisch keine mTG in nativen Dünndarmproben nachgewiesen werden.

Essentiell für die Interpretation der Ergebnisse der Auszählung am Elektronenmikroskop war die Bestimmung des unspezifischen Labels (Hintergrundmarkierung) der jeweiligen primären Antikörper. Hierzu wurde bei jeder Auswertung die relative Anzahl an Goldpartikeln auf Mitochondrien und Zellkernen miterfasst. Nach derzeitigem Kenntnisstand enthalten diese beiden Zellorganellen weder mTG noch Gliadinpeptide, sodass bei einem Label innerhalb dieser Strukturen durch den jeweiligen Antikörper von einer unspezifischen Markierung ausgegangen werden konnte (Tab. 3-2).

**Tab. 3-2: Hintergrundmarkierung auf Zellkernen und Mitochondrien.** Median (Spannweite) der relativen Hintergrundmarkierung auf Zellkernen und Mitochondrien des p-mTG-AK und des p-Gliadin-AK.

Hintergrundmarkierung p-mTG-AK 1:20				Hintergrundmarkierung p-Gliadin-AK 1:30			
Zellkern		Mitochondrium		Zellkern		Mitochondrium	
Kontrolle	Zöliakie	Kontrolle	Zöliakie	Kontrolle	Zöliakie	Kontrolle	Zöliakie
2 (0-5)	0 (0-2)	1 (0-3)	0 (0-2)	1,5 (0-5)	3 (0-5)	4 (0-6)	2 (0-6)

Vor allem der p-mTG-AK erwies sich als spezifisch mit nur sehr geringer Hintergrundmarkierung von durchschnittlich 1%. Der p-Gliadin-AK zeigte mehr unspezifisches Label, lag jedoch im Mittel bei 2,5% Hintergrundmarkierung, sodass auch hier eine sehr gute Spezifität vorlag.

Zur Quantifizierung der Antigenaufnahme wurde die Anzahl an Enterozyten bestimmt, welche zur Auszählung von 100 Goldpunkten erforderlich war.

Bei Verwendung des p-mTG-AK musste, verglichen mit dem p-Gliadin-AK, die vier-, bis fünffache Anzahl an Enterozyten für 100 Goldpartikel ausgezählt werden (Tab. 3-3). Entgegen der Erwartung zeigte sich, dass in Kontrollbiopsien deutlich höhere intrazelluläre Mengen beider Antigene detektiert wurden. Dieser Unterschied zwischen beiden Gruppen erwies sich jedoch als nicht signifikant.

**Tab. 3-3: Zellzahl zur Auszählung von 100 Goldpartikeln.** Median (Spannweite) der Anzahl an Enterozyten, die in Versuchsreihe Nr.1 (p-mTG-AK), sowie in den Versuchsreihen Nr.2 und Nr.3 (p-Gliadin-AK) gezählt wurden, um 100 Goldpartikel zu erhalten.

p-mTG-AK 1:20		p-Gliadin-AK 1:30	
Kontrolle	Zöliakie	Kontrolle	Zöliakie
20 (12-55)	33 (16-45)	5 (3-11)	6,5 (3-10)

### 3.4.2 Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase in Enterozyten

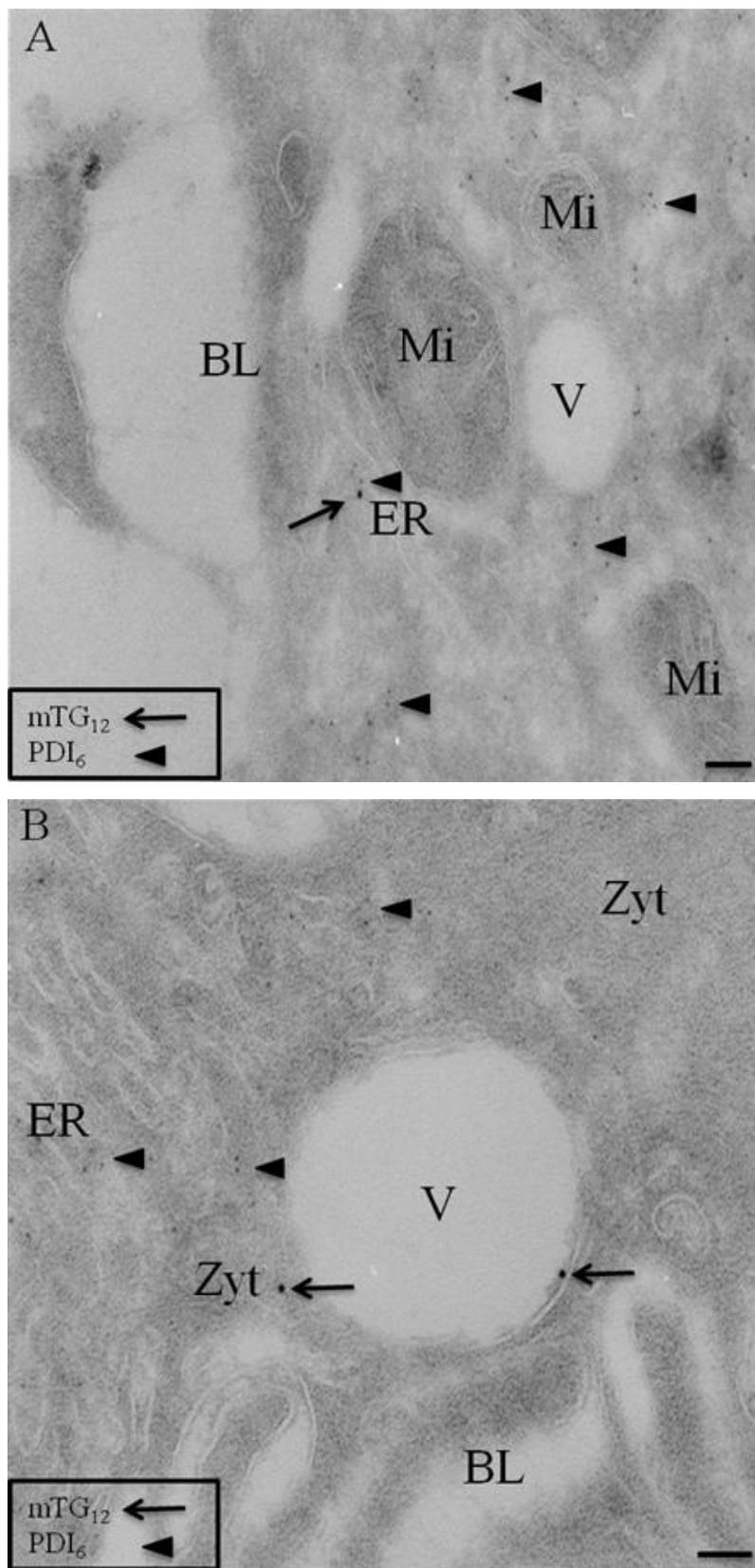
Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag auf der ultrastrukturellen Analyse von Aufnahme und Transport der mTG. Der pathogenetischen Hypothese zu Folge wird die mTG durch die Dünndarmschleimhaut aufgenommen und gelangt daraufhin in das endoplasmatische Retikulum, wo sie Anschluss an das System der MHC-I-abhängigen Antigenpräsentation erhält.

#### 3.4.2.1 Lokalisation der mTG im ER von Enterozyten

Zentraler Untersuchungsgegenstand war die Lokalisation der mTG (dargestellt als 12 nm GP) im endoplasmatischen Retikulum. Um dies zu analysieren, wurde das ER durch einen monoklonalen PDI-Antikörper (dargestellt als 6 nm GP) markiert.

Der Anteil der mTG im ER lag mit 7-8% bei Kontroll- und Zöliakiebiopsien deutlich über der Hintergrundmarkierung (1%) (Abb. 3-11 A). Hierbei zeigte sich in der Menge des Antigens innerhalb des ER kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (NCD 8%; SD 4,3 vs. CD 7%, SD 5,6;  $p = 0,679$ ). Dieses Ergebnis deutet auf einen signifikanten Transport der mTG in das ER hin und legt damit eine räumliche Beziehung dieses exogenen Antigens mit einem Zellorganell nahe, welches eine wichtige Funktion im Rahmen der Kreuzpräsentation einnimmt.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels



**Abb. 3-11: Intrazelluläre Lokalisationen der mTG.**

Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biopsien, die einstündig mit 200 µg/ml mTG inkubiert wurden. Die Doppelmarkierung von mTG und ER erfolgte mittels p-mTG-AK 1:20 (12 nm GP)

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

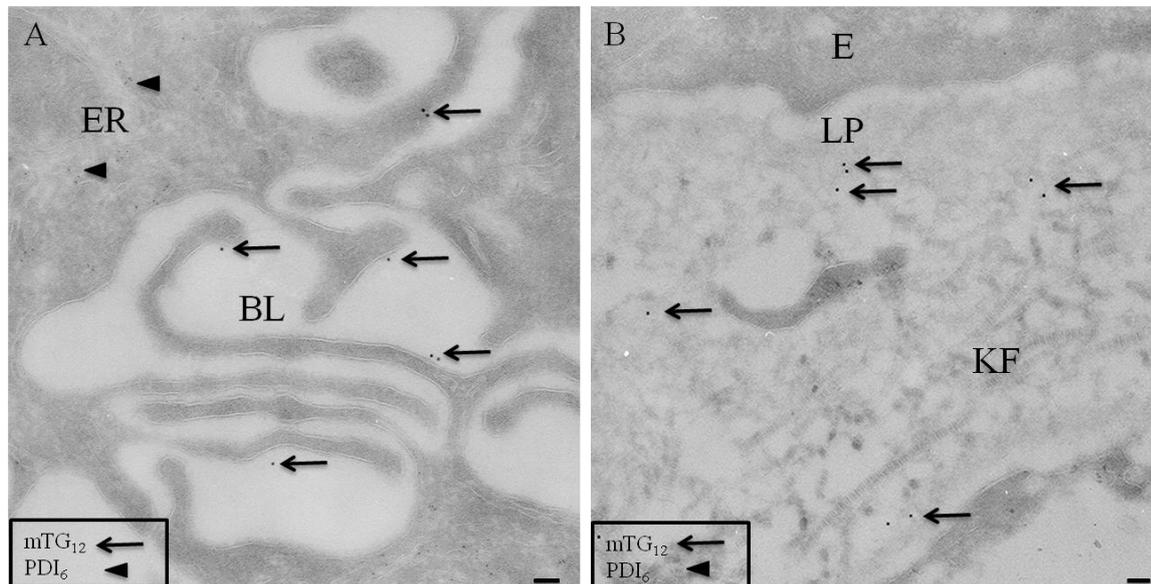
sowie m-PDI-AK 1:500 (6 nm GP). (A) mTG innerhalb des endoplasmatischen Retikulums. (B) mTG innerhalb einer Vakuole sowie im Zytosol. BL = Basolaterale Membran, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Mi = Mitochondrium, Zyt = Zytosol. Vergrößerung: (A) x17700, (B) x24400. Balken = 100 nm.

### 3.4.2.2 Lokalisation der mTG in anderen Zellkompartimenten

Der mit Abstand größte Anteil der intrazellulären mTG befand sich an der basolateralen Membran. So wiesen Kontrollproben im Durchschnitt etwa 38% (SD 11,8) des Labels in diesem Bereich auf, bei Zöliakiebiopsien lag der Prozentsatz bei 39% (SD 17,3;  $p = 0,553$ , Abb. 3-12 A, Abb. 3-13).

Weitere häufige Lokalisationen der mTG waren Vakuolen (NCD 28%; SD 8,3 vs. CD 39%; SD 6,6;  $p = 0,690$ ) und das Zytosol (NCD 9%; IQA 7; 11 vs. CD 10%; IQA 8; 13;  $p = 0,438$ ), bei denen sich keine Differenzen zwischen den beiden Gruppen nachweisen ließen (Abb. 3-11 B).

Im Bereich der apikalen Membran zeigte sich ein, wenn auch nicht signifikanter Unterschied. Dieses Zellkompartiment beinhaltete durchschnittlich 12% (SD 5,8) der mTG in Kontrollbiopsien und 7% (SD 3,5) in Proben von Zöliakiepatienten ( $p = 0,077$ ).

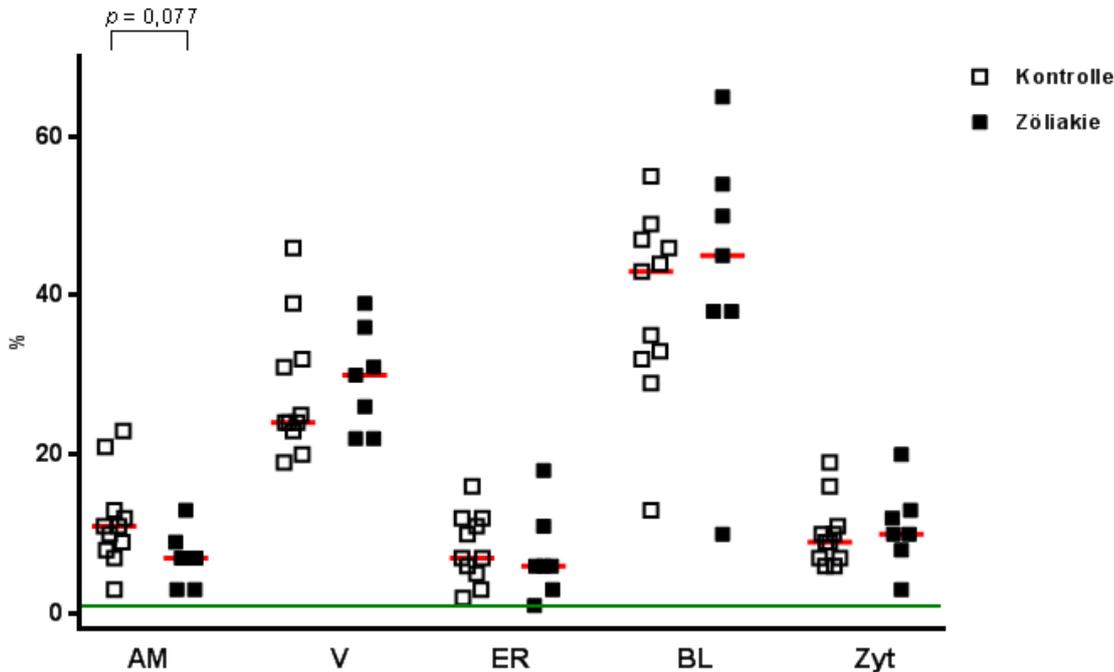


**Abb. 3-12: mTG im Bereich der basolateralen Membran und der *Lamina propria*.**

Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biopsien, welche einstündig mit 200 µg/ml mTG inkubiert wurden. Die Doppelmarkierung von mTG und ER erfolgte mittels p-mTG-AK 1:20 (12 nm GP) sowie m-PDI-AK 1:500 (6 nm GP). (A) Basolaterale Membran zwischen zwei Enterozyten mit mTG. (B) Im oberen Bildteil ist der basale Abschnitt eines Enterozyten zu sehen, unterhalb folgt die *Lamina propria*, welche durch das Vorkommen von Kollagenfasern charakterisiert wird und eine ausgedehnte Markierung der

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

mTG aufweist. E = Enterozyt, ER = Endoplasmatisches Retikulum, KF = Kollagenfasern, LP = Lamina propria, Vergrößerung: (A) x17700, (B) x13800. Balken = 100 nm.



**Abb. 3-13: Aufnahme von mTG in verschiedene Kompartimente von Enterozyten.**

Abgebildet ist die relative Verteilung der mTG innerhalb der Enterozyten von Kontroll- und Zöliakiebiopsien. Die Proben wurden für 1h bei 37°C mit 200 µg/ml mTG inkubiert. Die Antikörpermarkierung erfolgte mittels p-mTG-AK 1:20 und m-PDI-AK 1:500. MTG lokalisierte vorwiegend im Bereich der basolateralen Membran, der Anteil der mTG innerhalb des ER überstieg die Hintergrundmarkierung signifikant. AM = Apikale Membran, BL = Basolaterale Membran, ER = Endoplasmatisches Retikulum, V = Vakuole, Zyt = Zytosol. Rote Linie = Median, grüne Linie = Hintergrundmarkierung. Alle nicht aufgeführten *p*-Werte waren nicht signifikant.

Auffallend war außerdem eine intensivere Markierung der mTG im basalen Bereich der Enterozyten ohne Anstieg der Hintergrundmarkierung. Weiterhin zeigte sich auch eine erhebliche Menge des Proteins innerhalb der *lamina propria* (Abb. 3-12 B). Diese Beobachtungen konnten unabhängig von der Gruppenzuteilung gemacht werden, zeigten sich jedoch nicht bei der Untersuchung des Transports von Gliadin.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass mTG sowohl bei Zöliakiepatienten als auch bei Kontrollen von Enterozyten aufgenommen und über das vakuoläre System an die basolaterale Membran transportiert wird. Dabei erreicht sie innerhalb der einstündigen Inkubationszeit bereits die *Lamina propria* und befindet sich damit in räumlicher Nähe zu den Zellen des Immunsystems.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

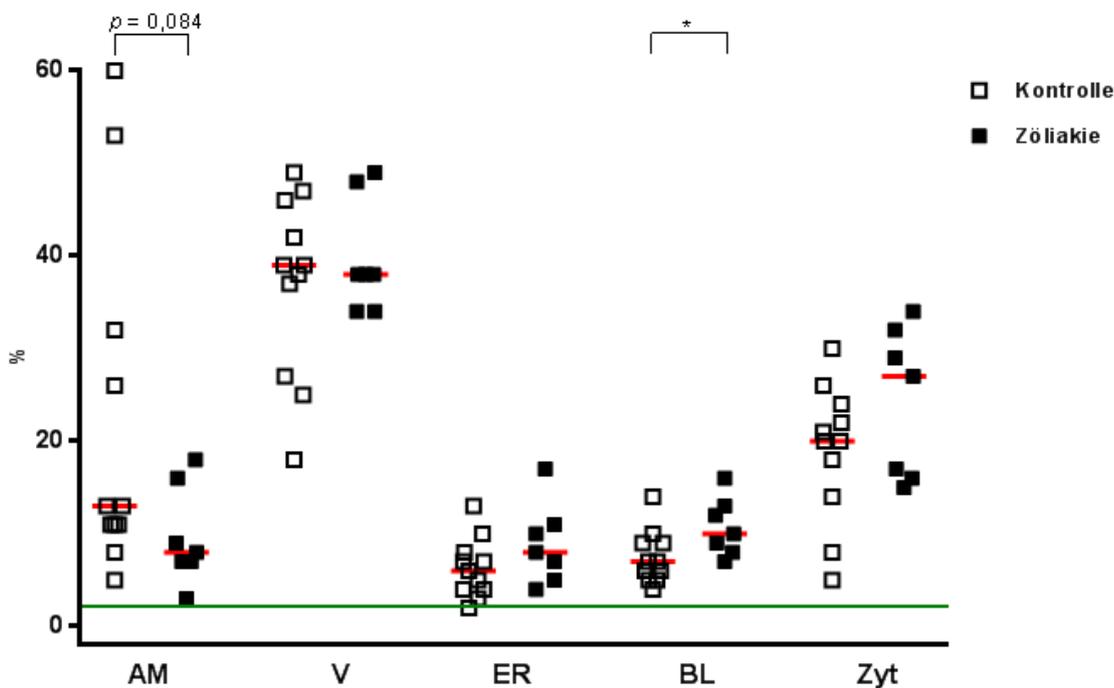
### 3.4.3 Lokalisation von Gliadin unter Einfluss mikrobieller Transglutaminase

Ziel der zweiten und dritten Versuchsreihe war die Untersuchung des intrazellulären Transports von Gliadin (dargestellt als 12nm GP) bei gleichzeitiger Inkubation mit mTG in der Dünndarmschleimhaut von Zöliakiepatienten und Kontrollen.

#### 3.4.3.1 Transport von Gliadin in das ER von Enterozyten

Das Augenmerk der zweiten Versuchsreihe lag dabei, in Analogie zum ersten Versuchsaufbau, auf dem Transport von Gliadin in das ER. Hierzu wurde Gliadin mittels polyklonalem Gliadin-AK (dargestellt als 12 nm GP) und das ER durch einen monoklonalen PDI-AK (dargestellt als 6 nm GP) markiert.

In Zöliakiebiopsien zeigte sich eine mit 9% (SD 4,4) gegenüber 6% (SD 3,2) in Kontrollproben nicht signifikant gesteigerte Aufnahme von Gliadin in das ER ( $p = 0,168$ ). Bemerkenswerterweise lag der Wert bei beiden Gruppen deutlich über der Hintergrundmarkierung, was einen gerichteten Transport des Antigens in dieses Zellkompartiment nahelegt (Abb. 3-14, 3-15).



**Abb. 3-14: Gliadin wird von Enterozyten aufgenommen und in das ER transportiert.**

Die Biopsien wurden für 1 h bei 37° C mit 200 µg/ml mTG und 100 µg/ml FF inkubiert. Die Antikörpermarkierung erfolgte mittels p-Gliadin-AK 1:30 und m-PDI-AK 1:500. Abgebildet ist die relative Verteilung des Gliadins innerhalb der Enterozyten bei Kontrollen und Zöliakiepatienten. Gliadin lokalisierte vorwiegend in

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Vakuolen und dem Zytosol, der Anteil der Gliadinmarkierung innerhalb des ER lag deutlich über dem Hintergrundlabel. AM = Apikale Membran, BL = Basolaterale Membran, ER = Endoplasmatisches Retikulum, V = Vakuole, Zyt = Zytosol. Rote Linie = Median, grüne Linie = Hintergrundmarkierung. \* $p \leq 0,05$ .

### 3.4.3.2 Gliadin in späten Endosomen

In der dritten Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob zwischen Kontrollen und Zöliakiepatienten ein Unterschied im Anteil des Gliadins in späten Endosomen besteht. Hierzu wurden Gliadin mittels polyklonalem Gliadin-AK (dargestellt als 12 nm GP) und späte Endosomen durch einen monoklonalen LAMP2-AK (dargestellt als 6 nm GP) markiert. Der Theorie zu Folge sind HLA-DR-positive späte Endosomen maßgeblich an der Toleranzinduktion über die MHC-II-abhängige Antigenpräsentation beteiligt. Eine Beeinflussung des Transports von Gliadin in diese Zellorganelle durch mTG könnte also die Reaktion des Immunsystems auf dieses Antigen verändern.

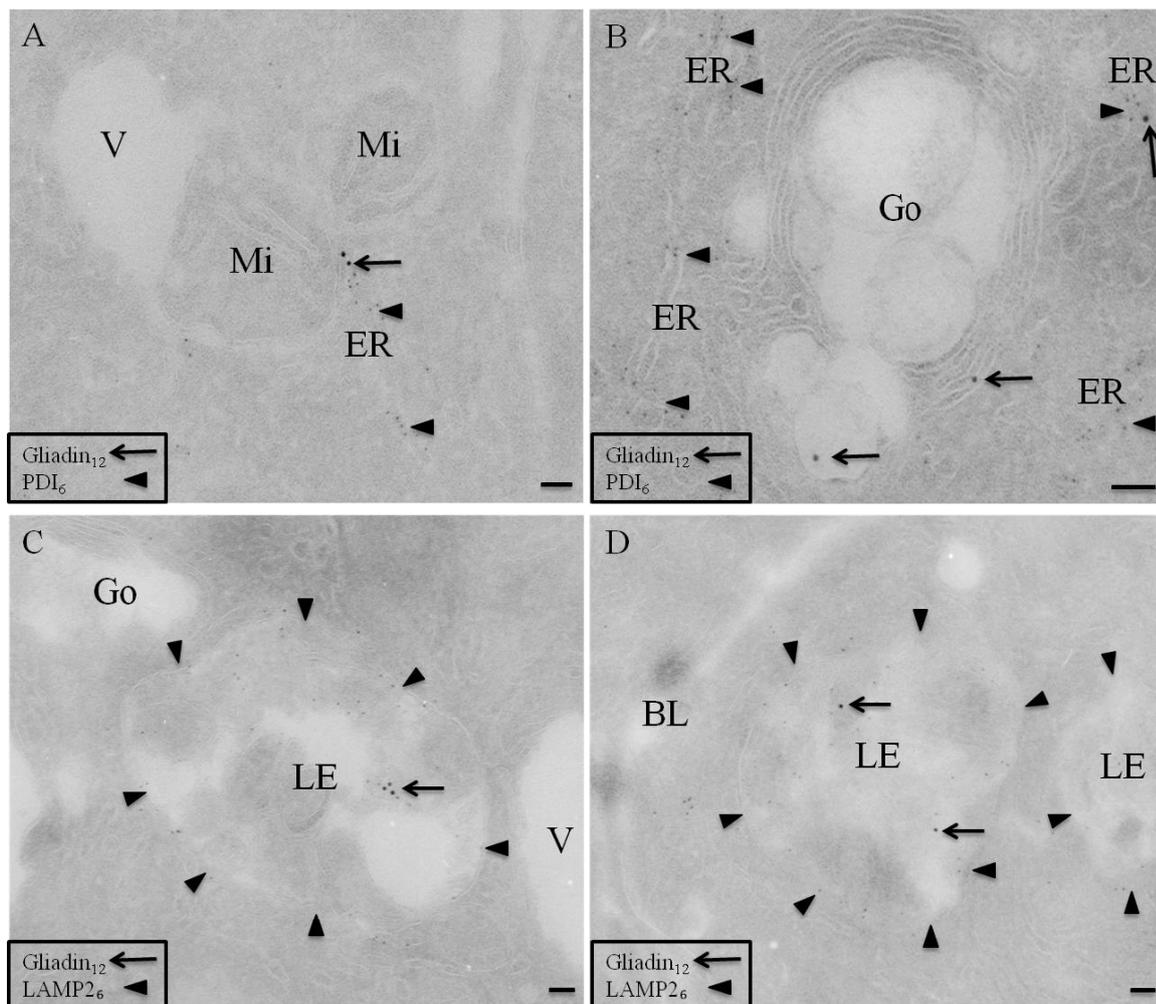
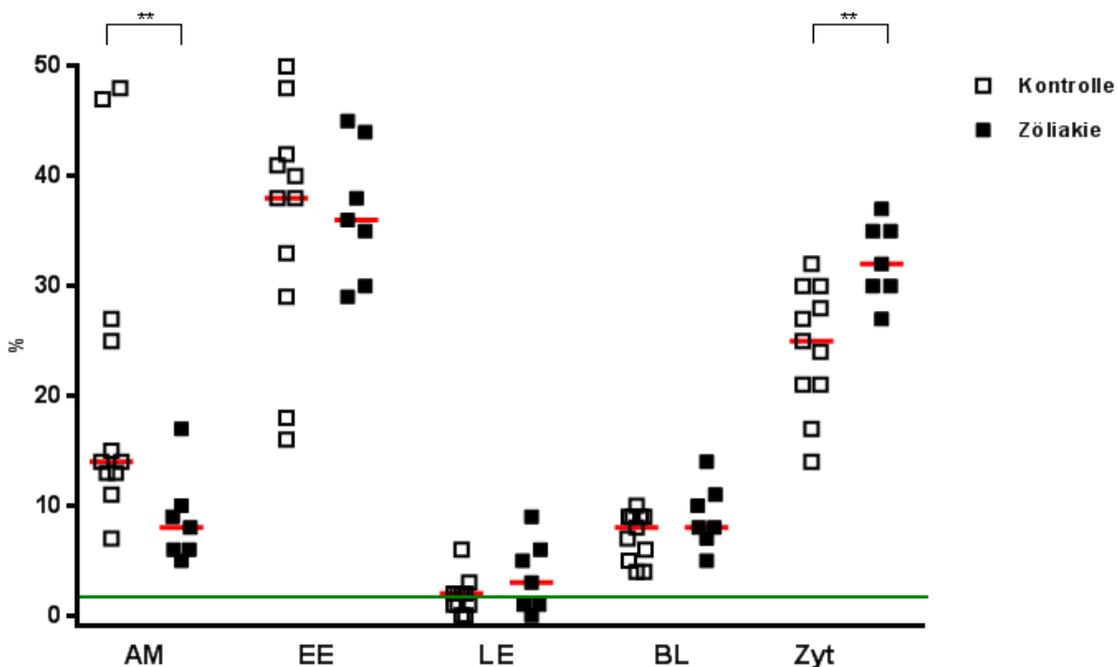


Abb. 3-15: Gliadin im ER und in späten Endosomen.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Zu sehen sind ultrastrukturelle Aufnahmen von Biopsien, welche simultan mit 200 µg/ml mTG sowie 100 µg/ml FF inkubiert wurden. Die Antikörpermarkierungen erfolgten mittels p-Gliadin-AK 1:30 (12nm GP) sowie m-PDI-AK 1:500 (6 nm GP, A und B) oder m-LAMP2-AK 1:5 (6 nm GP, C und D). (A) Gliadin im endoplasmatischen Retikulum. (B) Gliadin innerhalb eines Golgi-Apparats sowie im ER. (C) Kollokalisierung von Gliadin und LAMP2 in einem späten Endosom. (D) Zwei späte Endosomen, links mit aufgenommenen Gliadin, rechts ohne Gliadin. BL = Basolaterale Membran, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Go = Golgi-Apparat, LE = spätes Endosom, Mi = Mitochondrium, V = Vakuole. Vergrößerung: (A-C) x17700, (D) x13800. Balken = 100 nm.

Die Menge des Gliadins innerhalb später Endosomen lag bei beiden Gruppen im Bereich der Hintergrundmarkierung, zwischen beiden Kohorten zeigte sich hierbei kein Unterschied. In Kontrollbiopsien lag der Anteil bei 2% (IQA 1; 2), in Zöliakieproben befanden sich 3% (IQA 1; 6) des intrazellulären Gliadins in späten Endosomen ( $p = 0,332$ , Abb. 3-15, 3-16).



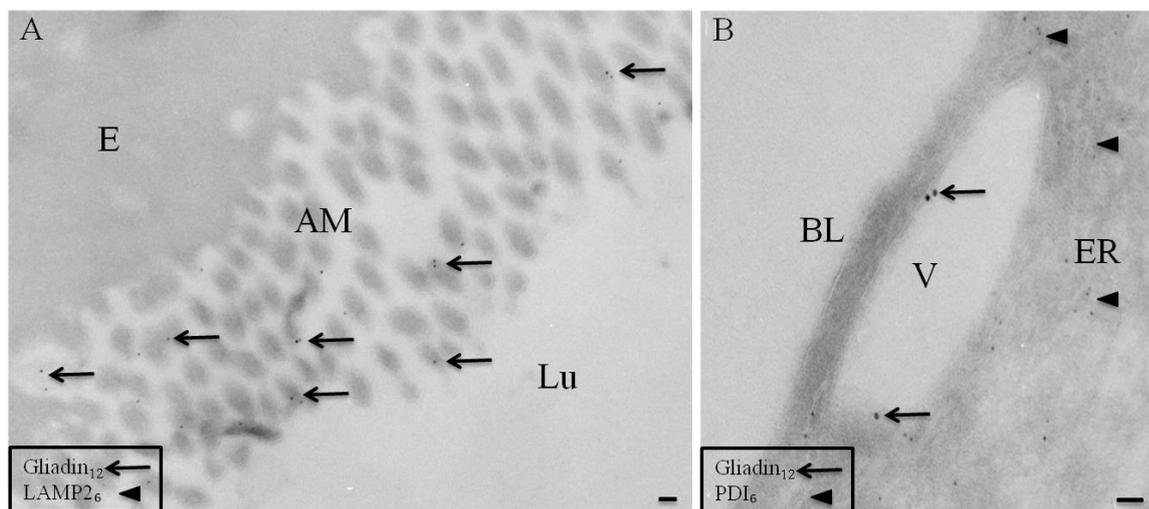
**Abb. 3-16: Kein gesteigerter Transport von Gliadin in späte Endosomen unter Zugabe von mTG.**

Die Biopsien wurden für 1 h bei 37° C mit 200 µg/ml mTG und 100 µg/ml FF inkubiert. Die Antikörpermarkierung erfolgte mittels p-Gliadin-AK 1:30 und m-LAMP2-AK 1:5. Abgebildet ist die relative Verteilung des Gliadins innerhalb der Enterozyten bei Kontrollen und Zöliakiepatienten. Etwa 2-3% des Gliadins waren in späten Endosomen lokalisiert, beinahe 40% des Gesamtlabells befand sich in frühen Endosomen. AM = Apikale Membran, BL = Basolaterale Membran, EE = frühe Endosomen, LE = spätes Endosomen, Zyt = Zytosol. Rote Linie = Median, grüne Linie = Hintergrundmarkierung. \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.4.3.3 Gliadin in anderen Zellkompartimenten unter Einfluss der mTG

Mit beinahe 40% (NCD 39%; IQA 27; 46 vs. CD 38%; IQA 34; 48;  $p = 0,891$ ) des Gesamtlabells enthielten Vakuolen bei beiden Gruppen von allen ausgewerteten Zellkompartimenten am meisten Gliadin (Abb. 3-14, 3-17). Bei genauerer Untersuchung zeigte sich hierbei eine hohe Markierungsdichte des Antigens innerhalb LAMP2-negativer, früher Endosomen (NCD 36%; SD 11 vs. CD 37%; SD 6,2;  $p = 0,832$ , Abb. 3-16).

Neben dem endozytotischen System wies auch das Zytosol einen großen Anteil des intrazellulären Gliadins auf. Dabei konnte zumindest in Versuchsreihe Nr.3 mit 32% (SD 3,5) bei Zöliakiebiopsien signifikant mehr Antigen innerhalb dieses Kompartiments nachgewiesen werden, als bei Kontrollen (NCD 24%; SD 5,7;  $p = 0,005$ ) (Versuchsreihe Nr.2: NCD 19%; SD 7,4 vs. CD 24%; SD 8,1;  $p = 0,167$ , Abb. 3-16).



**Abb. 3-17: Starkes Gliadin-Label an der AM und in Vakuolen.**

Zu sehen sind ultrastrukturelle Aufnahmen von Biopsien, welche simultan mit 200  $\mu\text{g/ml}$  mTG sowie 100  $\mu\text{g/ml}$  FF inkubiert wurden. Die Antikörpermarkierungen erfolgten mittels p-Gliadin-AK 1:30 (12 nm GP) sowie m-LAMP2-AK 1:5 (6 nm GP, A) oder m-PDI-AK 1:500 (6 nm GP, B). (A) Nachweis großer Mengen Gliadin im Bereich der apikalen Membran der Biopsie eines Kontrollpatienten. (B) Gliadin in einer Vakuole. AM = Apikale Membran, BL = Basolaterale Membran, E = Enterozyt, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Lu = Lumen, V = Vakuole. Vergrößerung: (A)  $\times 10200$ , (B)  $\times 17700$ . Balken = 100 nm.

Wie bereits in der ersten Versuchsreihe beobachtet, zeigte sich auch für Gliadin ein leichter Unterschied im Anteil des Labels an der apikalen Membran. So wiesen Enterozyten in Kontrollbiopsien in diesem Kompartiment einen mit 14% (IQA 13; 27) erhöhten Prozent-

satz an Gliadin gegenüber denen in Zöliakiebiopsien auf (8%; IQA 6; 10;  $p = 0,01$ ) (Versuchsreihe Nr.2: NCD 13%; IQA 11; 32 vs. CD 8%; IQA 7; 16;  $p = 0,084$ , Abb. 3-16, 3-17).

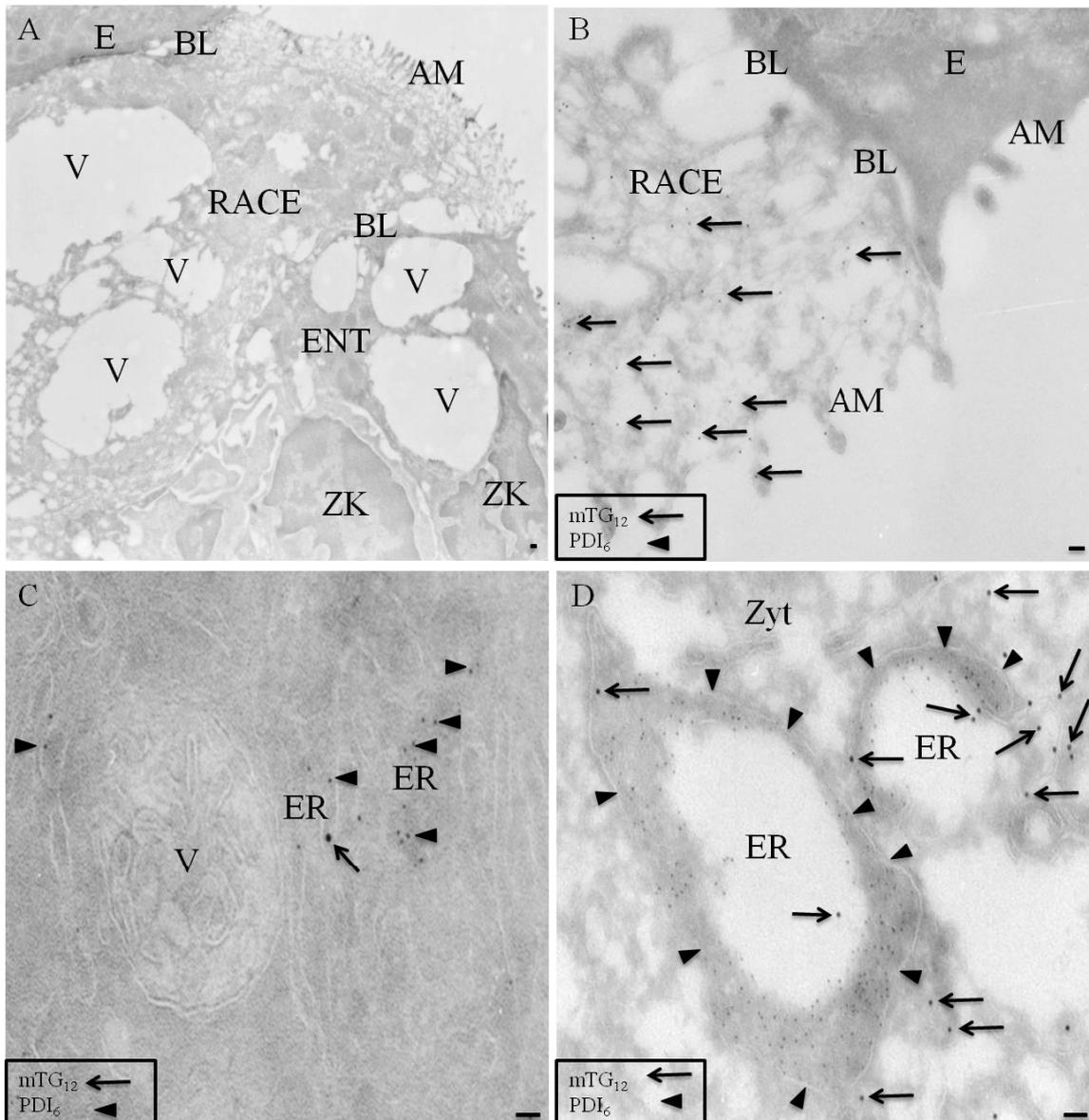
Eine weitere Divergenz in der Verteilung des Gliadins zwischen den beiden Gruppen konnte im Bereich der basolateralen Membran beobachtet werden, wenn auch nur in Versuchsreihe Nr.2. Bei Zöliakiepatienten stellte sich dort mit 11% (SD 3,1) signifikant mehr Gliadin dar als bei Kontrollen (7%; SD 2,9;  $p = 0,038$ ) (Versuchsreihe Nr.3: NCD 7%; SD 2,2 vs. CD 9%; 2,9;  $p = 0,173$ , Abb.3-14).

#### **3.4.4 Antigenaufnahme in RACE-Zellen**

Aufgrund ihrer starken, insbesondere zytosolischen Antigenaufnahme, stellen RACE-Zellen eine für die Kreuzpräsentation prädestinierte Zellart dar. Grundlegende Hypothese dieser Arbeit war, dass RACE-Zellen eine im Vergleich zu Enterozyten gesteigerte Menge an mTG und Gliadin im ER aufweisen.

Um die Antigenaufnahme durch RACE-Zellen zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Lokalisation von mTG und Gliadin in ihnen ausgewertet. Bezüglich der relativen Anzahl an RACE-Zellen pro 100 Enterozyten, ließ sich in diesem Setting kein Unterschied zwischen Kontroll- und Zöliakiepatienten feststellen. Die Bestimmung der intrazellulären Verteilung der Antigene erfolgte durch die Auswertung von jeweils 10 RACE-Zellen bei zwei Patienten pro Gruppe. Es fanden dieselben Elektronenmikroskopienetze Verwendung, welche für die Quantifizierung der Enterozyten angefertigt worden waren.

Verglichen mit regelhaften Enterozyten, zeigten RACE-Zellen eine deutlich gesteigerte Antigenaufnahme. So waren für mTG in beiden Gruppen über 200 intrazelluläre Markierungen pro Zelle zu sehen (NCD 352; SD 161,2 vs. CD 228; SD 87,7;  $p = 0,005$ ), Gliadin wurde in geringerem Ausmaß aufgenommen (NCD 165,5; IQA 141; 205 vs. CD 172,5; IQA 138,5; 224;  $p = 0,925$ ). In regulären Enterozyten befanden sich für mTG nur 5 (NCD, IQA 3,1; 6,7), respektive 3 Goldpunkte (CD; IQA 2,3; 5,9;  $p = 0,232$ ) und für Gliadin 20 (NCD, IQA 16,3; 27) sowie 16 (CD; IQA 12,5; 21,3;  $p = 0,133$ ) Goldpunkte pro Zelle. Über 80% der intrazellulären Markierung der RACE-Zellen entfiel in beiden Gruppen auf die Bereiche Zellkern und Zytosol (Abb. 3-18 B).



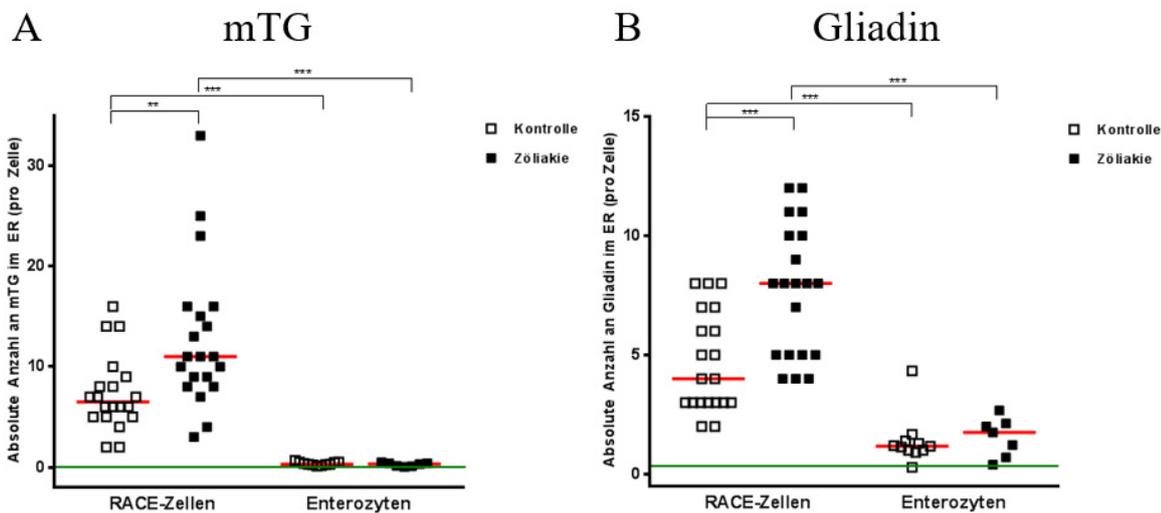
**Abb. 3-18: RACE-Zellen und ihr Antigentransport in ein dilatiertes ER.**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biopsien nach Inkubation mit 200 µg/ml mTG. Die Antikörpermarkierung erfolgte mittels p-mTG-AK 1:20 (12 nm GP) sowie m-PDI-AK 1:500 (6 nm GP). (A) Übersichtsaufnahme einer RACE-Zelle mit deutlich geringerer Elektronendichte verglichen mit den beiden benachbarten Enterozyten. (B) RACE-Zelle mit starker zytosolischer Aufnahme der mTG in direkter Nachbarschaft zu einem regulären Enterozyten. (C) mTG innerhalb des schmal konfigurierten ER eines morphologisch normalen Enterozyten (vergleiche Abb. 3-11 A). (D) Enorm aufgeweitetes ER einer RACE-Zelle mit Markierung der mTG. Weiterhin Nachweis des Antigens innerhalb des Zytosols der RACE-Zelle. AM = Apikale Membran, BL = Basolaterale Membran, E = Enterozyt, ER = Endoplasmatisches Retikulum, RACE = RACE-Zelle, V = Vakuole, ZK = Zellkern, Zyt = Zytosol. Vergrößerung: (A-B) x10200, (C) x13800, (D) x17700. Balken = 100 nm.

Um eine genauere Aussage über die intrazelluläre Antigenverteilung in RACE-Zellen zu treffen, wurde zunächst die absolute Anzahl an mTG- und Gliadin-Label (Goldpunkte) im

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

ER pro Zelle quantifiziert. Wie erwartet zeigten RACE-Zellen in Kontroll- und Zöliakiebiopsien eine deutlich erhöhte Aufnahme beider Proteine in dieses Kompartiment verglichen mit Enterozyten (mTG: ENT NCD 0,29; IQA 0,24; 0,5 vs. RACE NCD 6,5; IQA 5; 8,8;  $p \leq 0,001$ ; ENT CD 0,33; IQA 0,1; 0,38 vs. RACE CD 11; IQA 8,3; 15,8;  $p \leq 0,001$ ) (Gliadin: ENT NCD 1,17; IQA 1; 1,4 vs. RACE NCD 4; IQA 3; 6,8;  $p \leq 0,001$ ; ENT CD 1,6; SD 0,8 vs. RACE CD 7,7; SD 2,7;  $p \leq 0,001$ , Abb. 3-18). Weiterhin wiesen RACE-Zellen in Biopsien von Zöliakiepatienten signifikant mehr mTG und Gliadin im ER auf als in Biopsien von Kontrollen (mTG: RACE NCD 6,5; IQA 5; 8,8 vs. RACE CD 11; IQA 8,3; 15,8;  $p = 0,002$ ; Gliadin: RACE NCD 4; IQA 3; 6,8 vs. RACE CD 8; IQA 5; 10;  $p \leq 0,001$ , Abb. 3-19).



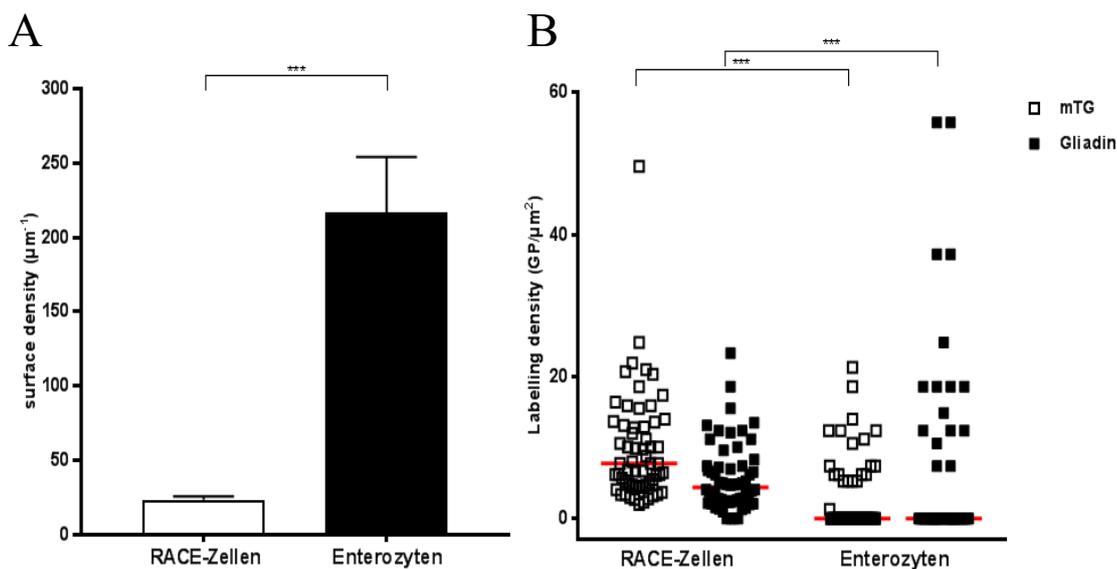
**Abb. 3-19: Antigenaufnahme in das ER von RACE-Zellen.**

Absolute Anzahl an mTG- (A) und Gliadin-Label (B, Goldpunkte) innerhalb des ER von RACE-Zellen und Enterozyten. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Menge beider Antigene innerhalb des ER von RACE-Zellen, sowohl in Kontroll- als auch in Zöliakiebiopsien. Außerdem wiesen RACE-Zellen in Proben von Erkrankten signifikant mehr Antigen innerhalb des ER als in Kontrollproben auf. Rote Linie = Median, grüne Linie = Hintergrundmarkierung. \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Da dieses Ergebnis allerdings auch durch die generell erhöhte Antigenaufnahme der RACE-Zellen sowie die offensichtliche Dilatation des ER in dieser Zellpopulation begründet sein könnte, wurde daraufhin die Fläche des Organells sowie die Antigenkonzentration in diesem Kompartiment in RACE-Zellen und Enterozyten bestimmt. Hierzu wurden für

die Lokalisation von mTG und Gliadin jeweils 10 Bilder beider Zellpopulationen in 3 Kontroll- und 3 Zöliakieproben angefertigt und anschließend mittels eines Gitters die Oberflächen- und Markierungsdichte im ER berechnet.

Erwartungsgemäß stellte sich die *surface density* des ER in RACE-Zellen signifikant niedriger dar als in Enterozyten (RACE 23,7; IQA 18,3; 30 vs. ENT 221,5; IQA 136,3; 327,7;  $p \leq 0,001$ ). Da die Oberflächendichte umgekehrt proportional zur eigentlichen Oberfläche des untersuchten Zellorganells ist, bedeutet dies, dass RACE-Zellen verglichen mit Enterozyten ein stark dilatiertes ER besitzen (Abb. 3-20 A).



**Abb. 3-20: Oberflächendichte und Markierungsdichte des ER in RACE-Zellen.**

Oberflächen- und Markierungsdichten des ER in RACE-Zellen und Enterozyten. (A) Es zeigte sich eine signifikant geringere Oberflächendichte des ER in RACE-Zellen, was auf eine Dilatation des Kompartiments in dieser Zellpopulation hinweist. (B) Höhere Konzentrationen von mTG und Gliadin im ER von RACE-Zellen. (A) Balken = Median und 95% Konfidenzintervall. (B) Rote Linie = Median. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Was die Markierungsdichte betrifft, so ließen sich für mTG und Gliadin ähnliche Ergebnisse darstellen. Für beide Proteine zeigten RACE-Zellen im Vergleich zu Enterozyten eine signifikant höhere Anzahl an Goldpunkten pro  $\mu\text{m}^2$  ER (mTG: RACE 7,8; IQA 4,7; 13,5 vs. ENT 0; davon 66% 0  $\text{GP}/\mu\text{m}^2$  und 33% zwischen 1,3-21,3  $\text{GP}/\mu\text{m}^2$ ;  $p \leq 0,001$ ; Gliadin: RACE 4,4; IQA 2,4; 7,4 vs. ENT 0 davon 72% 0  $\text{GP}/\mu\text{m}^2$  und 28% zwischen 17,4-55,8  $\text{GP}/\mu\text{m}^2$ ;  $p \leq 0,001$ , Abb. 3-20 B). Dieses Ergebnis deutet auf einen spezifischen Transport exogener Antigene in das ER von RACE-Zellen hin. Für beide oben berechneten Parameter (Oberflächen- und Markierungsdichte) kamen zwischen den Gruppen NCD und CD keine Unterschiede zur Darstellung. Die hohe Anzahl an exogenen Antigenen innerhalb des ER

von RACE-Zellen beruht daher nicht allein auf einer unspezifischen Aufnahme oder einer vergrößerten Fläche des Organells, sondern ist zumindest teilweise auf einen gerichteten Transport zurückführbar.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, das Verständnis zur Pathogenese der Zöliakie zu vertiefen. Hierzu wurden die intrazelluläre Lokalisation der mTG und ihr Einfluss auf die Transportwege von Gliadin untersucht. Der Hypothese nach nehmen Enterozyten mTG und Gliadin endozytotisch auf und transportieren sie in das ER. Dieses nimmt eine Schlüsselrolle im Rahmen der Antigenkruzpräsentation ein, sodass ein vermehrtes Aufkommen beider Proteine im ER auf die MHC-I-abhängige Präsentation exogener Antigene im Rahmen der Zöliakie hindeutet. Weiterhin wurde ein Einfluss der mTG auf den Transport von Gliadin in späte Endosomen überprüft. Diese sind im Gegensatz zu frühen Endosomen HLA-DR-positiv und vermitteln so eine Präsentation exogener Antigene über MHC-II-Moleküle, ein Prozess, der bei der Entstehung von oraler Toleranz von entscheidender Bedeutung ist. Zuletzt hat diese Arbeit die Absicht, die Antigenaufnahme durch RACE-Zellen, als spezielle Zellpopulation innerhalb des Darmepithels zu charakterisieren.

### 4.1 Diskussion der Methodik

#### 4.1.1 Patienten

Die Patienten, welche im Zuge dieser Arbeit biopsiert wurden, waren Patienten der Allgemeinen Pädiatrie und Neonatologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Gießen. Zeitpunkt und Abfolge der Endoskopien wurden unabhängig von dieser Arbeit festgelegt, sodass die Proben nach zufälligem Muster gewonnen und verarbeitet wurden. Dies verhinderte den Einfluss eines Lerneffekts im Umgang mit den Biopsien auf die Auswertung.

Die Kohorte der Zöliakiepatienten stellt eine gut definierte Gruppe dar, die sich in Personen mit glutenhaltiger ( $n = 4$ ) und glutenfreier ( $n = 3$ ) Diät unterteilt. Zur Diagnosestellung wurden die revidierten ESPGHAN-Kriterien herangezogen (1). Da nur Zöliakiepatienten ohne Komorbiditäten eingeschlossen wurden, konnten die möglichen Störfaktoren auf ein Mindestmaß reduziert werden. Auch die Nicht-Zöliakie-Patienten bilden aufgrund der

strengen Ein- und Ausschlusskriterien eine weitgehend homogene Gruppe, bestehend 7 kranken und 4 gesunden Kontrollen ohne entzündliche Veränderungen des Duodenums.

#### 4.1.2 Biopsieaufbereitung

Im Rahmen dieser experimentellen Studie wurden die Hypothesen anhand von *in vitro* und *ex vivo* durchgeführten Experimenten an einer intestinalen Zelllinie sowie Dünndarmschleimhaut getestet. Die Verwendung von frisch entnommenen Biopsaten kommt der Situation, wie sie sich *in vivo* darstellt, sehr nahe und bietet die Möglichkeit experimentelle Fragestellungen möglichst physiologisch zu bearbeiten. Ein entscheidender Vorteil dieser Arbeit ist, dass durch das Einspannen der Schleimhaut in spezielle Ussing-Kammer-Slider ein gerichteter Transport der Proteine von apikal nach basal gewährleistet wurde. Die Möglichkeit einer unspezifischen Aufnahme, etwa über die *Lamina propria*, konnte somit minimiert und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *In-vivo*-Situation verbessert werden (198).

Im Vergleich zu *In-vivo*-Experimenten stellt die Verarbeitung von Biopsien ein risikoärmeres und unkomplizierteres Verfahren dar, wenn auch die Ergebnisse weniger Aussagekraft aufweisen. Ein Nachteil der hier genutzten Methodik ist die limitierte Verfügbarkeit von Biopsaten sowie die aufwendige Aufbereitung und Verarbeitung.

Demgegenüber haben Experimente mit Zellkulturen den Vorteil der Beeinflussung der Menge an Probenmaterial sowie der Wiederholbarkeit. Sie stellen eine Vereinfachung physiologischer Abläufe dar, sodass Störvariablen ausgeschlossen und einzelne Einflussfaktoren gezielt untersucht werden können. Schwachpunkt dieser Methodik ist jedoch die nicht immer gegebene Übertragbarkeit auf die *In-vivo*-Situation, die in der Folge überprüft werden muss. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Zellkulturexperimente die etablierte intestinale, epitheliale Zelllinie HT-29 verwendet.

Durch die Verwendung von *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Modellen wurden die Vorteile der beiden Techniken genutzt, um eine differenzierte Aussage bezüglich der Aufnahme von mTG und Gliadin in Darmepithelzellen treffen zu können.

#### 4.1.3 Kryoelektronenmikroskopie

Die Kryoelektronenmikroskopie nach *Tokuyasu* ist ein bewährtes Verfahren und ermöglicht nicht nur den Nachweis von Antigenen innerhalb einer Zelle, sondern erlaubt

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

auch ihre Lokalisierung in Zellkompartimenten, weshalb sie sich besonders gut zur Untersuchung intrazellulärer Transportprozesse eignet (192). Durch die extrem dünne Schnittstärke von 55 nm wird ein sehr differenzierter Einblick in die Ultrastruktur der Zelle gewährleistet, wobei jedoch bei abnehmender Dicke der Schnitte die Menge des gesuchten Antigens entsprechend kleiner wird. Somit stellt sich der Nachweis von gering konzentrierten Proteinen als schwierig dar.

Entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass die Einbettung in ein Trägermedium (z.B. Kunstharz) umgangen und stattdessen eine Kryofixierung genutzt wird, welche die Antigenität des Gewebes weitgehend unbeeinflusst lässt. Bei der Kryoimmunoelektronenmikroskopie handelt es sich um eine statische Analyse der Proteinverteilung, aus der indirekt Schlüsse über die Kinetik von Transportprozessen gezogen werden können.

Da die Auswertung am Elektronenmikroskop vom Betrachter abhängt, wurden die Versuche stets verblindet, also ohne Kenntnis von Patientendaten, durchgeführt. Trotzdem unterlag die Antigen-Quantifizierung einer gewissen Interobserver-Variabilität. Aus diesem Grund wurden regelmäßig die Ergebnisse zweier unabhängiger Beobachter miteinander verglichen.

Die Spezifität des p-mTG-AK wurde dadurch bestätigt, dass in nativen Proben, im Gegensatz zu inkubierten, kein Label auftrat. Ferner wurde in jedem Versuch die Anzahl von 12-nm-GP auf Zellkernen und Mitochondrien innerhalb der ausgezählten Enterozyten bestimmt (für p-mTG-AK und p-Gliadin-AK). Dies diente als Negativkontrolle, da eine Aufnahme exogener Proteine in diese Kompartimente nicht bekannt ist. Die Spezifität des m-PDI-AK und des m-LAMP2-AK wurden nicht überprüft, da es sich um gebräuchliche, kommerziell erhältliche Antikörper handelt.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1. Slot-Blot-Verfahren**

Primäres Ziel des Slot-Blot-Verfahrens war es, den Einfluss einer Hitzebehandlung, wie sie bei Einsatz der mTG in der Lebensmittelproduktion vorkommt, auf die Antigenität des Proteins zu untersuchen. Hierzu wurde mTG in unterschiedlicher Menge und nach Behandlung in verschiedenen Erhitzungsstufen auf die jeweiligen Slots aufgetragen und die Reaktion des p-mTG-AK untersucht. Wie erwartet führten höhere Proteinmengen zu einer ge-

steigerten Immunreaktivität des Antikörpers. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Antigenität der mTG durch eine Hitzedenaturierung nicht abnimmt, sondern sogar gesteigert werden konnte. Dieser Effekt beruht womöglich darauf, dass die Primärstruktur der mTG durch die Denaturierung mittels Hitze offengelegt wird und weniger sterische Hindernisse für die Antigen-Antikörper-Interaktion vorliegen. Denn durch eine komplexe Sekundär-, beziehungsweise Tertiärstruktur kann die Bindung von Antikörpern an ihr entsprechendes Antigen negativ beeinflusst werden. In Anbetracht dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die potentiell antigenen Proteinkomplexe, welche bei Nutzung der mTG entstehen, durch den Erhitzungsprozess in ihrer Immunogenität noch gesteigert werden.

## 4.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

### 4.2.2.1 Nachweis der Aufnahme von mTG *in vitro* und *ex vivo*

Ziel dieser Methodik war die Untersuchung der Aufnahme von mTG *in vitro* und *ex vivo* durch eine intestinale Zelllinie sowie Dünndarmbiopsien auf lichtmikroskopischer Ebene. Wie zu erwarten, war mTG weder in der Zellkultur noch in den nativen Biopsaten nachzuweisen. Dies spricht für eine spezifische Markierung des Proteins in inkubierten Zellen ohne relevantes Hintergrundlabel. *In vitro* konnte hierbei eine zeitabhängige Zunahme der Antigenaufnahme beobachtet werden, allerdings blieb der Anteil an mTG-positiven Zellen auch nach einstündiger Inkubation verglichen mit der Aufnahme anderer Antigene gering (128). Die intrazelluläre Markierung der HT-29-Zellen kam überwiegend innerhalb von Vakuolen und Zytosol zur Darstellung, jedoch fielen vereinzelt Zellen mit einem intensiven nukleären Label auf, welche den sogenannten RACE-Zellen zugeordnet wurden.

*Ex vivo* zeigte sich eine deutlich intensivere intrazelluläre Markierung der mTG, welche mit der endozytotischen Aufnahme des Proteins durch das Darmepithel vereinbar ist. Neben Zytosol und Vakuolen fiel auch ein prägnantes Label der mTG im Bereich der basolateralen Membran, dem Ort der Antigenpräsentation, auf. Wie schon in der Zellkultur, kamen auch hier vereinzelt innerhalb des Epithels liegende RACE-Zellen mit einer intensiven zytosolischen und nukleären Antigenaufnahme zur Darstellung.

Bemerkenswert war außerdem die eindruckliche Markierung der mTG im Bereich der *lamina propria*, ein Befund der für die transepitheliale Passage des Antigens spricht und sich mit der Lokalisation der TG2 deckt (76, 199). Da angenommen wird, dass die menschliche

Gewebstransglutaminase ihre krankheitsfördernden Funktionen der Transamidierung und Deamidierung in der *lamina propria* ausübt, ist es durchaus denkbar, dass durch die intestinale Mikrobiota freigesetzte, aktive mTG in den subepithelialen Raum gelangt und dort ähnliche pathogenetische Effekte besitzt (72). So könnte die mTG in diesem Kompartiment einerseits zur Deamidierung von Gliadinpeptiden mit einhergehender Affinitätssteigerung gegenüber HLA-DQ2-Molekülen von APZ führen, andererseits scheint auch die simultane Trans- und Deamidierung von Glutaminresten innerhalb verschiedener Proteine mit folgendem „*epitope-spreading*“ möglich (14, 69). Im Bezug auf den Einsatz von mTG in der Lebensmittelproduktion könnten bereits während des Verarbeitungsprozess entstandene immunogene Peptide in den subepithelialen Raum gelangen und dort direkt in Interaktion mit APZ treten.

Dass im Rahmen dieser Studie in nativen Gewebeproben keine mTG nachgewiesen wurde, schließt dabei die Produktion des Enzyms durch Darmbakterien nicht aus, da die hier verwendeten Nachweismethoden, allen voran die Kryoelektronenmikroskopie, geringe Proteinmengen nicht sensitiv genug nachweisen können.

#### 4.2.2.2 RANKL induziert Zellen mit GP2-Expression und mTG-Aufnahme

Nach Stimulation mit dem Zytokin RANKL konnte *in vitro* bei einstündiger Inkubation mit mTG eine signifikante Steigerung der Anzahl GP2-exprimierender sowie antigenaufnehmender Zellen festgestellt werden. Bezüglich der Antigenaufnahme wurde der Effekt von RANKL bei sechsständiger Inkubation mit mTG allerdings nicht bestätigt. Ursächlich hierfür könnte sein, dass der signifikante, allerdings nur geringe Einfluss des Zytokins auf die Antigenaufnahme durch eine generell gesteigerte Endozytose bei länger andauernder mTG-Inkubation überlagert wurde. Die Inkubationsdauer von RANKL sowie die hier verwendete Konzentration ähneln der Studie von *Rouch et al.*, die in ihrer Arbeit mit intestinalen Stammzellen eine erste RANKL-abhängige Steigerung der GP2-Expression nach 4 Tagen, mit einem Maximum nach 7 Tagen beschrieben.

Die Steigerung der mTG-Aufnahme beruhte dabei fast ausschließlich auf GP2-positiven Zellen, sodass angenommen werden kann, dass die Expression dieses Moleküls mit der gesteigerten Antigenaufnahme zusammenhängt. Bislang galt GP2 als spezifischer Marker für sogenannte M-Zellen, eine Zellpopulation innerhalb des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) von Peyer'schen Plaques mit bedeutender Rolle im Rahmen von Immunabwehr und

Toleranz des GALT (gut-associated lymphoid tissue). GP2 fungiert bei diesen Zellen als Rezeptor, welcher die Transzytose kommensaler sowie pathogener Bakterien ermöglicht (200, 201).

Die in dieser Arbeit *in vitro* und *ex vivo* dargestellte Expression von GP2 durch RACE-Zellen könnte daher auf eine Verbindung zu M-Zellen hindeuten. Weitere Überschneidungen der beiden Zellpopulationen bestehen außerdem in der enormen, unspezifischen Antigenaufnahme sowie in morphologischen Besonderheiten (verminderter Bürstensaum, geringe Elektronendichte des Zytosol, randständig kondensiertes Heterochromatin), welche sie von regulären Enterozyten unterscheiden.

Der Mechanismus, über den RANKL die Expression von GP2 und die Antigenaufnahme durch differenzierte HT-29-Zellen beeinflusst, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Mehrere *In-vitro*-Arbeiten stellten die RANKL-abhängige Differenzierung von Lgr5<sup>+</sup> intestinalen Stammzellen zu M-Zellen dar (202). Außerdem zeigten Kernéis *et al.*, dass Caco-2-Zellen typische Eigenschaften von M-Zellen annehmen, wenn sie gemeinsam mit aus Peyer'schen Plaques stammenden Lymphozyten kultiviert werden (203).

Im Gegensatz zu Studien mit kultivierten Darmkrypten, bei denen der Effekt von RANKL durch Beeinflussung der Transkription Lgr5<sup>+</sup> intestinaler Stammzellen vermittelt wird, war die Wirkung des Zytokins in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deutlich geringer (204, 205). Grund hierfür könnte sein, dass RANKL in dieser Studie lediglich zu einer Transdifferenzierung der bereits differenzierten HT-29-Zellen führt (203).

### **4.2.3 Kryoelektronenmikroskopie**

#### 4.2.3.1 Transzelluläre Aufnahme von mTG in das Darmepithel

Dies ist die erste Arbeit, die sich mit Aufnahme und Transport der mTG innerhalb der menschlichen Dünndarmschleimhaut befasst. Um eine fundierte Aussage über den Stellenwert dieses exogenen Antigens im Rahmen der Zöliakie treffen zu können, ist es essentiell zu überprüfen, ob und wenn ja wie mTG von Enterozyten aufgenommen und transportiert wird.

Generell bestehen zwei Möglichkeiten der Antigenaufnahme in das Darmepithel. Zum einen ist dies der transzelluläre Transport, welcher über Endozytose vermittelt wird, zum anderen ist dies die parazelluläre Route, bei der die *tight junctions* den Durchtritt von Molekülen zwischen den einzelnen Zellen regulieren.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Ein parazellulärer Transport scheint allein aufgrund des Molekulargewichts der mTG von 38 kD eher limitiert. In der Literatur wird die maximale Größe von Peptiden die einem parazellulären Transport unterliegen, von etwa 5,5 kD postuliert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die mTG vornehmlich transzellulär aufgenommen wird (206). Allerdings ist bekannt, dass im Rahmen der Zöliakie die intestinale Permeabilität verändert sein kann (207, 208). *In-vivo*-Daten zeigten vor allem bei Zöliakiepatienten mit klassischer Symptomatik eine gestörte Epithelbarriere (209). Weiterhin legten Schulzke *et al.* unter Verwendung der Gefrierbrüchelektronenmikroskopie, ultrastrukturelle Veränderungen der *tight junctions* als Ursache hierfür nahe. Die Erhöhung der intestinalen Durchlässigkeit scheint zumindest teilweise durch die akute Entzündungsreaktion bedingt, da sich sowohl Permeabilitätstests als auch Veränderungen der *tight junctions* unter GFD rückläufig zeigten (209, 210). Diese Effekte könnten bei Zöliakiepatienten mit ausgeprägter Schädigung der Mukosa zu einer gewissen parazellulären Passage der mTG führen.

Für einen transzellulären Transport der mTG spricht die Tatsache, dass diese im Bereich der apikalen und basolateralen Membran sowie in intrazellulären Vakuolen detektiert wurde. Dies legt einen endozytotischen Weg über die apikale Membran via Vakuolen an die basolaterale Membran nahe. Weiterhin zeigten sich die *tight junctions* in dieser Arbeit morphologisch unauffällig und die Interzellularräume schmal konfiguriert, was gegen eine sekundäre, entzündungsabhängige Steigerung des parazellulären Transports spricht.

#### 4.2.3.2 Transport von mTG und Gliadin in das ER

Ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit ist die Kolo-kalisation von mTG und Gliadin mit dem ER-Marker Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und somit die Darstellung einer räumlichen Beziehung von exogenen Antigenen und einem mit der Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle assoziierten Zellorganell. Rund 6-9% der intrazellulären Antigene kamen in beiden Gruppen innerhalb des ER zur Darstellung, ein Wert, der deutlich über der Hintergrundmarkierung liegt. Dabei eignet sich PDI in diesem Versuchsetting besonders gut zur Lokalisation des Kompartiments, da dieses Protein nicht nur spezifisch für das Organell ist, sondern auch eine funktionale Rolle als Chaperon im Zuge der MHC-I-assoziierten Antigenpräsentation einnimmt (165, 166). Obwohl bislang angenommen wurde, dass vorwiegend professionelle APZ zur Kreuzpräsentation fähig sind, legt diese Arbeit nahe, dass dieser Mechanismus womöglich auch von Enterozyten genutzt wird (211). Weitere Hinweise auf die Kreuzpräsentation durch Darmepithelzellen sind die Kolo-kalisation

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

von MHC-I-Molekülen mit Ovalbumin in späten Endosomen und Exosomen von Enterozyten, sowie die Aktivierung MHC-I-restringierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch ein bestimmtes Gliadin-Epitop (171, 186, 212).

#### 4.2.3.3 Gliadin in späten Endosomen

Die Markierung des Gliadins innerhalb später Endosomen lag bei gleichzeitiger Inkubation mit mTG in Zöliakie- und Kontrollbiopsien im Bereich des Hintergrund-Labels. Hierbei konnte in diesem Versuchsaufbau kein Unterschied zwischen beiden Gruppen ausgemacht werden. Der Theorie zufolge ist der Transport exogener Antigene in HLA-DR-positive späte Endosomen ein entscheidender Schritt im Rahmen der Toleranzinduktion (181, 183). Hier binden Fragmente der aufgenommenen Proteine an HLA-II-Moleküle, mittels derer sie im Anschluss lymphatischen Zellen im Bereich der basolateralen Membran präsentiert werden (213). Verschiedene Studien belegen, dass insbesondere das toxische Gliadinpeptid P31-49 (oder auch P31-43) diesem Mechanismus entgeht, sodass ihm gegenüber keine Toleranz erzeugt werden kann (128, 214).

In dieser Arbeit zeigt sich eine mit den Ergebnissen von *Lübbing et al.* in mit FF inkubierten Kontroll- und Zöliakiebiopsien vergleichbare Markierung von Gliadin in späten Endosomen. Hieraus kann angenommen werden, dass eine gleichzeitige Inkubation von Dünndarmbiopsien mit FF und mTG keinen Einfluss auf den Transport des Gliadins in LE besitzt. Im Gegensatz dazu scheint eine Veränderung seiner intrazellulären Route mittels Choleratoxin B (CTB) sowie Zöliakieserum möglich zu sein. Mehrere Studien stellten sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell eine Modifikation des Transports von Gliadinpeptiden in späte Endosomen durch CTB und Zöliakieserum dar (126–128).

Einen ähnlichen Effekt könnte auch die Komplexierung von mTG-Gliadin-Verbindungen mit spezifisch gegen diese Neo-Epitope gerichteten Antikörpern haben. Der Theorie zu Folge würde der Transport dieser polyvalenten Komplexe in späte Endosomen begünstigt werden, was zu einer Toleranzinduktion gegenüber Gliadin beitragen könnte.

Auch wenn diese Studie keinen direkten Hinweis auf eine Beeinflussung des Transports von Gliadin in späte Endosomen in Anwesenheit von mTG liefert, so konnten doch einige Unterschiede zwischen Zöliakiepatienten und Kontrollen in der intrazellulären Verteilung des Gliadins bei simultaner Inkubation mit mTG beobachtet werden. Generell sind ver-

schiedene Mechanismen denkbar, über welche das Enzym die Aufnahme und den Transport von Gliadinpeptiden beeinflussen könnte. Bereits 1980 zeigten *Davies et al.*, dass Transglutaminasen möglicherweise eine Rolle im Rahmen der rezeptorvermittelten Endozytose spielen. Sie legten durch *In-vitro*-Versuche an Zelllinien nahe, dass Transglutaminasen am Prozess des Clusters und Internalisierens von Rezeptor-Liganden-Komplexen mittels Cross-Linking beteiligt sind (215). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die mTG auch im Zytosol vorliegt, scheint es auch möglich, dass das aktive Enzym intrazelluläre Proteine durch Transamidierung modifiziert. Über diesen Mechanismus wäre eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts mit Einfluss auf den Transport von Gliadin und die Reifung früher Endosomen zu späten Endosomen möglich. In diesem Zusammenhang konnte bereits für andere bakterielle Transglutaminasen die Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts über Deamidierung GPT-bindender Rho-Proteine gezeigt werden (163, 216). Weiterhin legten verschiedene Arbeitsgruppen dar, dass das toxische Gliadinpeptid P31-43 über eine direkte Interaktion mit Aktin eine Störung des biosynthetischen Transports hervorruft (217, 218). Derzeit geht man davon aus, dass dieser Effekt dafür verantwortlich ist, dass das Peptid der Antigenpräsentation mittels MHC-II-Molekülen entgeht und so die Entwicklung der oralen Toleranz eingeschränkt sein kann (214, 217, 219).

#### 4.2.3.4 Lokalisation von mTG und Gliadin in Vakuolen, an der apikalen und basolateralen Membran

Bezüglich der intrazellulären Verteilung zeigten sich zwischen Gliadin und mTG deutliche Unterschiede. Während Gliadin zu einem Anteil von beinahe 40% in Vakuolen vorgefunden wurde, waren nur etwa 25-30% der mTG in diesem Kompartiment nachzuweisen. Andere Autoren legten eine ähnlich ausgeprägte Anreicherung von Gliadinpeptiden in intrazellulären Vesikeln dar wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird (77). *Lübbing et al.* fanden über 50% des intrazellulären Gliadins innerhalb von Vakuolen, während *Melcher et al.* unter Verwendung des monoklonalen Anti-R5-AK wesentlich geringere Mengen der Peptide in diesem Bereich berichten (126, 127). Auch für andere endozytotisch aufgenommene Antigene, beispielsweise Ovalbumin wurde die intrazelluläre Lokalisation hauptsächlich in Vakuolen beobachtet (183).

Auffallend ist der, verglichen mit anderen Antigenen, hohe Anteil an mTG im Bereich der basolateralen Membran. Dort war in Kontroll- und Zöliakiebiopsien über 40% des Labels aufzufinden, während Gliadin nur zu 8% (NCD), beziehungsweise 11% (CD) in diesem

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Kompartiment zu finden war. Die Resultate bezüglich des Gliadins decken sich hierbei mit denen von *Melcher et al.* und *Lübbing et al.*, woraus geschlossen werden kann, dass sich der Transport von mTG von dem des Gliadins unterscheidet (126, 127).

Die basolaterale Membran nimmt eine Schlüsselstellung im Rahmen der Antigenpräsentation ein, da hier der Kontakt der zu präsentierenden Antigene mit lymphatischen Zellen stattfindet. *Hundorfean et al.* konnten in Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn in diesem Kompartiment MHC-I- sowie MHC-II-Moleküle darstellen (171). Auch die Lokalisation dieser Moleküle mit klassischen Nahrungsmittelantigenen wie Ovalbumin und bovinem Serumalbumin an der basolateralen Membran sind *in vivo* in Enterozyten von Ratten und Menschen nachgewiesen worden (182, 183). Die Tatsache, dass in dieser Studie nach einstündiger Inkubation ein solch hoher Anteil an mTG im Bereich der basolateralen Membran lokalisiert war, deutet auf eine Präsentation des Proteins hin.

Ein weiteres Indiz für den Kontakt von mTG mit dem Immunsystem ist deren gehäuftes Auffinden innerhalb der *Lamina propria*. Da der Anteil der mTG an der basolateralen Membran höher und in Vakuolen niedriger war als der von Gliadin, könnte dies für einen schnelleren transzellulären Transport der mTG sprechen.

Was die Lokalisation der Antigene innerhalb des Zytosols anbetrifft, so befanden sich dort in beiden Gruppen etwa 10% der mTG, Gliadin war hier zu deutlich größeren Anteilen nachzuweisen (NCD 20% vs. CD 27%). Allgemein entspricht das zytosolische Vorkommen exogener Antigene nicht dem klassischen Weg der Endozytose sowie der Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle, bei dem endozytotisch aufgenommene Proteine innerhalb des endosomalen Apparates verbleiben (165). Vielmehr deutet die Markierung beider Proteine im Zytosol darauf hin, dass sie dem vakuolären Transport entgangen sind, was eine Voraussetzung für die Antigenkreuzpräsentation im Rahmen des Modells der zytosolischen Degradierung ist (175).

Der Anteil der mTG im Bereich der apikalen Membran war in Kontrollbiopsien (11%) deutlich höher als bei Zöliakiepatienten (7%), ein Unterschied, der ebenso bei Gliadin dargestellt werden konnte (NCD 13% vs. CD 8%). *Melcher et al.* zeigten in BALB/c-Mäusen einen höheren Anteil toxischer und nicht-toxischer Gliadinpeptide (16% und 18%) in diesem Bereich, jedoch unter Verwendung des monoklonalen Anti-Gliadin-AK R5, sodass diese Divergenz möglicherweise auf dem unterschiedlichen Reaktionsverhalten der primären Antikörper beruht (126).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Die Ergebnisse der dritten Versuchsreihe bestätigten hinsichtlich der Kompartimente apikale Membran, Zytosol und basolaterale Membran überwiegend die Beobachtungen der vorangegangenen Untersuchungen. Auch hier zeigte Gliadin ein häufigeres Auftreten im Bereich der apikalen Membran in Kontrollbiopsien. Limitierend erscheint allerdings der Umstand, dass innerhalb der Kontrollgruppe eine große Streuung bezüglich der Verteilung des Gliadins in diesem Bereich vorliegt. Dieses Ergebnis scheint bedingt durch die hohen Werte zweier Kontrollpatienten, einer mit endoskopischem Normalbefund (männlich, 10 Jahre) und einer mit Typ B Gastritis (weiblich, 1 Jahr). Beide Patienten befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt auf einer glutenhaltigen Diät und wiesen eine negative Serologie auf. Eine solche Abweichung der Antigenlokalisation konnte bei diesen Patienten bezüglich der mTG allerdings nicht beobachtet werden. Der Grund für diese starke Streuung ist derzeit nicht bekannt, jedoch konnten ähnliche Beobachtungen bereits durch *Lübbing et al.* gemacht werden (127). Eine artefaktbedingte Entstehung erscheint dabei unwahrscheinlich, da sich das starke Signal auf ein bestimmtes Kompartiment bezieht und keine erhöhte Hintergrundmarkierung in diesen Proben vorlag.

#### 4.2.3.5 Antigenaufnahme durch RACE-Zellen

RACE-Zellen stellen eine bestimmte, bislang kaum untersuchte Zellpopulation innerhalb des Darmepithels dar. Die in dieser Arbeit durchgeführte Quantifizierung der intrazellulären Lokalisation von Gliadin und mTG soll zu einer Charakterisierung der Antigenaufnahme durch diese Zellpopulation beitragen.

Ähnlich wie von *Schürmann et al.* berichtet, wurden RACE-Zellen sowohl in gesunder als auch in entzündeter Mukosa gefunden, eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Grad der Inflammation der Mukosa und der Häufigkeit des Auftretens von RACE-Zellen, wie von dieser Arbeitsgruppe beschrieben, konnte in dem hier vorliegenden, kleinen Kollektiv nicht beobachtet werden (189).

RACE-Zellen zeigten ein bis zu 70-fach höheres intrazelluläres Vorkommen an mTG und Gliadin im Vergleich zu normalen Enterozyten. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von *Schürmann et al.* sowie *Kersting et al.*, konnten beide Proteine vorwiegend innerhalb des Zytosols und des Zellkerns gefunden werden (189, 190). Diese beiden Zellorganelle beinhalteten zusammen im Mittel 82% des Gesamtlabells für mTG (Gliadin 75%). Konsequenterweise ergibt sich hieraus eine relativ geringe Aufnahme in die anderen Kompartimente.

Bemerkenswert ist dabei vor allem der Nachweis geringer Mengen mTG im Bereich der basolateralen Membran der RACE-Zellen (in beiden Gruppen 2%). In Enterozyten lokalisierten hier noch rund 40% des Gesamtlables, eine Beobachtung, die darauf hindeutet, dass RACE-Zellen aufgenommene Antigene womöglich nicht wie normale Darmepithelzellen über die basolaterale Membran präsentieren. Auch im Bereich der apikalen Membran zeigten sich verglichen mit normalen Enterozyten deutlich geringere Mengen an mTG und Gliadin. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass RACE-Zellen die aufgenommenen Antigene sehr schnell aufnehmen und in das Zytosol transferieren.

Die Tatsache, dass RACE-Zellen solch enorme Mengen an Nahrungsmittelantigenen in ihrem Zytosol aufweisen, befähigt sie zum Mechanismus der Kreuzpräsentation, da hier exogene Proteine in das Zytosol gelangen müssen, um dort vom Proteasom degradiert zu werden, was den Eintritt in das ER und die darauffolgende Bindung an MHC-I-Moleküle erst ermöglicht (175). Ob und wie diese Zellart in der Folge Antigene präsentiert bleibt aktuell noch offen. Denkbar scheint auch, dass die Extrusion der RACE-Zellen aus dem Zellverband eine weitreichende Antigenpräsentation verhindert.

#### 4.2.3.6 Transport von mTG und Gliadin in das ER von RACE-Zellen

Hauptaugenmerk bei der Quantifizierung der intrazellulären Antigenverteilung in RACE-Zellen war die Darstellung der Lokalisation beider Proteine im ER.

Die potentielle Rolle der RACE-Zellen im Rahmen der Zöliakie wird klar, wenn man in Betracht zieht, dass sie im Vergleich zu regulären Enterozyten ein Vielfaches an exogenen Antigenen in das ER transportieren und ein signifikanter Unterschied in der Menge an mTG und Gliadin innerhalb dieses Organells zwischen Zöliakiepatienten und Kontrollen bestand.

Der Hypothese nach stellen RACE-Zellen aufgrund ihrer gesteigerten Aufnahme exogener Proteine, eine zur Antigenpräsentation prädestinierte Zellart dar. Hinzu kommt, dass eine große Menge an Antigenen innerhalb des Zytosols zu finden und somit eine Voraussetzung zur Antigenkreuzpräsentation über einen Proteasom-abhängigen Weg gegeben ist (167).

Diese Arbeit zeigt, dass RACE-Zellen vermehrt exogene Antigene in das durch PDI markierte ER transportieren, sodass eine potenzielle Kreuzpräsentation durch sie möglich scheint. Weiterhin legt diese Studie dar, dass RACE-Zellen von Zöliakiepatienten mehr

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

exogene Antigene in das ER aufnehmen als RACE-Zellen von Kontrollen, was auf eine mögliche pathogenetische Rolle dieser Zellart im Rahmen der Zöliakie hinweist.

Aufgrund der morphologischen Besonderheiten der RACE-Zellen scheint es möglich, dass diese gesteigerte Aufnahme in das ER lediglich durch eine Dilatation des Organells bedingt ist. Um die Fläche dieses Zellkompartiments zu quantifizieren, wurde seine Oberflächendichte durch ein etabliertes Verfahren bestimmt. In der Tat zeigte sich eine deutlich niedrigere Oberflächendichte des ER in RACE-Zellen, was im Umkehrschluss eine Dilatation des Organells in dieser Zellart bedeutet. Um nun eine sekundäre, aufgrund der größeren Fläche erhöhte Antigenaufnahme von einem aktiven Transport in das ER zu differenzieren erfolgte die Bestimmung der Markierungsdichte. Diese zeigte eine eindeutig gesteigerte Antigenkonzentration innerhalb des ER von RACE-Zellen, was auf einen gerichteten Transport in dieses Zellkompartiment hinweist.

### **4.3 Die Rolle der mTG im Rahmen der Zöliakie**

Die Rolle der mTG im Rahmen der Zöliakie wird seit geraumer Zeit kontrovers diskutiert.

Einige Studien konnten zeigen, dass die Transamidierung T-Zell-stimulatorischer Epitope des Gliadins mittels mTG und bestimmten Azyklakzeptoren (Lysin- oder Glycinethylester, Cysteamin) die Immunogenität des Glutens verringert (220–226). Dies könnte dadurch begründet sein, dass durch das Cross-Linking zwischen kationischen Aminosäuren und Glutaminresten die Angriffspunkte der TG2 entfallen, sodass die Deamidierung zu Glutamat mit einhergehender Affinitätssteigerung der Epitope gegenüber HLA-DQ2-Rezeptoren ausbleibt.

Allerdings legen manche Arbeiten ebenso dar, dass mTG, in Analogie zur Gewebstransglutaminase, durch Deamidierung spezifischer Glutaminreste im Gegensatz zur Transamidierung eine Steigerung der Immunogenität T-Zell-spezifischer Gliadinsequenzen zur Folge haben kann (221, 222, 227).

Auch wenn die Transamidierung die bevorzugte Reaktion der mTG ist, findet die Deamidierung zu einem gewissen Anteil statt (69, 228). *Falini et al.* gaben an, dass rund 2-6% der Glutaminreste des Gliadins deamidiert wurden und *Berti et al.* wiesen sogar bei gleichzeitiger Inkubation mit Cysteamin eine gewisse Deamidierungsaktivität der mTG nach (221, 227). Auch unter Bedingungen, welche für die Transamidierung optimal sind, werden Gliadinpeptide deamidiert und folglich deren Immunogenität erheblich gesteigert. Da diese

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

deamidierten Sequenzen eine deutlich höhere Affinität zu HLA-DQ-Rezeptoren besitzen, könnte die Stimulation antigenpräsentierender Zellen auch dann erfolgen wenn ein Überschuss an transamidierten Gliadinpeptiden vorliegt (69). Dabei ist entscheidend, dass *in vitro* die Deamidierung immunodominanter Sequenzen des Gliadins durch mTG analog zur TG2, jedoch mit einer breiteren Substratspezifität, beobachtet wurde (69). Die hierdurch entstandenen modifizierten Peptide übten eine proliferative Wirkung auf intestinale T-Zellklone zöliakiekranker Patienten aus, auch wenn dieser Effekt schwächer war als bei Deamidierung durch TG2 (228).

Erst kürzlich wurden durch *Matthias et al.* zöliakiespezifische Immunglobuline der Typen IgA und IgG gegen mTG sowie mTG-Gliadin-Komplexe (mTG-Neo-Epitope) beschrieben (229). Diese Arbeitsgruppe hatte zuvor bereits Antikörper gegen Komplexe aus TG2 und Gliadin nachgewiesen (230). In dieser Arbeit zeigte Zöliakieserum eine deutlich niedrigere Immunreaktivität gegenüber nativer mTG verglichen mit mTG-Gliadin-Komplexen, ein Effekt der möglicherweise auf die simultane Trans- und Deamidierung des Gliadins durch mTG und die daraus folgende Entstehung von Neo-Epitopen, zurückzuführen ist (14, 73).

Der Stellenwert dieser Arbeit im Bezug auf die Rolle der mTG im Rahmen der Zöliakie besteht darin, dass hier ein erster Nachweis der Aufnahme des Proteins durch die Darmschleimhaut erfolgt ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass die mTG in großen Mengen an der basolateralen Membran und innerhalb der *Lamina propria* lokalisiert war, was eine potentielle antigene Interaktion mit Zellen des Immunsystems möglich macht.

Weiterhin zeigte diese Arbeit, dass die mTG sowie Gliadin durch Enterozyten und in größerem Ausmaß durch RACE-Zellen aufgenommen und anschließend in das ER transportiert werden. Dies deutet auf eine räumliche Beziehung von exogenen Antigenen und dem System der MHC-I-abhängigen Antigenpräsentation hin. Ein funktioneller Beweis der Präsentation von mTG und Gliadin an CD8<sup>+</sup> T-Zellen kann jedoch anhand dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Um den möglichen pathogenetischen Einfluss der mTG im Rahmen der Zöliakie in Zukunft genauer zu untersuchen, muss zwischen den antigenen und enzymatischen Eigenschaften des Proteins unterschieden werden. Als Verarbeitungshilfsstoff in der Nahrungsmittelindustrie wird die mTG im Rahmen der Lebensmittelproduktion erhitzt, sodass sie ihre enzymatische Aktivität verliert. Unklar ist jedoch, was in der Folge mit den während der Verarbeitung entstanden mTG-Protein-Komplexen geschieht und inwiefern die mTG nach

der Prozessierung als Antigen fungiert. Es ist allerdings denkbar, dass der Einsatz des Enzyms in der Lebensmittelindustrie negative Folgen für den Verbraucher, allen voran für Personen mit einer Prädisposition für die Entwicklung einer Zöliakie oder Zöliakiepatienten, hat, zumal mTG auch in glutenfreien Fertigprodukten vorhanden ist. Im Sinne des Verbraucherschutzes ist daher, entgegen der jetzigen Gesetzgebung, eine klare Kennzeichnung von Produkten, die mit Hilfe der mTG hergestellt wurden, wünschenswert.

Zur weiteren Erforschung der Auswirkungen des Gebrauchs der mTG in der Lebensmittelindustrie erscheint eine umfangreiche Charakterisierung verschiedener Komplexe aus diesem Enzym und anderen Proteinen sowie ihrer Wirkung auf die Dünndarmschleimhaut sinnvoll.

Insbesondere funktionale Ansätze scheinen hierbei erfolgsversprechend. So könnte die Aktivierung von T-Lymphozyten durch mTG und mTG-Gliadin-Komplexe in kultivierten Dünndarmbiopsien von Zöliakiepatienten und Kontrollen durch Messung der Expression proinflammatorischer Zytokine (z. B. IFN- $\gamma$ ) analysiert werden. Weiterhin wäre auch die ultrastrukturelle Untersuchung des Antigentransports von mTG-Gliadin-Komplexen in Anwesenheit spezifischer Neo-Epitop-Antikörper, in Anlehnung an die hier genutzte Methodik, von Interesse. Möglicherweise werden diese polyvalenten Verbindungen vermehrt in späte Endosomen transportiert, was ein mögliches therapeutisches Potential der mTG darstellen würde.

Neben diesem Aspekt scheint auch die Tatsache bemerkenswert, dass die mTG in einer enzymatisch aktiven Form, als Produkt der intestinalen Mikrobiota in Kontakt mit der Darmschleimhaut treten könnte (161). Dabei scheint eine Verbreitung dieses für das Überleben mancher Mikroorganismen wichtigen Enzyms durch horizontalen Gentransfer innerhalb verschiedener Bakterienspezies möglich (231). Dieser Arbeit zu Folge gelangt native mTG über einen transzellulären Transport bis in die *Lamina propria*, weist somit die gleiche Lokalisation wie die TG2 auf und nimmt womöglich eine ähnliche pathogenetische Rolle wie diese ein. Eine Analyse des Mikrobioms anhand von Duodenalaspirat könnte zeigen, ob Unterschiede in der Art und Anzahl mTG-produzierender Bakterien im Duodenum zwischen Gesunden und Zöliakiepatienten bestehen.

Eine zentrale Erkenntnis dieser Arbeit ist die vermehrte Aufnahme exogener Antigene in das ER durch RACE-Zellen, was diese Zellpopulation für die Antigenkruzpräsentation prädestiniert. Ob dieser Mechanismus jedoch einen immunogenen oder tolerogenen Effekt

auf HLA-I-restringierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzt, ist derzeit unklar. Da RACE-Zellen und Enterozyten eine deutlich unterschiedliche intrazelluläre Antigenverteilung besitzen, sind unterschiedliche Transportwege und damit divergierende Effekte der Antigen-präsentation durch die beiden Zellpopulationen denkbar. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit *in vitro* mTG positive RACE-Zellen durch RANKL-Stimulation induziert wurden, könnte in Zukunft die weitergehende Untersuchung der Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch diese Zellpopulation im Vergleich zu Enterozyten erleichtern.

#### 4.4 Fazit und Perspektiven

Die Pathogenese der Zöliakie ist derzeit nur in Teilen verstanden. Die steigende Inzidenz der Erkrankung in den letzten Jahrzehnten macht bislang nicht erkannte exogene Faktoren als Ursache hierfür wahrscheinlich. Die mTG ist wie die TG2, das zentrale Autoantigen der Zöliakie, in der Lage spezifische Gliadinpeptide zu trans- und deamidieren. Obwohl das Enzym in der Lebensmittelproduktion häufig zum Einsatz kommt, ist sein möglicher krankheitsfördernder Effekt im Rahmen der Zöliakie nur unzureichend erforscht.

Dies ist die erste Arbeit, welche die intrazelluläre Lokalisation der mTG und ihren Einfluss auf die Transportwege von Gliadin in Duodenalbiopsien untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die mTG über einen transzellulären Weg aufgenommen und an die basolaterale Membran sowie die *Lamina propria* transportiert wird, sodass eine antigene Interaktion mit Zellen des Immunsystems in diesen Bereichen möglich scheint.

Daraus lässt sich ableiten, dass die deklarationsfreie Verwendung der mTG möglicherweise Risiken für den Verbraucher, allen voran für Zöliakiepatienten birgt, sodass eine klare Kennzeichnung von Lebensmitteln, welche mit Hilfe der mTG hergestellt wurden, notwendig erscheint. Darüber hinaus könnte eine enzymatisch aktive Form der mTG, welche mutmaßlich durch die intestinale Mikrobiota freigesetzt wird, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Zöliakie spielen. Zukünftige Untersuchungen, welche das Mikrobiom von Zöliakiepatienten und Kontrollen hinsichtlich mTG-kodierender DNA analysieren, könnten hier Klarheit schaffen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis im Rahmen dieser Arbeit ist, dass sowohl mTG als auch Gliadin in das ER von Enterozyten und in größerem Ausmaß von RACE-Zellen gelangen. Dies deutet darauf hin, dass beide Zellarten, möglicherweise über unterschiedliche Mechanismen, zur Kreuzpräsentation exogener Antigene an CD8<sup>+</sup> T-Zellen fähig sind. Dieser

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

besondere Pfad der Antigenpräsentation könnte dabei ein weiterer Faktor sein, welcher zur Zerstörung der Darmschleimhaut im Rahmen der Zöliakie beiträgt.

## **5 Zusammenfassung**

### **Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels**

Die Zöliakie ist eine komplexe inflammatorische Erkrankung, welche sich in genetisch prädisponierten Individuen nach Verzehr von Gliadin und artverwandten Prolaminen manifestieren kann. Eines der diagnostischen Kriterien dieser Erkrankung ist die Vermehrung CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb des Duodenalepithels, die zur Zerstörung der Schleimhaut beitragen. Die Mechanismen, mittels derer diese Lymphozyten ihre zytotoxischen Effekte ausüben, sind bisher nicht gänzlich verstanden, sodass die Kreuzpräsentation eine Rolle im Rahmen der Zöliakie spielen könnte. Die steigende Inzidenz der Erkrankung innerhalb der letzten Jahrzehnte scheint durch die Einwirkung von Umweltfaktoren bedingt zu sein. Einer dieser Faktoren ist möglicherweise die mikrobielle Transglutaminase (mTG), ein Enzym, welches nicht nur in der Herstellung verschiedenster Lebensmittel eingesetzt wird, um Textur oder funktionelle Eigenschaften der Produkte zu verändern, sondern auch durch die intestinale Mikrobiota freigesetzt werden könnte. Obwohl dieses Protein eine völlig unterschiedliche Aminosäuresequenz und Ultrastruktur aufweist, teilt es enzymatische Eigenschaften mit der humanen Gewebstransglutaminase (TG2), dem zentralen Autoantigen der Zöliakie. Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass mTG und Gliadin von Enterozyten aufgenommen und in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden, was auf eine Kreuzpräsentation exogener Antigene durch diese Zellen hindeutet.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden Duodenalbiopsien von 7 Zöliakiepatienten und 11 Kontrollen unter Verwendung von Ussing-Kammer-Slidern strikt von apikal inkubiert. Dabei wurden von jedem Probanden 2 Biopsien gewonnen, eine wurde ausschließlich mit mTG, die andere gleichzeitig mit mTG und mit Frazer's Fraction (FF) inkubiert. Die Auswertung erfolgte auf immunelektronenmikroskopischer Ebene unter Verwendung von Antikörpern gegen PDI (ER-Marker) sowie gegen LAMP2 (Marker für späte Endosomen). Außerdem wurde der Effekt einer viertägigen RANKL-Stimulation auf die Aufnahme von mTG und die Expression des M-Zell-Markers GP2 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in einem Zellkulturmodell untersucht.

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mTG und Gliadin von Enterozyten und in größerem Ausmaß von RACE-Zellen aufgenommen und in das ER transportiert werden. In diesem Zusammenhang enthielt das ER von RACE-Zellen in Zöliakiebiopsien signifikant mehr Antigene, als das von RACE-Zellen in Kontrollproben. Weiterhin zeigte sich eine deutliche Markierung der mTG innerhalb der *lamina propria*, eine Beobachtung, die für Gliadin nicht gemacht werden konnte. Bei simultaner Inkubation von Gliadin und mTG wurden einige Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von Gliadin bei Zöliakiepatienten und Kontrollen dargestellt, welche möglicherweise auf einen Effekt der mTG zurückzuführen sind. Schließlich konnten HT-29 Zellen (*in vitro*) mittels RANKL-Stimulation RACE-Zellen induzieren, welche sich durch ihre klassische zytosolische und nukleäre Antigenaufnahme von mTG und Gliadin sowie die Expression von GP2, einem M-Zell-Marker auszeichneten.

Dies ist die erste Studie, in der der intraepitheliale Transport der mTG untersucht wurde. Die erzielten Ergebnisse legen nahe, dass die mTG die intrazelluläre Lokalisation von Gliadin beeinflusst und dass der Mechanismus der Kreuzpräsentation eine Rolle in der Pathogenese der Zöliakie spielen könnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die mTG die basolaterale Membran sowie die *lamina propria* erreicht und somit die Voraussetzung zu einer antigenen Interaktion mit Zellen des Immunsystems gegeben ist. Da mTG nicht nur in einem enzymatisch inaktiven Zustand mit Nahrungsmitteln in unseren Darm gelangt, sondern womöglich auch in einer aktiven Form durch die intestinale Mikrobiota freigesetzt wird, sind weitere Untersuchungen in Bezug auf die Sicherheit der mTG und ihre Rolle in der Pathogenese der Zöliakie notwendig. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass zum Schutze der Verbraucher eine eindeutige Deklaration der Lebensmittel, bei deren Verarbeitung dieses Enzyms zum Einsatz kam, notwendig ist.

## 6 Summary

### **Intracellular localization of microbial transglutaminase and its influence on the transport of gliadin within the human duodenal epithelium**

Celiac disease (CD) is a complex inflammatory disorder in genetically predisposed individuals, triggered by the ingestion of gliadin and related prolamines. One of the diagnostic hallmarks of the disease is the infiltration of duodenal epithelium by CD8<sup>+</sup> T-cells which contribute to the damage of the mucosa. The mechanisms by which these lymphocytes

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

exert their cytotoxic effects are not fully understood, so that cross-presentation might take place in CD. As the incidence of the disease increased over the past decades, environmental factors may play a major role in the pathogenesis. One of these factors might be microbial transglutaminase (mTG), an enzyme which is frequently used in food industry to achieve specific textures and characteristics of various food products and which could also originate from the intestinal microbiome. This protein, though showing a different amino acid sequence and ultrastructure, shares enzymatic properties with the human tissue transglutaminase (TG2), the autoantigen in CD. In this study we hypothesized that mTG and gliadin are taken up and transported into the ER of enterocytes, thus indicating cross presentation of exogenous antigens.

Thus, we performed strict apical incubation of duodenal biopsies from 7 CD patients and 11 controls using Ussing chamber slider. Of each patient 2 biopsies were obtained, one was incubated with mTG alone and one with mTG and simultaneously with Frazer's Fraction (FF). Evaluation was carried out at an immunoelectronmicroscopical level using antibodies against PDI (ER-marker) and LAMP2 (marker for late endosomes). Furthermore, we examined the effect of RANKL on the uptake of mTG and the expression of the M-cell marker GP2 by immunofluorescence microscopy using a cell culture model.

We were able to demonstrate that mTG and gliadin are taken up and transported into the ER of enterocytes and to a greater extent of RACE cells. In this context, RACE cells of CD patients contained more exogenous antigens in the ER than RACE cells of controls. In addition, mTG showed intense labeling within the lamina propria, which could not be observed for gliadin. Using simultaneous incubation of biopsies with gliadin and mTG, we observed differences in the distribution of gliadin within the tissue from CD patients and controls, which might be traced back to an effect of mTG. By *in vitro*-stimulation of HT-29 cells with RANKL, we were able to induce RACE cells, which were characterized by an increased cytosolic and nuclear uptake of mTG and gliadin as well as the expression of the M cell marker GP2.

This study was the first to investigate the intraepithelial transport of mTG. Our findings reveal that mTG may influence the intracellular localization of gliadin and that cross presentation by enterocytes and RACE cells might play a role in CD pathogenesis. Moreover, we demonstrated that mTG reaches the *lamina propria*, indicating a transepithelial passage within 1 hour. Since mTG may not only be taken up with food stuffs but could also be produced by bacteria within the intestinal microbiota, further investigations are

needed with regard to food safety and the role of mTG in CD pathogenesis. Our investigations suggest a clear declaration of mTG-treated food products for consumer protection.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AGA	Anti-Gliadin-Antikörper
AK	Antikörper
AM	Apikale Membran
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BL	Basolaterale Membran
CD	Celiac Disease/Zöliakie
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DGP	Deamidierte Gliadinpeptide
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell Lymphom
EE	Frühes Endosom
EM	Elektronenmikroskop(-ie)
EMA	Endomysiales Antigen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESPGHAN	European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
FF	Frazer's Fraction
FKS	Fetales Kälberserum
GALT	Darmassoziierte-Lymphatische-Gewebe
GD	Glutenhaltige Diät
GFD	Glutenfreie Diät
Go	Golgi-Apparat
GP2	Glykoprotein 2
HLA	Humanes-Leukozyten Antigen
HRP	Horseradish-Peroxidase
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IF	Immunfluoreszenzmikroskop(-ie)
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kD	Kilodalton
LAMP2	Lysosomal Associated Membrane Protein 2
LE	Spätes Endosom

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

Lsg	Lösung
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
Mi	Mitochondrien
MICA	MHC-class I polypeptide-related sequence A
MIIC	MHC class II-containing compartment
mTG	Mikrobielle Transglutaminase
N-CD	Nicht-Zöliakie
n.s.	Nicht signifikant
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2 Mitglied D
OT	Objekträger
<i>p</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PFA	Paraformaldehyd
ppm	Parts per million
RT	Raumtemperatur
TAP	Transporter associated with antigen presentation
TH	T-Helferzellen
TG2	Gewebstransglutaminase 2/tissue Transglutaminase 2
ZK	Zellkern
Zyt	Zytosol

## 7.2 Literaturverzeichnis

1. **Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo I R, Mearin M L, Phillips A et al.**, European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **54**, 136–160 (2012).
2. **Dubé C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N et al.**, The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations, *Gastroenterology.* **128**, 57-67 (2005).
3. **Tommasini A, Not T, Kiren V, Baldas V, Santon D et al.**, Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay, *Arch Dis Child.* **89**, 512–515 (2004).
4. **Laass M W, Schmitz R, Uhlig H H, Zimmer K P, Thamm M**, The Prevalence of Celiac Disease in Children and Adolescents in Germany, *Dtsch Arztebl Int.* **112**, 553–560 (2015).
5. **Nenna R, Tiberti C, Petrarca L, Lucantoni F, Mennini M et al.**, The celiac iceberg: characterization of the disease in primary schoolchildren, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **56**, 416–421 (2013).
6. **Fasano A, Catassi C**, Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum, *Gastroenterology.* **120**, 636–651 (2001).
7. **Kelly C P, Bai J C, Liu E, Leffler D A**, Advances in diagnosis and management of celiac disease, *Gastroenterology.* **148**, 1175–1186 (2015).
8. **Paveley W F**, From Aretaeus to Crosby: a history of coeliac disease, *BMJ.* **297**, 1646–1649 (1989).
9. **Losowsky M S**, A history of coeliac disease, *Dig Dis.* **26**, 112–120 (2008).
10. **Dicke W K, Weijers H A, van de Kamer J H**, Coeliac disease. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease, *Acta Pediatr.* **42**, 34–42 (1953).
11. **Anderson C M, French J M, Sammons H G, Frazer A C, Gerrard J W et al.**, Coeliac disease, *Lancet.* **259**, 836–842 (1952).
12. **Paulley J W**, Observations on the Aetiology of Idiopathic Steatorrhoea, *BMJ.* **2**, 1318–1321 (1954).
13. **Shiner M**, Duodenal Biopsy, *Lancet.* **270**, 17–19 (1956).

14. **Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U et al.**, Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease, *Nat Med.* **3**, 797–801 (1997).
15. **Ludvigsson J F, Leffler D A, Bai J C, Biagi F, Fasano A et al.**, The Oslo definitions for coeliac disease and related terms, *Gut.* **62**, 43–52 (2013).
16. **Rubio-Tapia A, Kyle R A, Kaplan E L, Johnson D R, Page W et al.**, Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease, *Gastroenterology.* **137**, 88–93 (2009).
17. **Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P et al.**, Increasing prevalence of coeliac disease over time, *Aliment Pharmacol Ther.* **26**, 1217–1225 (2007).
18. **Jean-François B**, The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases.
19. **Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti R B et al.**, Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States - A large multicenter study, *Arch Intern Med.* **163**, 286–292 (2003).
20. **Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S et al.**, The first large population based twin study of coeliac disease, *Gut.* **50**, 624–628 (2002).
21. **Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R et al.**, Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins, *Gut.* **55**, 803–808 (2006).
22. **Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P et al.**, HLA related genetic risk for coeliac disease, *Gut.* **56**, 1054–1059 (2007).
23. **Mäki M, Collin P**, Coeliac disease, *Lancet.* **349**, 1755–1759 (1997).
24. **Fasano A, Catassi C**, Coeliac disease in children, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **19**, 467–478 (2005).
25. **Sollid L M, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F et al.**, Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer, *J Exp Med.* **169**, 345–350 (1989).
26. **Gras P W, Anderssen R S, Keentok M, Békés F, Appels R**, Gluten protein functionality in wheat flour processing: a review, *Aust. J. Agric. Res.* **52**, 1311 (2001).
27. **Waga J**, Structure and Allergenicity of Wheat Gluten Proteins - A review, *Pol J Food Nutr Sci.* **13**, 327–338 (2004).
28. **Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D**, Pathomechanisms in Celiac Disease, *Int Arch Allergy Immunol.* **132**, 98–108 (2003).

29. **Sollid L M**, Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder, *Nat Rev Immunol.* **2**, 647–655 (2002).
30. **Wieser H**, Chemistry of gluten proteins, *Food Microbiol.* **24**, 115–119 (2007).
31. **Molberg O, Flaete N S, Jensen T, Lundin K EA, Arentz-Hansen H et al.**, Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease, *Gastroenterology.* **125**, 337–344 (2003).
32. **Vader LW, Ru A de, van de Wal Y, Kooy Y M, Benckhuijsen W E et al.**, Specificity of Tissue Transglutaminase Explains Cereal Toxicity in Celiac Disease, *J Exp Med.* **195**, 643–649 (2002).
33. **Kagnoff M F**, Overview and pathogenesis of celiac disease, *Gastroenterology.* **128**, 10-18 (2005).
34. **Lundin K EA, Nilsen E M, Scott H G, Loberg E M, Gjoen A et al.**, Oats induced villous atrophy in coeliac disease, *Gut.* **52**, 1649–1652 (2003).
35. **Kilmartin C, Lynch S, Abuzakouk M, Wieser H, Feighery C**, Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following in vitro culture, *Gut.* **52**, 47–52 (2003).
36. **Comino I, Real A, Lorenzo L de, Cornell H, Lopez-Casado M A et al.**, Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease, *Gut.* **60**, 915–922 (2011).
37. **Felber J, Aust D, Baas S, Bischoff S, Bläker H et al.**, Ergebnisse einer S2k-Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) gemeinsam mit der Deutschen Zöliakie-Gesellschaft (DZG) zur Zöliakie, Weizenallergie und Weizensensitivität, *Z Gastroenterol.* **52**, 711–743 (2014).
38. **Zimmer K-P**, Nutrition and Celiac Disease, *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care.* **41**, 244–247.
39. **Wieser H, Seilmeier W, Eggert M, Belitz H-D**, Tryptophangehalt von Getreideproteinen, *Z Lebensm Unters Forsch.* **177**, 457–460 (1983).
40. **Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F et al.**, Structural basis for gluten intolerance in Celiac sprue, *SCIENCE.* **297**, 2275–2279 (2002).
41. **Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A et al.**, Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease, *Gastroenterology.* **129**, 786–796 (2005).

42. **Anderson R P, van Heel D A, Tye-Din J A, Jewell D P, Hill A VS**, Antagonists and non-toxic variants of the dominant wheat gliadin T cell epitope in coeliac disease, *Gut*. **55**, 485–491 (2006).
43. **van de Wal Y, Kooy Y M C, Drijfhout J W, Amons R, Koning F**, Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ( $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ ) molecule, *Immunogenetics*. **44**, 246–253 (1996).
44. **Kim C Y, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid L M**, Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 4175–4179 (2004).
45. **Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson L A**, Breast-feeding protects against celiac disease, *Am J Clin Nutr*. **75**, 914–921 (2002).
46. **Vriezinga S L, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A et al.**, Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease, *N Engl J Med*. **371**, 1304–1315 (2014).
47. **Norris J M, Barriga K, Hoffenberg E J, Taki I, Miao D et al.**, Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease, *JAMA*. **293**, 2343–2351 (2005).
48. **Koletzko B, Bauer C-P, Brönstrup A, Cremer M, Flothkötter M et al.**, Säuglingsernährung und Ernährung der stillenden Mutter, *Monatsschr Kinderheilkd*. **161**, 237–246 (2013).
49. **Agostino C, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, Kolacek S et al.**, Complementary Feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **46**, 99–110 (2008).
50. **Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma G de, Varea V et al.**, The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease, *Gut*. **64**, 406–417 (2015).
51. **Cenit M C, Olivares M, Codoñer-Franch P, Sanz Y**, Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution?, *Nutrients*. **7**, 6900–6923 (2015).
52. **Klemenak M, Dolinsek J, Langerholc T, Di Gioia D, Micetic-Turk D**, Administration of *Bifidobacterium breve* Decreases the Production of TNF- $\alpha$  in Children with Celiac Disease, *Dig Dis Sci*. **60**, 3386–3392 (2015).

53. **Di Cagno R, Angelis M de, Pasquale I de, Ndagijimana M, Vernocchi P et al.**, Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization, *BMC MICROBIOLOGY*. **11** (2011).
54. **Collado M C, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y**, Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease, *J Clin Pathol*. **62**, 264–269 (2009).
55. **Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M et al.**, Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children, *Pediatrics*. **125**, e1433-40 (2010).
56. **Galipeau H J, McCarville J L, Huebener S, Litwin O, Meisel M et al.**, Intestinal Microbiota Modulates Gluten-Induced Immunopathology in Humanized Mice, *Am J Pathol* (2015).
57. **Stene L C, Honeyman M C, Hoffenberg E J, Haas J E, Sokol R J et al.**, Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study, *Am J Gastroenterol*. **101**, 2333–2340 (2006).
58. **Bouziat R, Hinterleitner R, Brown J J, Stencel-Baerenwald J E, Ikizler M et al.**, Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease, *SCIENCE*. **356**, 44–50 (2017).
59. **Tosi R, Vismara D, Tanigaki N, Battista Ferrara G, Cicimarra F et al.**, Evidence that coeliac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity, *Clin Immunol Immunopathol*. **28**, 395–404 (1983).
60. **Mearin M L, Biemond I, Peña A S, Polanco I, Vazquez C et al.**, HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease, *Gut*. **24**, 532–537 (1983).
61. **Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid L M**, Pathomechanisms in celiac disease, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **19**, 373–387 (2005).
62. **Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R et al.**, HLA-DQ and risk gradient for celiac disease, *Hum Immunol*. **70**, 55–59 (2009).
63. **Bevan S, Popat S, Houlston R S**, Relative power of linkage and transmission disequilibrium test strategies to detect non-HLA linked coeliac disease susceptibility genes, *Gut*. **45**, 668–671 (1999).
64. **Popat S, Hearle N, Hogberg L, Braegger C P, O'Donoghue D et al.**, Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease, *Ann Hum Genet*. **66**, 125–137 (2002).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

65. **Greco L, Corazza G, Babron M C, Clot F, Fulchignoni-Lataud M C et al.**, Genome search in celiac disease, *Am J Hum Genet.* **62**, 669–675 (1998).
66. **Naluai A T, Nilsson S, Gudjonsdottir A H, Louka A S, Ascher H et al.**, Genome-wide linkage analysis of Scandinavian affected sib-pairs supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosomes 5 and 11, *Eur J Hum Genet.* **9**, 938–944 (2001).
67. **Bruce S E, Bjarnason I, Peters T J**, Human jejunal transglutaminase: demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease, *Clin Sci.* **68**, 573–579 (1985).
68. **Griffin M, Casadio R, Bergamini C M**, Transglutaminases: Nature's biological glues, *Biochem J.* **368**, 377–396 (2002).
69. **Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, Sjoström H**, Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease, *Biochim Biophys Acta.* **1690**, 220–230 (2004).
70. **Fleckenstein B, Molberg Y, Qiao S W, Schmid D G, Mullbe F von der et al.**, Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in Celiac disease - Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation reactions, *J Biol Chem.* **277**, 34109–34116 (2002).
71. **Molberg O, McAdam S N, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C et al.**, Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease, *Nat Med.* **4**, 713–717 (1998).
72. **Skovbjerg H, Anthonsen D, Knudsen E, Sjöström H**, Deamidation of gliadin peptides in lamina propria: implications for celiac disease, *Dig Dis Sci.* **53**, 2917–2924 (2008).
73. **Schuppan D, Ciccocioppo R**, Coeliac disease and secondary autoimmunity, *Dig Liver Dis.* **34**, 13–15 (2002).
74. **Fleckenstein B, Qiao S W, Larsen, Jung G, Roepstorff P et al.**, Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides, *J Biol Chem.* **279**, 17607–17616 (2004).
75. **Fasano A, Not T, Wang W L, Uzzau S, Berti I et al.**, Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease, *Lancet.* **355**, 1518–1519 (2000).

76. **Mazumdar K, Alvarez X, Borda J T, Dufour J, Martin E et al.**, Visualization of transepithelial passage of the immunogenic 33-residue peptide from alpha-2 gliadin in gluten-sensitive macaques, *PLoS ONE*. **5**, e10228 (2010).
77. **Schumann M, Richter J F, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M et al.**, Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue, *Gut*. **57**, 747–754 (2008).
78. **Clemente M G, Virgiliis S de, Kang J S, Macatagney R, Musu M P et al.**, Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function, *Gut*. **52**, 218–223 (2003).
79. **Lundin K E, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen T S et al.**, Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501,beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients, *J Exp Med*. **178**, 187–196 (1993).
80. **Zimmer K P, Poremba C, Weber P, Ciclitira P J, Harms E**, Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes. **36**, 703–709 (1995).
81. **Nilsen E M, Lundin K E, Krajci P, Scott H, Sollid L M et al.**, Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma, *Gut*. **37**, 766–776 (1995).
82. **Sollid L M**, Molecular basis of celiac disease, *Annu Rev Immunol*. **18**, 53–81 (2000).
83. **Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S et al.**, Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease, *Gastroenterology*. **119**, 996–1006 (2000).
84. **Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D et al.**, Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease, *Gut*. **55**, 469–477 (2006).
85. **Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V et al.**, Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease, *Lancet*. **362**, 30–37 (2003).
86. **Shamir R, Heyman M B, Koning F, Wijmenga C, Gutierrez-Achury J et al.**, Celiac disease: past, present, and future challenges: dedicated to the memory of our friend and colleague, Prof David Branski (1944-2013), *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **59 Suppl 1**, 1-20 (2014).

87. **Meresse B, Chen Z G, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G et al.**, Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease, *Immunity*. **21**, 357–366 (2004).
88. **Jabri B, Serre N P–M de, Cellier C, Evans K, Gache C et al.**, Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease, *Gastroenterology*. **118**, 867–879 (2000).
89. **Hue S, Mention J-J, Monteiro R C, Zhang S, Cellier C et al.**, A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease, *Immunity*. **21**, 367–377 (2004).
90. **Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, D'alo S, Pistoia M A et al.**, Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD), *Clin Exp Immunol*. **120**, 235–240 (2000).
91. **Rashid M, Cranney A, Zarkadas M, Graham I D, Switzer C et al.**, Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in Canadian children, *Pediatrics*. **116**, 754–759 (2005).
92. **Murray J A, Watson T, Clearman B, Mitros F**, Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease, *Am J Clin Nutr*. **79**, 669–673 (2004).
93. **McIntyre A S, Long R G**, Prospective survey of investigations in outpatients referred with iron deficiency anaemia, *Gut*. **34**, 1102–1107 (1993).
94. **Annibale B, Capurso G, Chistolini A, D'Ambra G, DiGiulio E et al.**, Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms, *Am J Med*. **111**, 439–445 (2001).
95. **Groll A, Candy D C, Preece M A, Tanner J M**, Short stature as the primary manifestation of coeliac disease, *Lancet*. **316**, 1097–1099 (1980).
96. **Collin P, Vilksa S, Heinonen P, Hällström O, Pikkarainen P**, Infertility and coeliac disease, *Gut*. **39**, 382–384 (1996).
97. **Gasbarrini A, Torre E S, Trivellini C, Carolis S de, Caruso A et al.**, Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease, *Lancet*. **356**, 399–400 (2000).
98. **Bouquet F**, Coeliac disease, epilepsy, and cerebral calcifications, *Lancet*. **340**, 439–443 (1992).
99. **Zelnik N, Pacht A, Obeid R, Lerner A**, Range of Neurologic Disorders in Patients With Celiac Disease, *Pediatrics*. **113**, 1672–1676 (2004).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

100. **Rodeck B, Zimmer K-P**, *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung* (Springer, Berlin Heidelberg, ed. 2, 2013).
101. **Bolotin D, Petronic-Rosic V**, Dermatitis herpetiformis Part I. Epidemiology, pathogenesis, and clinical presentation, *J Am Acad Dermatol.* **64**, 1017–1024 (2011).
102. **Agardh D, Nilsson A, Tuomi T, Lindberg B, Carlsson A K et al.**, Prediction of silent celiac disease at diagnosis of childhood type 1 diabetes by tissue transglutaminase autoantibodies and HLA, *Pediatr Diabetes.* **2**, 58–65 (2001).
103. **Holmes G KT**, Coeliac disease and Type 1 diabetes mellitus - the case for screening, *Diabet Med.* **18**, 169–177 (2001).
104. **Larizza D, Calcaterra V, Giacomo C de, Silvestri A de, Asti M et al.**, Celiac disease in children with autoimmune thyroid disease, *J Pediatr.* **139**, 738–740 (2001).
105. **Cataldo F, Marino V, Bottaro G, Greco P, Ventura A**, Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency, *J Pediatr.* **131**, 306–308 (1997).
106. **Bonamico M, Pasquino A M, Mariani P, Danesi H M, Culasso F et al.**, Prevalence and clinical picture of celiac disease in Turner syndrome, *J Clin Endocrinol Metab.* **87**, 5495–5498 (2002).
107. **Bonamico M, Mariani P, Danesi H M, Crisogianni M, Failla P et al.**, Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **33**, 139–143 (2001).
108. **Carnicer J, Farre C, Varea V, Vilar P, Moreno J et al.**, Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome, *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **13**, 263–267 (2001).
109. **Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R et al.**, The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease, *Gastroenterology.* **128**, S38-S46 (2005).
110. **Schuppan D, Zimmer K-P**, Diagnostik und Therapie der Zöliakie, *Dtsch Arztebl Int.* **110**, 835–846 (2013).
111. **Oberhuber G, Caspary W F, Kirchner T, Borchard F, Stolte M**, Arbeitsgemeinschaft für gastroenterologische Pathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, *Z Gastroenterol.* **39**, 157–166 (2001).
112. **Marsh M N**, Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'), *Gastroenterology.* **102**, 330–354 (1992).

113. **Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H**, The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists, *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **11**, 1185–1194 (1999).
114. **Corazza G R, Villanacci V**, Coeliac disease, *J Clin Pathol.* **58**, 573–574 (2005).
115. **Holtmeier W, Caspary W F**, Celiac disease, *Orphanet J Rare Dis.* **1** (2006).
116. **Collin P, Maki M, Kaukinen K**, Complete small intestinal mucosal recovery is obtainable in the treatment of celiac disease, *Gastrointest Endosc.* **59**, 158–159 (2004).
117. Codex committee on nutrition and foods for special dietary uses (2008) Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex standard 118-1979. Available: [www.codexalimentarius.org/download/standards/291/cxs\\_118e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/291/cxs_118e.pdf). Accessed 15 Jun 2016.
118. Verordnung (EG) Nr. 41/2009 der Kommission vom 20. Januar 2009 zur Zusammensetzung und Kennzeichnung von Lebensmitteln, die für Menschen mit einer Glutenunverträglichkeit geeignet sind. Available: [www.http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32009R0041](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32009R0041). Accessed 15 Jun 2016.
119. **Wild D, Robins G G, Burley V J, Howdle P D**, Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **32**, 573–581 (2010).
120. **Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V**, Gluten free diet and nutrient deficiencies, *Clin Nutr.* **35**, 1236–1241 (2016).
121. **Shepherd S J, Gibson P R**, Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease, *J Hum Nutr Diet.* **26**, 349–358 (2013).
122. **Hallert C, Grant C, Grehn S, Granno C, Hulten S et al.**, Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years, *Aliment Pharmacol Ther.* **16**, 1333–1339 (2002).
123. **Lee A R, Ng D L, Dave E, Ciaccio E J, Green P H R**, The effect of substituting alternative grains in the diet on the nutritional profile of the gluten-free diet, *J Hum Nutr Diet.* **22**, 359–363 (2009).
124. **Fabiani E, Taccari L M, Rtsch I-M, Di Giuseppe S, Coppa G V et al.**, Compliance with gluten-free diet in adolescents with screening-detected celiac disease, *J Pediatr.* **136**, 841–843 (2000).

125. **Cerf-Bensussan N, Matysiak-Budnik T, Cellier C, Heyman M**, Oral proteases: a new approach to managing coeliac disease, *Gut*. **56**, 157–160 (2007).
126. **Melcher C A, Schmitz M, Hildebrand R, Zimmer K P**, Targeting of gliadin peptide alpha 31-49 to late endosomes of enterocytes of infantile mice by conjugation to cholera toxin B subunit (CTB), *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. **50**, 26-27 (2010).
127. **Lubbing N, Barone M-V, Rudloff S, Troncone R, Auricchio S et al.**, Correction of gliadin transport within enterocytes through celiac disease serum, *Pediatr Res*. **70**, 357–362 (2011).
128. **Zimmer K-P, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M et al.**, Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes, *Gut*. **59**, 300–310 (2010).
129. **Buning J, Hundorfean G, Schmitz M, Zimmer K-P, Strobel S et al.**, Antigen targeting to MHC class II-enriched late endosomes in colonic epithelial cells: trafficking of luminal antigens studied in vivo in Crohn's colitis patients, *FASEB J*. **20**, 359–361 (2006).
130. **Corrao G, Corazza G R, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C et al.**, Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study, *Lancet*. **358**, 356–361 (2001).
131. **Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen T S, Ekstrom K et al.**, Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis, *Gastroenterology*. **123**, 1428–1435 (2002).
132. **Card T R, West J, Holmes G K T**, Risk of malignancy in diagnosed coeliac disease: a 24-year prospective, population-based, cohort study, *Aliment Pharmacol Ther*. **20**, 769–775 (2004).
133. **Holmes GKT**, Coeliac disease and malignancy, *Dig Liver Dis*. **34**, 229–237 (2002).
134. **Holmes G K, Prior P, Lane M R, Pope D, Allan R N**, Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet, *Gut*. **30**, 333–338 (1989).
135. **Rubio-Tapia A, Hill I D, Kelly C P, Calderwood A H, Murray J A**, ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease, *Am J Gastroenterol*. **108**, 656-76; quiz 677 (2013).
136. **Al-toma A, Verbeek W H M, Hadithi M, Blomberg B M E von, Mulder C J J**, Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience, *Gut*. **56**, 1373–1378 (2007).

137. **Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M et al.**, Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms, *Agric Biol Chem.* **53**, 2613–2617 (1989).
138. **Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H et al.**, Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium sp.* strain s-8112, *J Biol Chem.* **268**, 11565–11572 (1993).
139. **Kashiwagi T, Yokoyama K-I, Ishikawa K, Ono K, Ejima D et al.**, Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*, *J Biol Chem.* **277**, 44252–44260 (2002).
140. **Jong G A H de, Wijngaards G, Boumans H, Koppelman S J, Hessing M**, Purification and Substrate Specificity of Transglutaminases from Blood and *Streptovorticillium mobaraense*, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3389–3393 (2001).
141. **Shimba N, Yokoyama K-I, Suzuki E-i**, NMR-Based Screening Method for Transglutaminases, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1330–1334 (2002).
142. **Taguchi S, Nishihama K-i, Igi K, Ito K, Taira H et al.**, Substrate Specificity Analysis of Microbial Transglutaminase Using Proteinaceous Protease Inhibitors As Natural Model Substrates, *J Biochem.* **128**, 415–425 (2000).
143. **Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J**, Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing, *Appl Microbiol Biotechnol.* **44**, 277–282 (1995).
144. **Date M, Yokoyama K-i, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y**, Production of Native-Type *Streptovorticillium mobaraense* Transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl Environ Microbiol.* **69**, 3011–3014 (2003).
145. **Salis B, Spinetti G, Scaramuzza S, Bossi M, Saccani Jotti G et al.**, High-level expression of a recombinant active microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, *BMC Biotechnol.* **15**, 84 (2015).
146. **Nonaka M, Sawa A, Matsuura Y, Motoki M, Nio N**, Deamidation of Several Food Proteins Using Free and Immobilized Ca<sup>2+</sup>-Independent Microbial Transglutaminase, *Biosci Biotechnol Biochem.* **60**, 532–533 (1996).
147. **Ohtsuka T, Umezawa Y, Nio N, Kubota K**, Comparison of Deamidation Activity of Transglutaminases, *J Food Sci.* **66**, 25–29 (2001).
148. **Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y**, Properties and applications of microbial transglutaminase, *Appl Microbiol Biotechnol.* **64**, 447–454 (2004).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

149. **Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C et al.**, Production of Restructured Meat using Microbial Transglutaminase without Salt or Cooking, *J Food Science*. **62**, 488–490 (1997).
150. **Romero de Avila M D, Ordóñez J A, La Hoz L de, Herrero A M, Cambero M I**, Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham, *Meat Sci*. **84**, 747–754 (2010).
151. **Santhi D, Kalaikannan A, Malairaj P, Arun Prabhu S**, Application of Microbial Transglutaminase in Meat Foods: A Review, *Crit Rev Food Sci Nutr*, **0** (2015).
152. **Cozzolino A, Di Pierro P, Mariniello L, Sorrentino A, Masi P et al.**, Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase, *Biotechnol Appl Biochem*. **38**, 289–295 (2003).
153. **Şanlı T, Sezgin E, Deveci O, Şenel E, Benli M**, Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt, *Food Hydrocoll*. **25**, 1477–1481 (2011).
154. **Smerdel B, Pollak L, Novotni D, Cukelj N, Benkovic M et al.**, Improvement of gluten-free bread quality using transglutaminase, various extruded flours and protein isolates, *Food Nutr Res*. **51**, 242–253 (2012).
155. **Gerrard J A, Fayle S E, Wilson A J, Newberry M P, Ross M et al.**, Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase, *J Food Sci*. **63**, 472–475 (1998).
156. **Gerrard J A, Sutton K H**, Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for coeliac disease, *Trends Food Sci Technol*. **16**, 510–512 (2005).
157. **Lerner A, Matthias T**, Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis, *Nutr Rev*. **73**, 544–552 (2015).
158. Bundesinstitut für Risikobewertung, Transglutaminase in Fleischerzeugnissen - Aktualisierte Stellungnahme Nr. 052/2011 des BfR vom 30. November 2011. Available: [www.mobil.bfr.bund.de/cm/343/transglutaminase-in-fleischerzeugnissen.pdf](http://www.mobil.bfr.bund.de/cm/343/transglutaminase-in-fleischerzeugnissen.pdf). Accessed 11 September 2016.
159. Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung - LMKV). Available: [www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/lmkv/gesamt.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/lmkv/gesamt.pdf). Accessed 06 September 2016.
160. Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20.03.2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Etikettierung

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

- und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür. Available: [www.eur-lex.europa.eu/legal-content/de/ALL/?uri=CELEX%3A32000L0013](http://www.eur-lex.europa.eu/legal-content/de/ALL/?uri=CELEX%3A32000L0013). Accessed 14 September 2016.
161. **Lerner A, Aminov R, Matthias T**, Transglutaminases in Dysbiosis As Potential Environmental Drivers of Autoimmunity, *Front Microbiol.* **8**, 66 (2017).
  162. **Makarova K S, Aravind L, Koonin E V**, A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases, *Protein Sci.* **8**, 1714–1719 (1999).
  163. **Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, Kashimoto T, Katahira J et al.**, Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho, *Proc Natl Acad Sci.* **94**, 11623–11626 (1997).
  164. **Murphy K M, Travers P, Walport M**, *Janeway Immunologie* (Springer Berlin, Berlin, ed. 7, 2014).
  165. **Neefjes J, Jongmsa M L M, Paul P, Bakke O**, Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nat Rev Immunol.* **11**, 823–836 (2011).
  166. **Park B, Lee S, Kim E, Cho K, Riddell S R et al.**, Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing, *Cell.* **127**, 369–382 (2006).
  167. **Grommé M, Neefjes J**, Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways, *Mol Immunol.* **39**, 181–202 (2002).
  168. **Metschnikoff E**, Lecture on Phagocytosis and Immunity, 213–217 (1891).
  169. **Germain R N**, MHC-Dependent Antigen Processing and Peptide Presentation: Providing Ligands for T Lymphocyte Activation, *Cell.* **76**, 287–299 (1994).
  170. **den Haan J MM, Lehar S M, Bevan M J**, CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo, *J Exp Med.* **192**, 1685–1695 (2000).
  171. **Hundorfean G, Zimmer K-P, Strobel S, Gebert A, Ludwig D et al.**, Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **293**, 798-808 (2007).
  172. **Kurts C, Robinson B W S, Knolle P A**, Cross-priming in health and disease, *Nat Rev Immunol.* **10**, 403–414 (2010).

173. **Cruz F M, Colbert J D, Merino E, Kriegsman B A, Rock K L**, The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules, *Annu Rev Immunol.* **35**, 149–176 (2017).
174. **Kurts C, Kosaka H, Carbone F R, Miller J, Heath W R**, Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells, *J Exp Med.* **186**, 239–245 (1997).
175. **Kovacsovics-Bankowski M, Rock K L**, A Phagosome-to-Cytosol Pathway for Exogenous Antigens Presented on MHC Class I Molecules, *SCIENCE.* **267**, 243–246 (1995).
176. **Larsson M, Fonteneau J F, Bhardwaj N**, Dendritic cells resurrect antigens from dead cells, *Trends Immunol.* **22**, 141–148 (2001).
177. **Burgdorf S, Kautz A, Boehnert V, Knolle P A, Kurts C**, Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation, *SCIENCE.* **316**, 612–616 (2007).
178. **Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R, Kurts C**, Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation, *Nat Immunol.* **9**, 558–566 (2008).
179. **Song R, Harding C V**, Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway, *J Immunol.* **156**, 4182–4190 (1996).
180. **Mayrhofer G, Spargo L D**, Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine, *Immunol Cell Biol.* **67 ( Pt 4)**, 251–260 (1989).
181. **Hershberg R M, Framson P E, Cho D H, Lee L Y, Kovats S et al.**, Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing, *J Clin Invest.* **100**, 204–215 (1997).
182. **Gonnella P A, Wilmore D W**, Co-localization of class II antigen and exogenous antigen in the rat enterocyte, *J Cell Sci.* **106**, 937–940 (1993).
183. **Zimmer K P, Buning J, Weber P, Kaiserlian D, Strobel S**, Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes, *Gastroenterology.* **118**, 128–137 (2000).

184. **Hershberg R M, Cho D H, Youakim A, Bradley M B, Lee J S et al.**, Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells, *J Clin Invest.* **102**, 792–803 (1998).
185. **Kaiserlian D, Vidal K, Revillard J P**, Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells, *Eur J Immunol.* **19**, 1513–1516 (1989).
186. **Gianfrani C, Troncone R, Mugione P, Cosentini E, Pascale M de et al.**, Celiac Disease Association with CD8+ T Cell Responses, *J Immunol.* **170**, 2719–2726 (2003).
187. **Snoeck V, Goddeeris B, Cox E**, The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake, *Microbes Inf.* **7**, 997–1004 (2005).
188. **Framson P E, Cho D H, Lee L Y, Hershberg R M**, Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells, *Gastroenterology.* **116**, 1054–1062 (1999).
189. **Schürmann G, Brüwer M, Klotz A, Schmid K W, Senninger N et al.**, Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease, *Int J Colorectal Dis.* **14**, 41–46 (1999).
190. **Kersting S, Bruewer M, Schuermann G, Klotz A, Utech M et al.**, Antigen Transport and Cytoskeletal Characteristics of a Distinct Enterocyte Population in Inflammatory Bowel Diseases, *Am J Pathol.* **165**, 425–437 (2004).
191. **Frazer A C, Fletcher R F, Ross C A, Shaw B, Sammons H G et al.**, Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten, *Lancet.* **2**, 252–255 (1959).
192. **Tokuyasu K T**, A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues, *J Cell Biol.* **57**, 551–565 (1973).
193. **Tokuyasu K T**, A study of positive staining of ultrathin frozen sections, *J Ultrastruct Res.* **63**, 287–307 (1978).
194. **Griffiths G, Hoppeler H**, Quantitation in immunocytochemistry: correlation of immunogold labeling to absolute number of membrane antigens, *J Histochem Cytochem.* **34**, 1389–1398 (1986).
195. **Faulk W P, Taylor G M**, An immunocolloid method for the electron microscope, *Immunochemistry.* **8**, 1081–1083 (1971).
196. **Gregori L, Hainfeld J F, Simon M N, Goldgaber D**, Binding of amyloid beta protein to the 20 S proteasome, *J Biol Chem.* **272**, 58–62 (1997).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

197. G. Griffiths, Ed., *Fine structure immunocytochemistry* (Springer, Heidelberg Germany, 1993).
198. **Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Kontakou M, Ciclitira PJ et al.**, Wheat peptide challenge in coeliac disease, *The Lancet*. **343**, 758–761 (1994).
199. **Korponay-Szabo I R**, In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies, *Gut*. **53**, 641–648 (2004).
200. **Ohno H**, Intestinal M cells, *J Biochem*. **159**, 151–160 (2016).
201. **Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes G S, Fukuda S et al.**, Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response, *Nature*. **462**, 226–230 (2009).
202. **Lau d W, Kujala P, Schneeberger K, Middendorp S, Li V S W et al.**, Peyer's patch M cells derived from Lgr5(+) stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts" *Mol Cell Biol*. **32**, 3639–3647 (2012).
203. **Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl J P, Pringault E**, Conversion by Peyer's Patch Lymphocytes of Human Enterocytes into M Cells that Transport Bacteria, *SCIENCE*. **277**, 949–952 (1997).
204. **Rouch J D, Scott A, Lei N Y, Solorzano-Vargas R S, Wang J et al.**, Development of Functional Microfold (M) Cells from Intestinal Stem Cells in Primary Human Enteroids, *PLoS ONE*. **11**, e0148216 (2016).
205. **Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, Malterer G, Donaldson D S et al.**, Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion, *Cell Host Microbe*. **12**, 645–656 (2012).
206. **Pappenheimer J R, Reiss K Z**, Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat, *J Membr Biol*. **100**, 123–136 (1987).
207. **Liu Z, Ni L, Neu J**, Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases, *Acta Paediatr*. **94**, 386–393 (2005).
208. **Lerner A, Matthias T**, Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease, *Autoimmun Rev*. **14**, 479–489 (2015).
209. **Vogelsang H, Schwarzenhofer M, Oberhuber G**, Changes in Gastrointestinal Permeability in Celiac Disease, *Dig Dis*. **16**, 333–336 (1998).

210. **Schulzke J D, Bentzel C J, Schulzke I, Riecken E O, Fromm M**, Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue, *Pediatr Res.* **43**, 435–441 (1998).
211. **Imai J, Hasegawa H, Maruya M, Koyasu S, Yahara I**, Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells, *Int Immunol.* **17**, 45–53 (2005).
212. **Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E et al.**, Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis, *Gastroenterology.* **134**, 1017–1027 (2008).
213. **Rowell J F, Ruff A L, Guarnieri F G, Staveley-O'Carroll K, Lin X et al.**, Lyso-some-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells, *J Immunol.* **155**, 1818–1828 (1995).
214. **Barone M V, Nanayakkara M, Paoella G, Maglio M, Vitale V et al.**, Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation, *PLoS ONE.* **5**, 1-12 (2010).
215. **Davies P J A, Davies D R, Levitzki A, Maxfield F R, Milhaud P et al.**, Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha2-makroglobulin and polypeptide hormones, *Nature.* **283**, 162–167 (1980).
216. **Schmidt G, Selzer J, Lerm M, Aktories K**, The Rho-deamidating Cytotoxic Necrotizing Factor 1 from *Escherichia coli* Possesses Transglutaminase Activity, *J. Biol. Chem.* **273**, 13669–13674 (1998).
217. **Reinke Y, Behrendt M, Schmidt S, Zimmer K-P, Naim H Y**, Impairment of protein trafficking by direct interaction of gliadin peptides with actin, *Exp Cell Res.* **317**, 2124–2135 (2011).
218. **Reinke Y, Zimmer K-P, Naim H Y**, Toxic peptides in Frazer's fraction interact with the actin cytoskeleton and affect the targeting and function of intestinal proteins, *Experimental cell research.* **315**, 3442–3452 (2009).
219. **Barone M V, Gimigliano A, Castoria G, Paoella G, Maurano F et al.**, Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease, *Gut.* **56**, 480–488 (2007).
220. **Lombardi E, Bergamo P, Maurano F, Bozzella G, Luongo D et al.**, Selective inhibition of the gliadin-specific, cell-mediated immune response by transamidation with microbial transglutaminase, *J Leukoc Biol.* **93**, 479–488 (2013).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels

221. **Falini M L, Elli L, Caramanico R, Bardella M T, Terrani C et al.**, Immunoreactivity of antibodies against transglutaminase-deamidated gliadins in adult celiac disease, *Dig Dis Sci.* **53**, 2697–2701 (2008).
222. **Elli L, Roncoroni L, Hils M, Pasternack R, Barisani D et al.**, Immunological effects of transglutaminase-treated gluten in coeliac disease, *Hum Immunol.* **73**, 992–997 (2012).
223. **Mazzeo M F, Bonavita R, Maurano F, Bergamo P, Siciliano R A et al.**, Biochemical modifications of gliadins induced by microbial transglutaminase on wheat flour, *Biochim Biophys Acta.* **1830**, 5166–5174 (2013).
224. **Heredia-Sandoval N G, Islas-Rubio A R, Cabrera-Chavez F, Calderon de la Barca, Ana Maria**, Transamidation of gluten proteins during the bread-making process of wheat flour to produce breads with less immunoreactive gluten, *Food Funct.* **5**, 1813–1818 (2014).
225. **Gianfrani C, Siciliano R A, Facchiano A M, Camarca A, Mazzeo M F et al.**, Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease, *Gastroenterology.* **133**, 780–789 (2007).
226. **Zhou L, Kooy-Winkelaar Y M C, Cordfunke R A, Dragan I, Thompson A et al.**, Abrogation of Immunogenic Properties of Gliadin Peptides through Transamidation by Microbial Transglutaminase Is Acyl-Acceptor Dependent, *J Agric Food Chem.* **65**, 7542–7552 (2017).
227. **Berti C, Roncoroni L, Falini M L, Caramanico R, Dolfini E et al.**, Celiac-related properties of chemically and enzymatically modified gluten proteins, *J Agric Food Chem.* **55**, 2482–2488 (2007).
228. **Dekking EHA, van Veelen P A, Ru A de, Kooy-Winkelaar EMC, Gröneveld T et al.**, Microbial transglutaminases generate T cell stimulatory epitopes involved in celiac disease, *J Cereal Sci.* **47**, 339–346 (2008).
229. **Matthias T, Jeremias P, Neidhofer S, Lerner A**, The industrial food additive, microbial transglutaminase, mimics tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients, *Autoimmun Rev.* **15**, 1111–1119 (2016).
230. **Lerner A, Jeremias P, Neidhofer S, Matthias T**, Antibodies against neo-epitope tTg complexed to gliadin are different and more reliable than anti-tTg for the diagnosis of pediatric celiac disease, *J Immunol Methods.* **429**, 15–20 (2016).
231. **Lerner A, Matthias T, Aminov R**, Potential Effects of Horizontal Gene Exchange in the Human Gut, *Front Immunol.* **8**, 1630 (2017).

Intrazelluläre Lokalisation der mikrobiellen Transglutaminase und ihr Einfluss auf den Transport von Gliadin innerhalb des menschlichen Duodenalepithels



### 7.3 Veröffentlichungen

Kongressvortrag: 50. ESPGHAN-Kongress in Prag 10.-13.05.2017, Highest Scoring Abstracts Session

Postervortrag: 1. Science Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, 10.11.2017  
51. ESPGHAN-Kongress in Genf 09.-12.05.2018, E-Poster Präsentation  
11. Autoimmunity Kongress in Lissabon 16.-20.05.2018, Poster Präsentation

Publikation: Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, Intracellular localization of microbial transglutaminase and its influence on the transport of gliadin in enterocytes. Manuscript in revision

### Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

---

Ort, Datum

Unterschrift

## 7.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer danke ich für das Überlassen dieses überaus interessanten Themas sowie die Beratung und das Wissen, das er mir während meiner Arbeit vermittelt hat

Herrn Dr. Jan de Laffolie möchte ich für die Auswahl der Patienten und die Bereitstellung der Biopsien danken sowie für die zahlreichen Ratschläge im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Frau Prof. Dr. Silvia Rudloff danke ich für ihre Hilfestellung und Anregungen zur Methodik der Arbeit sowie für viele sehr interessante Diskussionen über mein Forschungsthema und darüber hinaus.

Allen Mitarbeitern des Labors möchte ich für die nette Aufnahme in das Team und die Hilfestellung bei meiner Arbeit danken. Bei Larissa Thiessen und Nadine Böcher bedanke ich mich für die methodische Einarbeitung, die praktische Unterstützung und eine sehr kollegiale Atmosphäre. Tanja Weidenhausen danke ich für die Unterstützung bei der Beantragung des Ethikvotums und für die Archivierung der Patientendaten.

Allen Betreuern danke ich für das geduldige Korrekturlesen sämtlicher Abstracts, Manuskripte und letztlich meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch mein Studium begleitet und mich auch in den schwierigen Zeiten meiner Promotion unterstützt haben.

## **7.5 Lebenslauf**

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6773-1



9 783835 196773 1