

**Lokalisierung von Gliadin und dem nichtklassischen
MHC-Klasse-1-Molekül CD1d in Enterozyten von
Zöliakiepatienten**

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

**vorgelegt von Guido Kliemann
aus Bensberg**

Gießen, 2009

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie
Leiter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer**

Gutachter: Prof. Dr. K.-P. Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. P. Hardt

Tag der Disputation: 18.12.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zöliakie	1
1.2	Transport exogener Antigene in antigenpräsentierenden Zellen ...	7
1.3	Enterozyten als antigenpräsentierende Zellen.....	10
1.4	Orale Toleranz	13
1.5	Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Untersuchtes Material	15
2.2	Antikörper	15
2.3	Konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie.....	17
2.4	Kryo-Immunelektronenmikroskopie.....	20
2.5	Quantifizierung der Immunelektronenmikroskopie.....	23
3	Ergebnisse	26
3.1	Lokalisierung von Gliadin und CD1d mit der Konfokalen Laser- Immunfluoreszenzmikroskopie	26
3.2	Lokalisierung von CD1d in der Elektronenmikroskopie.....	33
3.3	Lokalisierung von Gliadin mit der Elektronenmikroskopie.....	46
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
4	Diskussion	53
4.1	Verteilung von CD1d in Enterozyten.....	53
4.2	Lokalisierung von Gliadin in Enterozyten.....	56
4.3	Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern von RACE- Enterozyten bei Zöliakiepatienten.....	59
4.4	Perspektiven	62
5	Literaturverzeichnis	63
6	Zusammenfassung.....	68
7	Summary	69
	Erklärung	70
	Danksagung.....	71

1 Einleitung

1.1 Zöliakie

Die Zöliakie ist eine immunologische Erkrankung des Dünndarms, die ausschließlich bei genetisch dafür prädisponierten Menschen auftritt. Bei den Patienten kommt es zu typischen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut nach Aufnahme des Getreidebestandteils Gluten. Das Gluten wurde erst in den 1950er Jahren durch den niederländischen Kinderarzt H. W. Dicke als der auslösende Faktor erkannt, obwohl das klinische Bild der Erkrankung schon viele Jahre vorher durch den britischen Arzt Samuel Gee beschrieben wurde. Wann die Erkrankung nach der Exposition beginnt, ist sehr variabel. Dies kann nach wenigen Monaten oder vielen Jahren der Nahrungszufuhr von Getreideprodukten der Fall sein. Bei dem überwiegenden Teil (96-98%) der genetisch prädisponierten Individuen bricht die Erkrankung nie aus. Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, ob es zu der Entwicklung einer oralen Toleranz oder zum Ausbruch der Erkrankung mit den typischen Symptomen kommt, ist auch nach intensiver Forschung noch nicht vollständig aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit soll durch die Lokalisierung von Gliadin in Duodenalbiopsien von (gesunden und kranken) Kontroll- und Zöliakiepatienten mit immunologischen Methoden ein wichtiger Schritt zur Entstehung der Erkrankung untersucht werden.

1.1.1 Epidemiologie

Insgesamt kann von einer Prävalenz der Zöliakie um 1% weltweit ausgegangen werden (Catassi et al., 2008). Finnische Daten aus dem Jahr 2007 zeigten einen Anstieg der Prävalenz von 1% in den Jahren 1978-1980 auf 2% in den Jahren 2000-2001 (Lohi et al 2007). Die Häufigkeit der genetischen Prädisposition ist um ein vielfaches höher – bis zu 25%.

Die genetische Disposition, die der Zöliakie zugrunde liegt, beruht auf den HLA-Klasse-II-Antigenen HLA-DQ2 und HLA-DQ8. (genotypisch HLA-DQ β 1*0201/ α 1*0501 und HLA-DQ β 1*0302/ α 1*0301)(Koning 2003). Es zeigt sich eine deutliche Konkordanz zwischen eineiigen Zwillingen, bei denen die Erkrankung mit einer Konkordanzrate von 75% auftritt. Erstgradige Verwandte von Patienten mit einer Zöliakie sind zu ca. 10% ebenfalls erkrankt.

1.1.2 Pathophysiologie

Die Entzündung der Dünndarmschleimhaut bei der Zöliakie führt zu einer Zottenatrophie der Mukosa, die durch die nachfolgende Malabsorption von Nährstoffen für die Symptome der Erkrankung verantwortlich ist. Die Entzündung wird durch Prolamine verschiedener Getreidesorten ausgelöst und weiter unterhalten. Diese Prolamine sind alkohollösliche Proteinbestandteile der Getreide Weizen, Gerste, Roggen und Hafer. Werden sie der Nahrung wieder entzogen, sind die Schleimhautveränderungen wieder vollständig reversibel. Das Autoantigen der Zöliakie ist die Gewebstransglutaminase, das Antigen des Endomysium-Antikörpers. Durch Deamidierung von Glutamin und Überführung zu Glutaminsäure - vermittelt von der Gewebstransglutaminase - wird die Bindung des Gliadinpeptids an HLA-DQ2 verstärkt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer charakteristischen Immunreaktion. Im Serum können spezifische Antikörper der Klassen IgG und IgA nachgewiesen werden. Es bildet sich ein zelluläres Infiltrat in der Dünndarmmukosa, bestehend aus Lymphozyten (vor allem TH1- und zytotoxische Lymphozyten). Der Mechanismus, der nach Gluten-Kontakt eines Individuums festlegt, ob sich eine orale Toleranz oder eine Zöliakie entwickelt, ist noch nicht ausreichend untersucht. Hier spielen vermutlich der intrazelluläre Transport des Glutens und die Art und der Ort der Präsentation gegenüber dem Immunsystem eine entscheidende Rolle. Dieser Zusammenhang soll in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden.

1.1.3 Klinik

Der Zeitpunkt des Auftretens von Symptomen der Zöliakie ist sehr variabel und kann bereits wenige Monate nach Einführung glutenhaltiger Nahrungsmittel oder im weiteren Leben bis ins hohe Lebensalter liegen. Es gibt mehrere verschiedene Formen der Zöliakie, die sich wesentlich unterscheiden (Holtmeier, Henker et al. 2005): Bei der **klassischen Zöliakie** handelt es sich um das Vollbild der Erkrankung mit Durchfällen, Bauchschmerzen, Anämie, bei Kindern Gedeihstörung, somatische und psychomotorische Entwicklungsverzögerung. Bei der silenten Zöliakie, einer Form der **nichtklassischen Zöliakien**, treten keine, bei den monosymptomatischen Zöliakien nur wenige sehr unspezifische Symptome, wie Bauchschmerzen, geblähtes Abdomen oder eine isolierte Eisenmangelanämie auf. Nicht selten lässt sich der Beginn dieser unspezifischen Symptome aber retrospektiv mit der ersten Zufütterung von glutenhaltigen Nahrungsmitteln in Verbindung bringen. Verschiedene Erkrankungen treten in bis zu 10% der Fälle assoziiert mit einer Zöliakie auf: selektiver IgA-Mangel, Typ-I-Diabetes, Turner-Syndrom, Down-Syndrom.

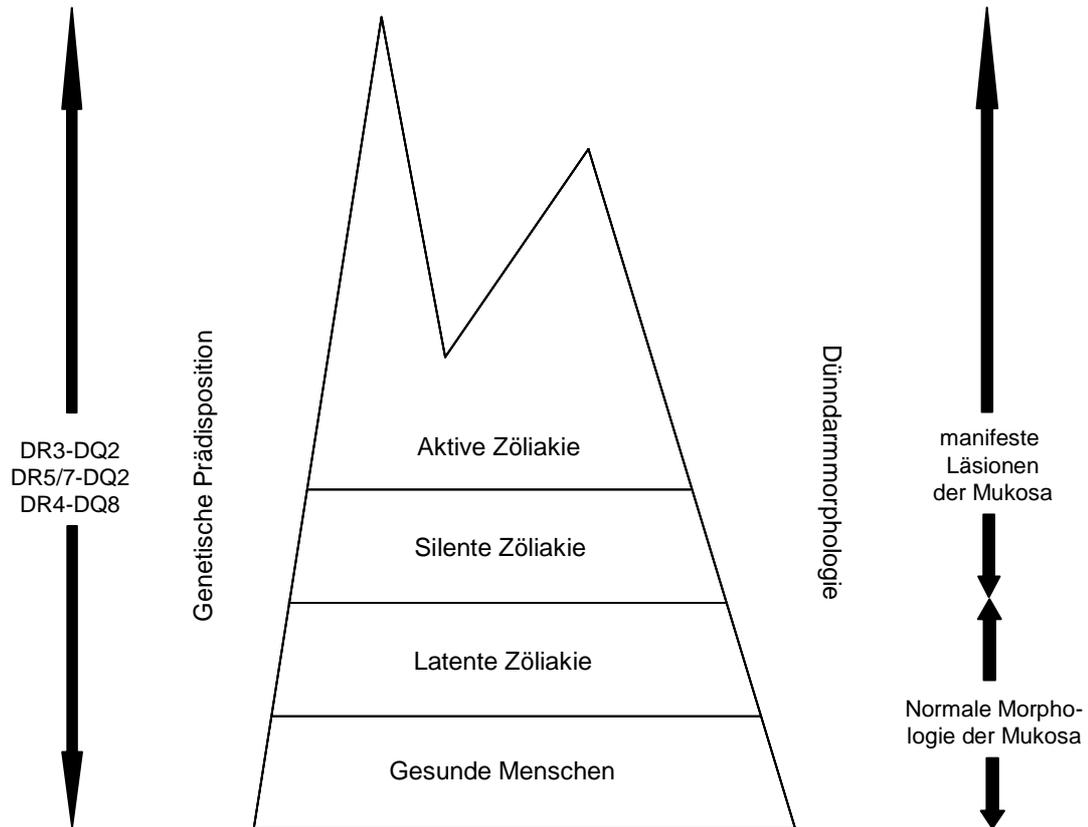


Abb. 1.1: Klinische Manifestation bei Kindern: das Phänomen des Eisbergs. Durch Screenings hat sich herausgestellt, dass die Zöliakie wesentlich häufiger auftritt als angenommen. Die klassische Form der Zöliakie bildet lediglich die Spitze des Eisbergs, während Patienten mit zum Teil wenigen Symptomen oder ohne Beschwerden die breite Basis bilden. Allen Patienten gemeinsam ist die HLA-DQ2/ -DQ8 Prädisposition. Modifiziert nach (Keller 2003)

1.1.4 Diagnostik

Für die Diagnosestellung der Zöliakie haben die von der ESPGHAN aufgestellten Kriterien (ESPGHAN 1990) weiterhin Gültigkeit. Im Einzelnen stützt sich die Diagnose hierbei auf die klinische Untersuchung, den serologischen Befund, die Histologie der Dünndarmschleimhaut und auf die Normalisierung von Beschwerden und Serologie unter glutenfreier Diät. Die serologische Diagnostik der Zöliakie ist aufgrund sehr unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Antikörper-Tests nicht immer einfach. Der Gliadin-IgG-Antikörper ist zwar sehr sensitiv, aber unspezifisch. Gliadin-IgA-Antikörper und vor allem Endomysium-IgA-

Antikörper sind deutlich spezifischer. Aufgrund des häufig gleichzeitig bestehenden IgA-Mangels sind diese Antikörper jedoch anfällig für falsch-negative Befunde. In jüngster Vergangenheit ist eine neue Klasse von Antikörpern gegen deamidierte Gliadinpeptide Bestandteil der Diagnostik geworden. Diese Antikörper weisen eine höhere Sensitivität und Spezifität als die herkömmlichen Gliadin-Antikörper auf, sind als IgG-Antikörper unabhängig vom Gesamt-IgA-Spiegel des Patienten und sind gegen Peptidsequenzen gerichtet, die T-Lymphozyten stimulieren können. (Mothes 2007; Tonutti, Visentini et al. 2009) Die Biopsien aus der Dünndarmschleimhaut werden in der Regel im Rahmen einer Ösophago-Gastro-Duodenoskopie entnommen und hinsichtlich der Kriterien Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und intraepithelialer Lymphozytengehalt beurteilt (Marsh 2000). Tabelle 1.1 zeigt die Einteilung des histologischen Befundes nach der Marsh-Klassifikation.

Tabelle 1.1
Marsh-Klassifikation der histologischen Veränderung der Dünndarmschleimhaut bei Zöliakie

MARSH	Intraepithelialer Lymphozytengehalt / 100 Enterozyten	Morphologie
0	< 20	Krypten normal, Zotten normal
1	> 30	Krypten normal, Zotten normal
2	> 30	Krypten hyperplastisch, Zotten normal
3	> 30	Krypten hyperplastisch, Zotten verkürzt

1.1.5 Differentialdiagnostik

Die Differenzialdiagnose der Zöliakie umfasst Nahrungsmittelallergien, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, infektiöse Enteritiden, Autoimmunerteropathie, Immundefekte, intractable Diarrhoen, Proteinmalnutrition, das Colon irritabile und die transiente Zöliakie. Bei der zuletzt genannten „Zöliakie“-Form werden allergische oder infektiöse Ursachen diskutiert. Betroffen sind Kinder vor dem 2. Lebensjahr, bei denen aufgrund der Klinik, der Serologie und der Histologie die Diagnose eindeutig gestellt werden kann. Unter glutenfreier Diät normalisieren sich alle Befunde, im Gegensatz zu der Zöliakie im engeren Sinne kommt es aber nicht zu erneuten Beschwerden, wenn später wieder Gluten in die Nahrung eingeführt wird. Die Patienten sind häufig HLA-DQ2/DQ8 negativ. Um das Vorliegen einer transienten Zöliakie auszuschließen, wird bei Patienten, bei denen die Diagnose Zöliakie vor dem 2. Lebensjahr gestellt wurde, eine Glutenbelastung empfohlen.

1.1.6 Therapie

Die Therapie der Zöliakie besteht in einer lebenslangen glutenfreien Diät. Dies bedeutet den strikten Verzicht auf Lebensmittel, die Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Wildreis und Grünkern enthalten. Durch eine verbesserte Kennzeichnung der Lebensmittel und umfangreiches Informationsmaterial, das Patienten unter anderem von der Deutschen Zöliakiegesellschaft, einer Selbsthilfeorganisation, zur Verfügung gestellt wird, ist die Einhaltung der glutenfreien Diät in den letzten Jahren einfacher geworden. Auch werden glutenfreie Lebensmittel zunehmend im normalen Einzelhandel vertrieben, die Patienten sind nicht mehr ausschließlich auf einige wenige Versandhändler angewiesen.

1.1.7 Prognose

Bei strikter Einhaltung der glutenfreien Diät ist die Prognose der Zöliakie sehr gut. Die Symptome sind häufig schon nach wenigen Wochen deutlich rückläufig, auch die Schleimhautveränderungen bilden sich

unter der Diät vollständig zurück. Extraintestinale Manifestationen der Zöliakie, wie z. B. die bei Kindern sehr seltene Dermatitis herpetiformis Duhring sprechen ebenfalls schnell auf eine glutenfreie Diät an.

Ist die Ernährung nicht glutenfrei, oder liegt eine refraktäre Zöliakie vor, eine seltene Form der Erkrankung bei erwachsenen Patienten, bei denen auch unter glutenfreier Diät die histologischen und klinischen Zeichen einer Zöliakie weiterbestehen, steigt das Risiko für Spätkomplikationen wie Infertilität, Osteoporose oder intestinale Malignome, insbesondere Enteropathie-assoziierte Lymphome.

1.2 Transport exogener Antigene in antigenpräsentierenden Zellen

Es gibt verschiedene Wege für Moleküle aus dem Darmlumen in den Enterozyten zu gelangen. Eine wesentliche Unterscheidung für die Art des Transportes ist die Größe des Moleküls. Ionen, einfache Zucker und Aminosäuren passieren die Zellmembran über Transportermoleküle oder Kanäle. Größere Moleküle müssen aktiv durch den Enterozyten endozytiert werden.

Das endozytierte Material wird zunächst in das **frühe Endosom** (EE, early endosome) aufgenommen. Hierbei handelt es sich um einen Teil des endosomalen Kompartiments, der über die weitere Bestimmung des endozytierten Materials entscheidet und wichtige Sortierfunktionen übernimmt. Die verschiedenen Bestandteile des endosomalen Kompartiments stehen über vesikulären Transport untereinander, aber auch mit dem Golgi-Apparat und der Zelloberfläche in Verbindung. Hierdurch können auch membrangebundene Antikörper und Lipide, die als Bestandteile der Zellmembran mit endozytiert wurden, zur Zelloberfläche zurücktransportiert und wiederverwendet werden. In polarisierten Zellen ist auch der Weg der Transzytose möglich, wie z. B. die Sekretion von IgA in das Darmlumen oder die Aufnahme von mütterlichen IgG-Antikörpern in den Blutkreislauf durch Neugeborene

(Mukherjee, Ghosh et al. 1997), aber auch die Aufnahme von Gliadin aus dem Darmlumen über die apikale Membran und anschließendem endozytischen Transport zur basolateralen Membran von Enterozyten (Zimmer et al. 2009).

Im **späten Endosom** (LE, late endosome) wird endozytiertes Material vom EE oder aus dem Golgi-Apparat zum Lysosom transportiert. Exogene Antigene werden in späten Endosomen an HLA-Antigene der Klasse II gebunden (Braciale and Braciale 1991). Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Gliadin in späten Endosomen in Enterozyten von Zöliakiepatienten nachweisbar war, die positiv für HLA-Klasse-II-Moleküle waren (Zimmer, Poremba et al. 1995) Diese Ergebnisse wurden als Hinweise auf die wichtige Rolle der Enterozyten bei dem Transport des Gliadins zu einer HLA-DR-positiven Umgebung gewertet, die eine Voraussetzung für eine Antigenpräsentierung gegenüber T-Lymphozyten darstellt. In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der α/β - und der γ/δ -T-Zell-Rezeptor und CD8 mit Gliadin in Vakuolen und im Golgi-Komplex von Enterozyten von Zöliakiepatienten kolokalisieren. Diese Ergebnisse wiesen ebenfalls auf eine Antigenpräsentierung in Anwesenheit von HLA-Klasse-I-Molekülen hin.

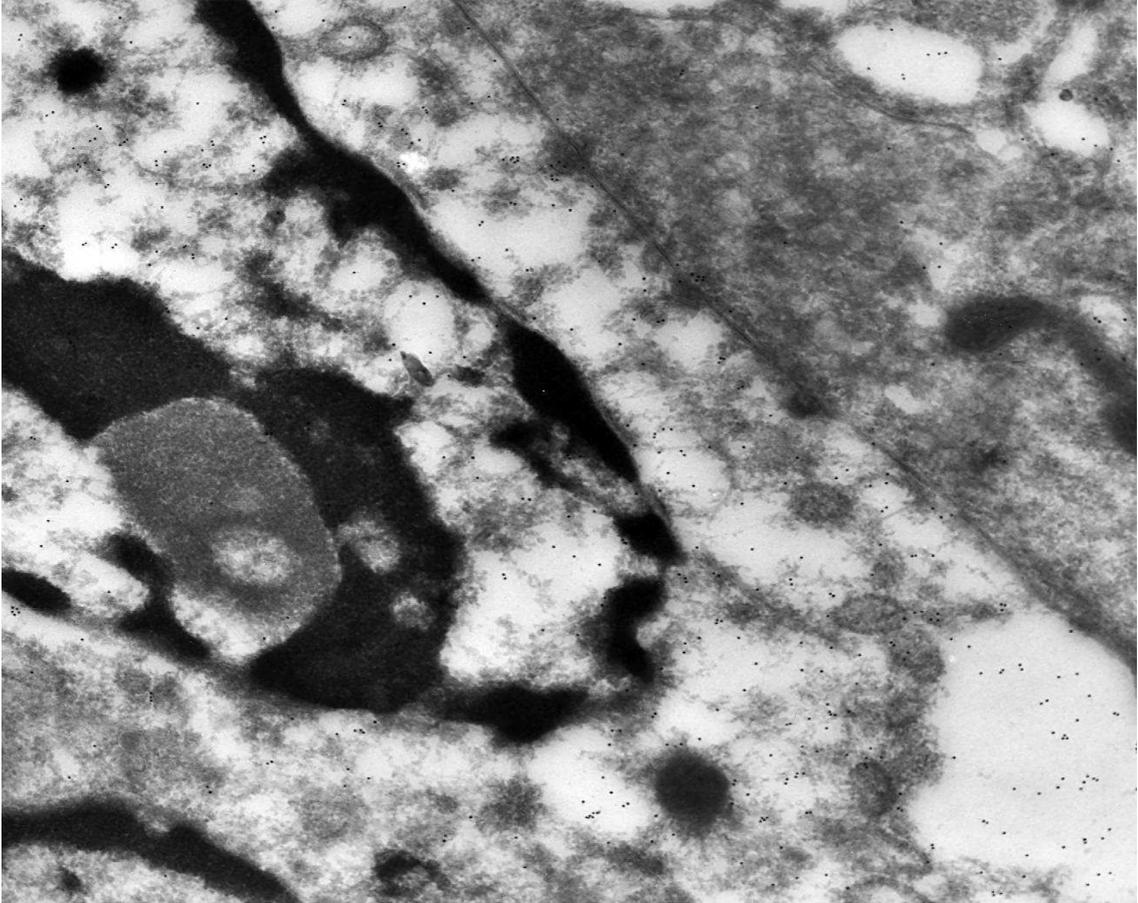
Im **Lysosom**, dem letzten Abschnitt im endosomalen Kompartiment, herrscht ein sehr niedriger pH-Wert, der zum Abbau endozytierten Materials erforderlich ist. In späten Endosomen und Lysosomen können LAMP (Lysosomen-assoziierte Membranproteine) und LAP (saure Phosphatase) nachgewiesen werden.

Eine andere Population von Enterozyten, in denen bei Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa der Transport luminaler Antigene in endozytotische Kompartimente und später in das Zytosol erfolgt, wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits vor einigen Jahren beschrieben (Schurmann, Bruwer et al. 1999; Kersting, Bruwer et al. 2004). In den durchgeführten Untersuchungen waren Ovalbumin und Meerrettichperoxidase beschleunigt in späte Endosomen und Trans-

Golgi-Vesikel der sogenannten RACE-Zellen (**R**apid **U**ptake of **A**ntigens into the **C**ytosol of **E**nterocytes) aufgenommen worden. Weiterhin fielen diese RACE-Enterozyten durch eine niedrigere Markierungsdichte für Saccharase-Isomaltase, Villin und Aktin auf. Niedrige Markierungsdichten für den Apoptose-Marker Caspase-3 weisen darauf hin, dass es sich bei den RACE-Enterozyten nicht um apoptotische Zellen handelt. Die physiologische Funktion dieser Zellen oder ihre Bedeutung für das Immunsystem ist bislang noch nicht geklärt.

Jedoch gibt es Hinweise für eine „Kreuzpräsentierung“ von exogenen Antigenen in RACE Zellen. Durch die verschiedenen Untereinheiten des Proteasoms erfolgt ein Abbau zytosolischer Proteine oder Peptide, aber auch von exogenen Antigenen bis auf kurze Sequenzen von 7-9 Aminosäuren.

In Abb. 1.2 ist der Transporter dieser durch das Proteasom degradierten Peptide in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (TAP) sowohl im Zellkern als auch auf dem Zytoplasma eines Enterozyten in der Dünndarmbiopsie einer Maus erkennbar.

**Abbildung 1.2****Vergrößerungsfaktor 1:35400****Immunoelektronenmikroskopie einer Dünndarmbiopsie beschichtet mit einem Antikörper gegen das Protein TAP**

Das Protein TAP schleust die vom Proteasom degradierten Peptide ins endoplasmatische Retikulum. In der dargestellten RACE Zelle ist TAP auch im Zellkern nachweisbar. Im benachbarten Enterozyten ist TAP nur im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die 12 nm großen Gold-Partikel zeigen die Bindungsstellen des primären Antikörpers an.

1.3 Enterozyten als antigenpräsentierende Zellen

Die **exogene** Antigenpräsentierung beginnt in Enterozyten mit der Antigenprozessierung im endozytotischen Pfadweg und im Weiteren erfolgt, gebunden an HLA-Moleküle der Klasse II, eine Antigenpräsentation gegenüber dem T-Zell-Rezeptor spezifischer T-Lymphozyten (Telega, Baumgart et al. 2000). Auf dem exogenen Weg werden im normalen Enterozyten exogene Antigene nach Endozytose

und Antigenprozessierung über das späte Endosom zusammen mit HLA-Klasse-II-Molekülen gegenüber CD4-positiven Lymphozyten präsentiert. (Braciale and Braciale 1991). Dieser Weg führt zur Antikörperproduktion, ist aber auch die Voraussetzung für die Entwicklung einer oralen Toleranz (Zimmer, Buning et al. 2000). Aktuelle Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Gliadin und synthetische Gliadinpeptide in Enterozyten aus Duodenalbiopsien und Zellen aus den Zellkulturlinien HT29 und T84 aufgenommen werden. Dabei erreichte das toxische Peptid 31-49 nicht die HLA-Klasse-II-positiven späten Endosomen, was die Entwicklung einer oralen Toleranz verhindert. Es gelang durch eine Konjugation an Cholera-Toxin B das Peptid 31-49 in späte Endosomen „umzuleiten“, was möglicherweise einen Toleranz-induzierenden Effekt hat. (Zimmer 2008)

Auf dem **endogenen** Weg werden Antigene, die bereits intrazellulär vorliegen, wie z. B. bei einer Antigen synthese in der Zelle bei einer Virusinfektion, nachdem sie im endoplasmatischen Retikulum an HLA-Klasse-I-Moleküle gekoppelt und über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert wurden, gegenüber CD-8-positiven Lymphozyten präsentiert. Dabei erfolgt der Transport des Antigens unter Beteiligung des Proteins TAP in das endoplasmatische Retikulum. In Untersuchungen von Mazarella et al konnte gezeigt werden, dass bestimmte Gliadinpeptide durch eine Interaktion mit HLA-Klasse-I-Molekülen und dem T-Zellrezeptor bei Zöliakiepatienten eine zytotoxische Antwort und nachfolgend Apoptose von Enterozyten induzieren können. (Mazzarella, Stefanile et al. 2008)

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die strenge Trennung der beiden oben beschriebenen Wege nicht aufrechterhalten werden kann, und es viele Beispiele für eine Präsentation exogener Antigene durch HLA-Klasse-I-Moleküle gibt (Jondal, Schirmbeck et al. 1996) Auch in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gab es Hinweise für eine **Kreuz-Präsentierung** exogener Antigene. (Zimmer, Naim et al. 1998; Biagi,

Zimmer et al. 1999) Es existieren verschiedene Modelle für den Mechanismus der Kreuz-Präsentierung. Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der Antigenpräsentierung.

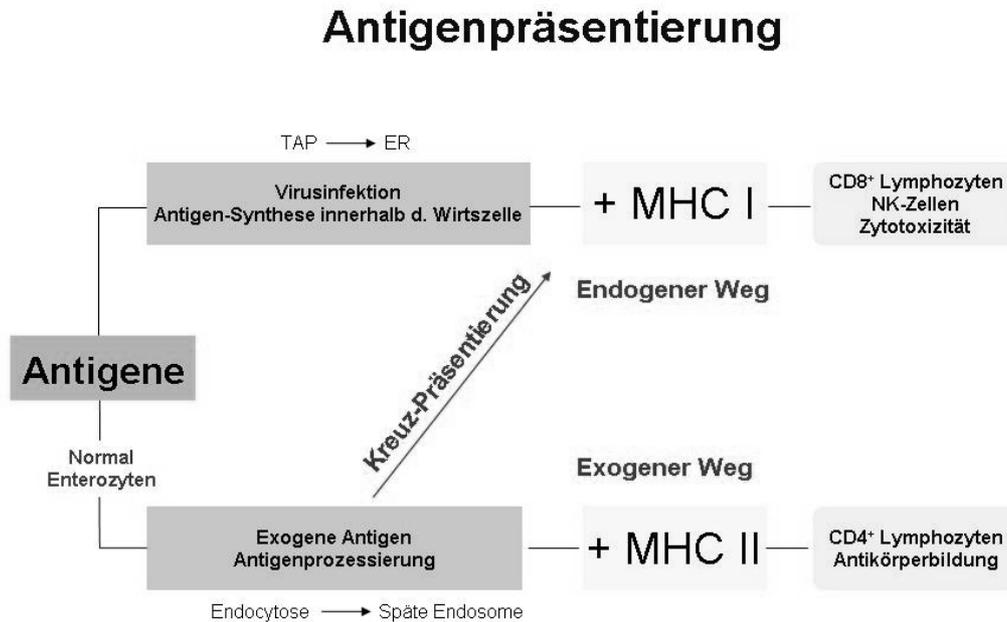


Abbildung 1.3

Schematische Darstellung der Wege der Antigenpräsentierung

In Enterozyten kommt es durch verschiedene nichtklassische HLA-Klasse-I-Moleküle wie CD1d, MICA und MICB zu sehr unterschiedlichen Modulationen der Immunreaktion. So konnten in den letzten Jahren einige CD1d-restringierte Pfade der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Enterozyten gezeigt werden (Blumberg, Gerdes et al. 1995; Kaser, Nieuwenhuis et al. 2004)

In einer Arbeit aus der Arbeitsgruppe von Mayer aus New York wurde nachgewiesen, dass sich bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen die Expression der nichtklassischen HLA-Klasse-I-Moleküle MICA und CD1d in intestinalen Epithelien deutlich von Gesunden unterscheidet. So ist bei der Colitis ulcerosa die Expression beider Moleküle vermindert und bei M. Crohn die Expression von CD1d.

Die Autoren folgern, dass das Fehlen der durch nichtklassische HLA-Klasse-I-Moleküle restringierten T-Zellen aufgrund der hohen Antigen-Last im Darm eine Rolle in der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen spielt. (Perera, Shao et al. 2007)

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Hue aus Paris konnten eine direkte Interaktion des nichtklassischen HLA-Klasse-I-Molekül MICA und dem NK2GD-Rezeptor auf NK-Zellen nachweisen. Diese Interaktion wird durch das toxische Gliadin-Peptid 31-49 ausgelöst und führt zu der Zottenatrophie bei der Zöliakie. (Hue, Mention et al. 2004)

1.4 Orale Toleranz

Als orale Toleranz wird die Entwicklung einer antigenspezifischen immunologischen Toleranz im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Notwendigkeit für das Immunsystem, da ständig eine sehr hohe Konzentration verschiedenster Antigene Kontakt zur Darmschleimhaut hat. Der entscheidende Punkt ist hier die Unterscheidung zwischen pathogenen und für den Organismus nicht pathogenen Antigenen (z.B. Nahrungsmittel).

Bisher sind die Mechanismen der oralen Toleranzentwicklung noch nicht vollständig geklärt, sicher ist jedoch, dass bei diesem T-Zell-vermittelten Vorgang sowohl die humorale, als auch die zelluläre Abwehr antigenspezifisch gehemmt wird. Für die bekannten Mechanismen der Toleranzentwicklung ist eine Antigenprozessierung und -präsentation in klassischen Antigenpräsentierenden Zellen, aber auch in Enterozyten die Voraussetzung. Wie bereits oben beschrieben, konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass es für die Induktion einer oralen Toleranz erforderlich ist, dass das Antigen in HLA-Klasse-II-positiven späten Endosomen vorliegt. (Zimmer, Buning et al. 2000)

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll mit immunologischen Methoden die Lokalisierung von Gliadin und des nichtklassischen HLA-Klasse-I-Moleküls

CD1d in Enterozyten aus Duodenalbiopsien von Gesunden, kranken Kontrollen und Zöliakie-Patienten untersucht werden. Besonders sollen hierbei die Lokalisierung beider Moleküle auf verschiedenen Zellorganellen von normalen und RACE-Enterozyten untersucht werden, sowie mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen identifiziert werden.

Hintergrund ist die Frage, welche Rolle das nichtklassische HLA-Klasse-I-Molekül CD1d dabei spielt, wie Antigene durch Kreuzpräsentierung von dem Toleranz induzierenden exogenen Weg der Antigenpräsentierung zur Induktion einer zytotoxischen Immunreaktion im endogenen Weg gelangen.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Material

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden Duodenalbiopsien von drei unterschiedlichen Gruppen eingesetzt:

2.1.1 Zöliakiepatienten

Zöliakie vor Beginn der glutenfreien Diät, die Diagnosestellung erfolgte nach den ESPGHAN-Kriterien: Typische Symptome, positive Serologie, typische histologische Veränderungen der Duodenalmukosa und Besserung der Symptome nach Beginn der glutenfreien Diät.(ESPGHAN 1990) Aus dieser Gruppe wurden 16 Patienten untersucht.

2.1.2 Kranke Kontrollen

2 Patienten mit M. Crohn, 2 Patienten mit einer Colitis ulcerosa. Die Diagnosestellung erfolgte in Übereinstimmung mit der gültigen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten und der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (Hoffmann, Zeitz et al. 2004; Hoffmann, Preiss et al. 2008)

2.1.3 Gesunde Kontrollen

4 Patienten, die aufgrund unterschiedlicher Verdachtsdiagnosen endoskopisch untersucht wurden und bei denen der makroskopische und der histologische Befund unauffällig waren.

2.2 Antikörper

2.2.1 Primäre Antikörper

- CD1d-Antikörper (Santa Cruz)
CD1d (Klon NOR3.2/13.17) (mouse)
Santa Cruz Biotechnology Inc.
69115 Heidelberg

- CD1d-Antikörper 27.1
Monoklonaler anti-CD1d-Antikörper (mouse)
freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S. A. Porcelli,
Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein
College of Medicine, Bronx, NY, USA
- Polyklonaler anti-Gliadin Antikörper (rabbit)
Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

2.2.2 Sekundäre Antikörper für konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie

- Alexa Fluor® 555 F(ab')₂ Fragment (goat-anti-rabbit),
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ Fragment (goat-anti-mouse),
Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.2.3 Sekundäre Antikörper für Elektronenmikroskopie

- 6 nm kolloidaler Gold goat-anti-rabbit Antikörper
Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA
- 12 nm kolloidaler Gold goat-anti-mouse Antikörper
Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

2.3 Konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie

2.3.1 Versuchsdurchführung für Immunfluoreszenz-Versuche

Lösungen und Materialien:

- Waschpuffer:
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), enthält:
 - 0,8% NaCl
 - 0,2% KCl
 - 8mM Na₂HPO₄
 - 1,5mM K₂HPO₄
- Permeabilisierung:
0,5% Triton (Triton-X-100), Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
Vorverdünnung von 1:100 mit PBS in Falcon-Röhrchen erstellen,
dann nochmals 1:2 verdünnen.
- Blockpuffer für CD1d 27.1:
CWFS-Gelatine (=Cold Water Fish Skin Gelatine):
Blocking Solution Fa. Aurion Niederlande (Code Nr.: 905.002),
enthält:
 - 5% BSA (=Bovines Serumalbumin)
 - 0,1 % CWFS-Gelatine
 - 5–10% Normal Serum aus Ziege
(Serum aus gleicher Spezies wie der sekundäre Antikörper)
 - 15 mM NaN₃
- Blockpuffer für CD1d Santa Cruz:
Goat-Serum (10 % in PBS)

- Puffer für primären Antikörper :
100 µl Triton-Vorverdünnung 1:100 (=> 0,1% Triton)
900 µl PBS
10 µl Goat-Serum (=> 1% Goat-Serum)
(Serum der Spezies, aus der der sek. AK stammt)
- Ansatz der primären Antikörper:
α-Gliadin 1:300
CD1d St. Cruz 1:50
CD1d 27.1 1:400
(primäre Antikörper ansetzen, mischen und 30 sec. zentrifugieren.)
- Ansatz der sekundären Antikörper:
Alexa 555 rot 1:200 in PBS
Alexa 488 grün 1:200 in PBS
- Farbstoff für Kernfärbung:
Hoechst 33342, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Verdünnung 1:1000 in PBS
- Eindeckmedium:
Prolong Gold, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Die Schnitte wurden mit einem Ultrakryomikrotom (Leica EM UC 6, Leica Microsystems, Wetzlar) in einer Kryokammer (Leica EM FC 6, Leica Microsystems, Wetzlar) angefertigt. Die Temperatur des Blocks lag bei -80°C, die Temperatur des Messers -80°C. Die Schnittdicke betrug 400 nm. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Plus Objektträger (R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik) aufgenommen und in einer Glasküvette mit PBS bis zur Versuchsdurchführung gelagert.

2.3.2 Immunfluoreszenz-Versuch

1.Tag:

- 1.) 1x 5 min. Waschen in PBS (schüttelnd in der Glasküvette).
- 2.) Schnitte gut abtropfen und einkreisen mit PEN-Stift.
- 3.) 10 min. Permeabilisieren mit 0,5% Triton bei Raumtemperatur in feuchter Kammer.
- 4.) Flüssigkeit abkippen, gut abklopfen bzw. abschütteln.
- 5.) 10 min. Blocken (mit CWFS-Gelatine bzw. 10%igem Goat-Serum).
- 6.) Flüssigkeit abkippen, gut abklopfen bzw. abschütteln.
- 7.) Primären Antikörper über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubieren.

2.Tag:

- 1.) 3x 5 min. Waschen in PBS (schüttelnd in der Glasküvette) vorher 1x kurz.
- 2.) Schnitte gut abtropfen und abklopfen.
- 3.) Sekundären Antikörper 1 h bei RT im Dunkeln inkubieren in feuchter Kammer.
- 4.) 3x 5 min. Waschen in PBS im Dunkeln (schüttelnd in der Glasküvette) vorher 1x kurz.
- 5.) 7 min. Hoechstfarbstoff 1:1000 bei Raumtemperatur im Dunkeln in feuchter Kammer inkubieren.
- 6.) 1x 5 min. Waschen in PBS (schüttelnd in der Glasküvette) vorher 1x kurz.
- 7.) 1x kurz Spülen in Aqua dest.
- 8.) Schnitte gut abtropfen, abklopfen und rundherum trocken wischen.
- 9.) Prolong Gold auf Schnitte geben und mit Deckglas abdecken.
- 10.) Deckglas mit klarem Nagellack befestigen.
- 11.) 1 h bei RT im Dunkeln trocknen lassen
- 12.) Schnitte lichtgeschützt aufbewahren.

2.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie wurde mit einem Nikon TE2000 / D-Eclipse-C1 durchgeführt und in 60- und 100-facher Vergrößerung untersucht. Die Untersuchung von Ausschnittvergrößerungen erfolgte mit 200-facher Vergrößerung.

Die Dokumentation erfolgte über die Software EZ-C1 (Nikon Europe BV, Amstelveen, NL).

2.4 Kryo-Immunelektronenmikroskopie

2.4.1 Versuchsdurchführung für Ultra-Cryo-Versuche:

Lösungen und Materialien:

- Waschpuffer:

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), enthält:

0,8% NaCl

0,2% KCl

8mM Na₂HPO₄

1,5mM K₂HPO₄

- Blockpuffer:

CWFS-Gelatine (=Cold Water Fish Skin Gelatine):

Blocking Solution Fa. Aurion Niederlande (Code Nr.: 905.002),

enthält:

5% BSA (=Bovines Serumalbumin)

0,1 % CWFS-Gelatine

5–10% Normal Serum aus Ziege (Serum aus gleicher Spezies wie der sekundäre Antikörper)

15 mM NaN₃

pH 7,4

- Kontrastierung:
Saures Uranylacetat (Merck):
4% Uranylacetat-Lösung in dH₂O herstellen und 3-4mal filtrieren.
- Methylcellulose (2%):
200ml dH₂O werden auf 95°C erhitzt und 4g Methylcellulose unter Rühren hinzugefügt, dann sofort auf Eis gegeben und 1 Tag auf Eis gerührt. Anschließend muss diese Lösung für weitere 3 Tage bei 4°C im Kühlraum gerührt werden und abschließend in der Ultrazentrifuge bei 300.000 x g 90 min bei 4°C zentrifugiert werden (Rotor: Beckman Ti 70).
- Netze (Grids): 100 mesh Nickel Forever/Carbon (50ct) Grids, Scienceservices, München

Die Schnitte wurden mit einem Ultrakryomikrotom (Leica EM UC 6, Leica Microsystems, Wetzlar) in einer Kryokammer (Leica EM FC 6, Leica Microsystems, Wetzlar) angefertigt. Die Temperatur des Blocks lag bei -110°C, die des Messers -100°C. Die Schnittdicke betrug 55 nm. Die Schnitte wurden mit einer Öse, benetzt mit 2,3 M Saccharose, aufgenommen und auf Netze aufgebracht. Die Netze wurden in einer Petrischale mit PBS schwimmend bis zur Versuchsdurchführung gelagert.

- Ansatz Primäre Antikörper:
CD1d 27.1 1:5 in CWFS-Gelatine
 α -Gliadin 1:30 in CWFS-Gelatine
- Ansatz Sekundäre Antikörper:
Goat- α -mouse 12nm 1:5 in CWFS-Gelatine
Goat- α -rabbit 6nm 1:50 in CWFS-Gelatine

2.4.2 Antikörperbeschichtung von ultradünnen Gefrierschnitten

- 1.) 15 Minuten Blocken in CWFS-Blocking-Solution.
- 2.) Inkubation des primären Antikörpers 45 min auf einem Tropfen (5 µl / Netz). Der Antikörper wird in CWFS-Blocking-Solution verdünnt.
- 3.) Die Netze werden für 15 min über 5 Tropfen in PBS-Puffer gewaschen.
- 4.) Inkubation des sekundären Antikörpers 45 min auf einem Tropfen (5 µl / Netz). Der Antikörper wird in CWFS-Blocking-Solution verdünnt.
- 5.) Die Netze werden für 30 min über 6 Tropfen in PBS-Puffer gewaschen.
- 6.) Die Netze werden für 5 min über 3 Tropfen in H₂O gewaschen.
- 7.) Die Kontrastierung der Netze erfolgt für 5 min über 3 Tropfen mit einer Lösung aus Uranylacetat und Methylcellulose (1:10) auf Eis.
- 8.) Die Netze mit einer Öse aufnehmen, dabei wird überschüssige Methylcellulose-Lösung mit der Öse auf Filterpapier abgestreift.
- 9.) Netze 30 min auf der Öse trocknen lassen.
- 10.) Netze ausloopen und in einer Petrischale oder Gridbox bis zum Mikrokopieren lagern.

2.4.3 Elektronenmikroskopie:

Die Auswertung der durchgeführten Versuche wurde mit einem Elektronenmikroskop EM 410 der Firma Philips (Eindhoven, Niederlande) durchgeführt. Die markierten Ultradünnschnitte wurden mit einer Vergrößerung von 14.000- bis 30.000-fach untersucht und es wurden zur Dokumentation Fotos auf Kodak Elektronenmikroskopiefilm IMAGE FILM SO-163 (Rochester, New York, USA) erstellt.

2.5 Quantifizierung der Immunelektronenmikroskopie

Die morphometrische Analyse der elektronenmikroskopischen Versuche erfolgte auf den Fotografien in 17.700facher Vergrößerung. Es wurden stereologische Methoden angewandt, die entwickelt wurden, um quantitative Informationen über subzelluläre mikroskopische Strukturen zu bekommen. Mit diesen Methoden ist es möglich, Länge, Oberfläche, Volumen und Markierungsdichte von Objekten auf den elektronenmikroskopischen Schnitten zu quantifizieren.

2.5.1 Punkt-Zähl-Methode

Die Punkt-Zähl-Methode wurde von Griffiths entwickelt. (Griffiths and Hoppeler 1986) Es handelt sich um eine einfach anwendbare Methode, um das Verhältnis von zwei unregelmäßig geformten Flächen auf elektronenmikroskopischen Bildern zu bestimmen. Auf das Bild wird ein transparentes Gitter mit definiertem Abstand der Gitterlinien gelegt. Nun werden die Kreuzungspunkte des Gitters innerhalb der zu ermittelnden Fläche und einer bekannten Referenzfläche ausgezählt. Das Verhältnis der ermittelten Anzahl der Kreuzungspunkte entspricht dem Verhältnis der verglichenen Flächen.

2.5.2 Markierungsdichte

Die Bestimmung der Markierungsdichte ermöglicht es, eine quantitative Auswertung der Dichte der Goldpartikel auf verschiedenen Zellkompartimenten durchzuführen.

Hierfür wird zunächst die angeschnittene Fläche des auszuwertenden Zellkompartiments mit der Punkt-Zähl-Methode ermittelt. Dann werden die Goldpartikel auf der angeschnittenen Fläche ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Vergrößerung und des Abstandes der Gitterlinien kann so die Markierungsdichte in Goldpartikeln / μm^2 ermittelt werden.

Die hierfür einzusetzende Formel lautet:

$$MD [GP / \mu m^2] = \frac{GP [GP] \times VG^2}{P \times d^2 [\mu m^2]}$$

MD = Markierungsdichte

GP = Anzahl der Goldpartikel

VG = Vergrößerungsfaktor

P = Anzahl der Kreuzungspunkte des Gitters

d = Abstand der Linien des Gitters

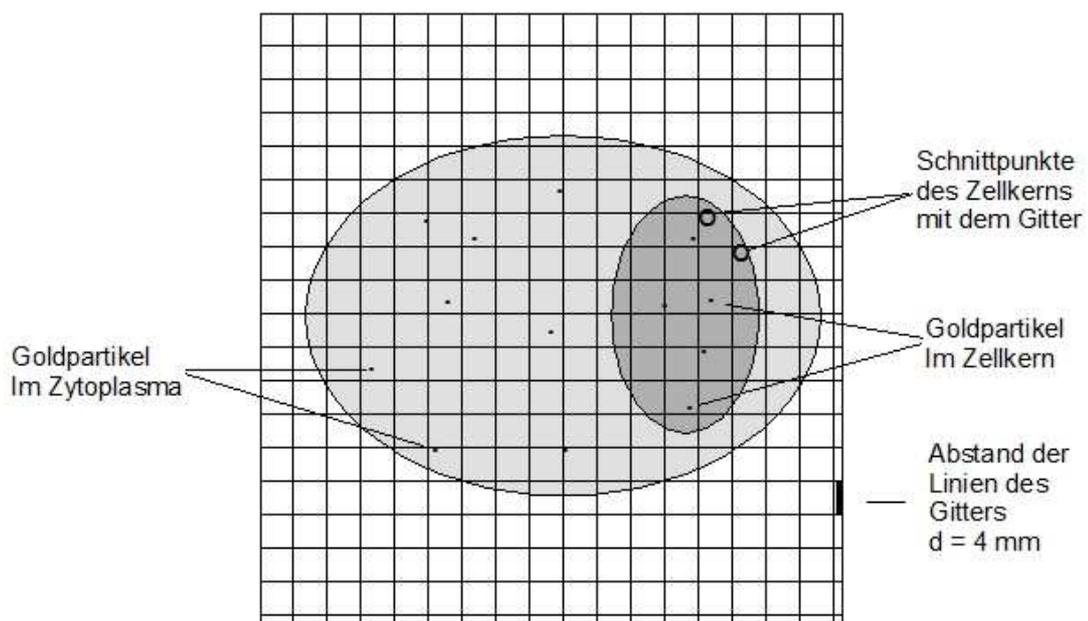


Abbildung 2.1

Punkt-Zähl-Methode n. Griffiths und Weibel

Punkt-Zähl-Methode, z. B.:

$$MD_{\text{Zytosol}} = \frac{GP [GP] \times VG^2}{P \times d^2 [\mu m^2]} = \frac{8 GP \times 17700^2}{101 \times 4000^2} = 0,96 GP / \mu m^2$$

$$MD_{\text{Zellkern}} = \frac{GP [GP] \times VG^2}{P \times d^2 [\mu m^2]} = \frac{5 GP \times 17700^2}{24 \times 4000^2} = 4,08 GP / \mu m^2$$

Es erfolgte eine getrennte quantitative Auswertung der Markierungsdichte der unterschiedlichen Zellkompartimente.

Ausgewertet wurden Zytoplasma, Zellkern, Golgi-Apparat, apikale Membran, basolaterale Membran der normalen Enterozyten und der RACE-Enterozyten. Zusätzlich wurde zur Bestimmung des unspezifischen Labelings („Hintergrund“) die Markierungsdichte auf Zellkernen mit angeschnittener Lymphozyten erfasst.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels beschreibender Statistik und student-t-Test.

Darüber hinaus wurde der Anteil der RACE-Enterozyten in den untersuchten Schnitten ermittelt und in RACE-Enterozyten / 100 normale Enterozyten angegeben.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden Proben von 24 Patienten untersucht. Dabei handelte es sich um 16 Patienten mit einer gemäß der ESPGHAN-Leitlinie gesicherten Zöliakie. 2 Patienten litten unter einem M. Crohn, 2 unter einer Colitis ulcerosa. Sie werden als kranke Kontrollpatienten geführt. 4 Patienten wurden bei unauffälliger Endoskopie und Histologie bei funktionellen Bauchschmerzen als gesunde Kontrollen aufgenommen.

3.1 Lokalisierung von Gliadin und CD1d mit der Konfokalen Laser-Immunfluoreszenzmikroskopie

In der konfokalen Laser-Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte eine Untersuchung der Lokalisation von CD1d (monoklonaler Antikörper von der Maus) und Gliadin (polyklonaler Antikörper vom Kaninchen, pG) in den untersuchten Proben auf immunhistologischer Ebene. Als sekundäre Antikörper dienten der rot fluoreszierende Alexa Fluor® 555 F(ab')₂ Fragment (goat-anti-rabbit) und der grün fluoreszierende Alexa Fluor® 488 F(ab')₂ Fragment (goat-anti-mouse). Die Zellkerne wurden mit einem blau fluoreszierenden Farbstoff (Höchstfarbstoff) angefärbt, der an Nukleinsäuren bindet.

Die verwendete Software Nikon EZ-C1 (Nikon Instruments Europe BV, Amstelveen, NL) bietet die Möglichkeit einer optischen Hervorhebung der Kolo-kalisierung auf 2 Farbkanälen.

3.1.1 CD1d und Gliadin in Duodenalbiopsien von Zöliakiepatienten

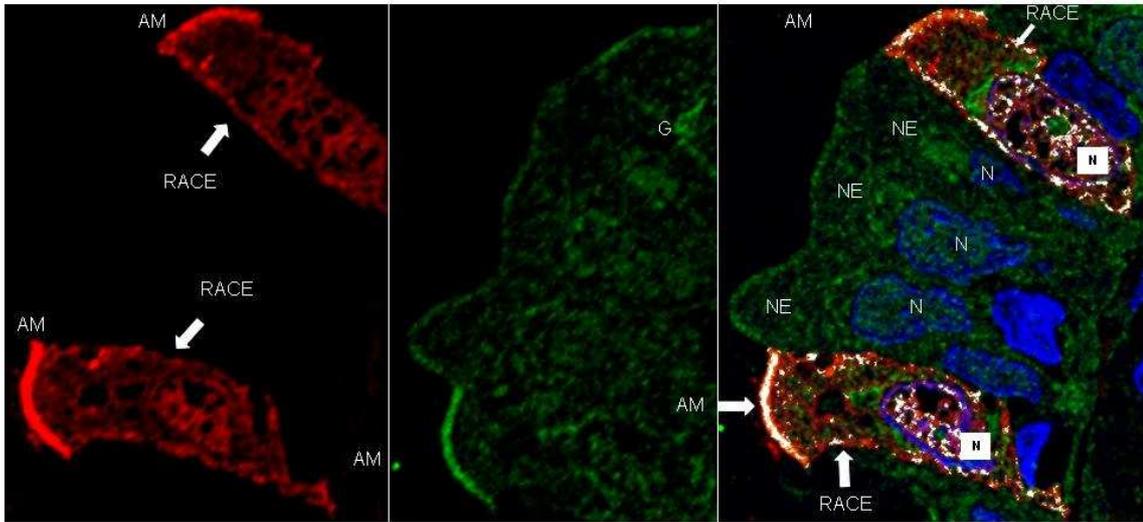


Abb. 3.1

CD1d kolokalisiert mit Gliadin im Zellkern von RACE-Enterozyten

Konfokale Laserimmunfluoreszenzmikroskopie einer Duodenalbiopsie einer Zöliakie-Patientin, Vergrößerungsfaktor 1:200.

rot: Gliadin (pG)

grün: CD1d

blau: DNA, gefärbt mit Höchstfarbstoff

weiß: Kolokalisation Gliadin / CD1d

AM: Apikale Membran

RACE: RACE-Enterozyt

NE: Normale Enterozyten

N: Zellkern

G: Golgi-Apparat

In Abb. 3.1 ist die Verteilung von CD1d und Gliadin auf normalen Enterozyten und RACE-Enterozyten im direkten Vergleich zu beurteilen. Gliadin liegt nahezu ausschließlich auf der apikalen Membran und dem Zytoplasma der RACE-Enterozyten vor. CD1d ist gleichmäßig in den normalen Enterozyten, den RACE-Zellen mit betonter Anfärbung der Golgi-Apparate und in der Submukosa verteilt. Auf der apikalen Membran der RACE-Zellen zeigt sich eine deutlich stärkere Belegung mit CD1d. In der rechten der 3 Abbildungen ist die Kolokalisierung von CD1d und Gliadin in weiß dargestellt. Wie gut zu erkennen ist, zeigt sich eine Kolokalisierung auf der apikalen Membran und in den Zellkernen von RACE-Enterozyten.

Auf Abb. 3.2 ist ebenfalls ein RACE-Enterozyt zu erkennen, bei dem der Zellkern (Pfeil) positiv für Gliadin, aber negativ für CD1d ist. Hier hat die Bindung an das Antigen vermutlich noch nicht stattgefunden.

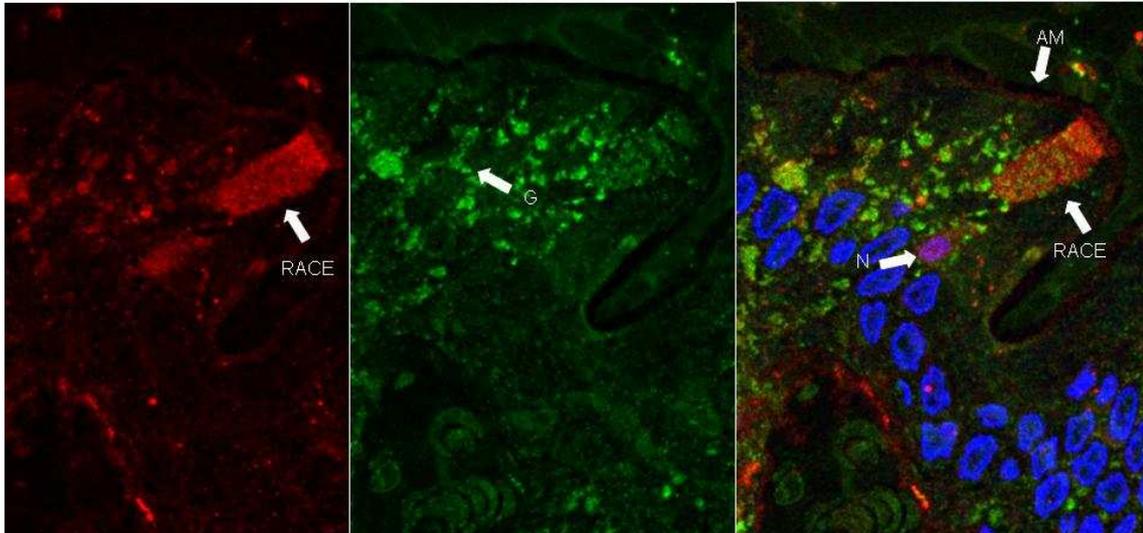


Abb. 3.2

Gliadin ist im Zellkern von RACE-Enterozyten nachweisbar.

Konfokale Laserimmunfluoreszenzmikroskopie einer Duodenalbiopsie einer Zöliakie-Patientin, Vergrößerungsfaktor 1:200.

rot: Gliadin (pG)

grün: CD1d

blau: DNA, gefärbt mit Höchstfarbstoff

RACE: RACE-Enterozyt

AM: Apikale Membran

Nur bei einem Teil (5 von 16) der Zöliakiepatienten lassen sich RACE-Enterozyten in den Duodenalbiopsien darstellen, die Häufigkeitsverteilung liegt zwischen 0/100 normale Enterozyten bis 15/100 normale Enterozyten. Auf der überwiegenden Zahl der RACE-Enterozyten der Zöliakiepatienten ist eine Kolo-kalisierung von CD1d und Gliadin darstellbar.

In Abbildung 3.3 zeigt sich eine deutliche Kolo-kalisierung von CD1d und Gliadin auf der apikalen Membran, auf diesem Ausschnitt sind keine RACE-Enterozyten vorhanden. Bei den kräftig rot abgefärbten Strukturen im Epithelniveau handelt es sich um Gliadin (oder auch um eine Kreuzreaktion des eingesetzten Antikörpers) in Becherzellen.

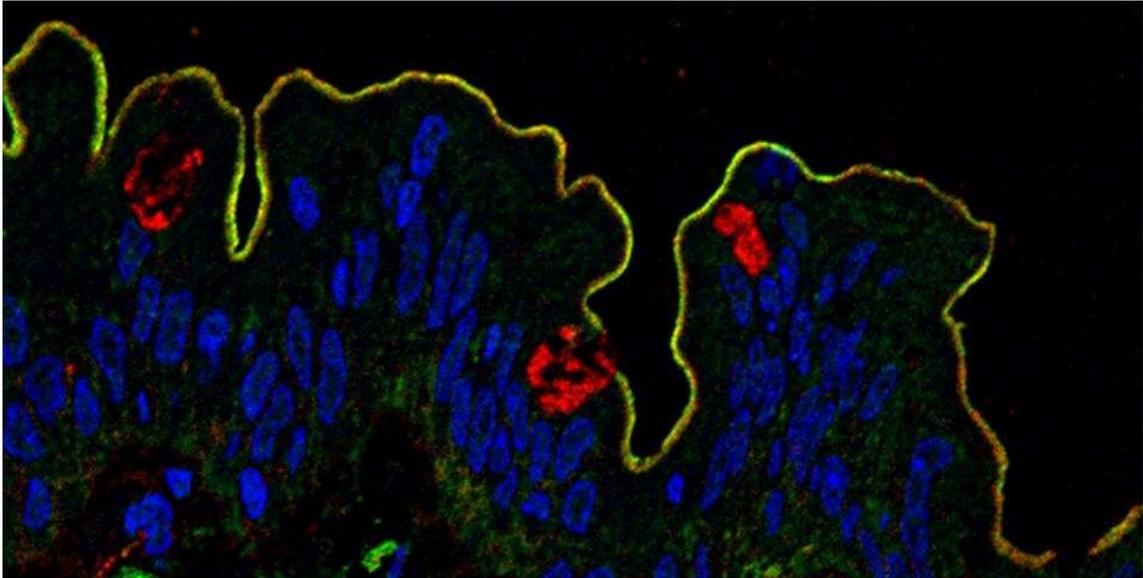


Abb. 3.3

Gliadin kolokalisiert mit CD1d auf der apikalen Membran von normalen Enterozyten. Konfokale Laserimmunfluoreszenzmikroskopie einer Duodenalbiopsie einer Zöliakie-Patientin, Vergrößerungsfaktor 1:200.

rot: Gliadin (pG)

grün: CD1d

blau: DNA, gefärbt mit Höchstfarbstoff

3.1.2 CD1d und Gliadin in Duodenalbiopsien von kranken Kontrollpatienten

Bei den untersuchten Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung zeigt sich eine Verteilung von CD1d und Gliadin, die der auf den normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten ähnelt. CD1d verteilt sich gleichmäßig über die Enterozyten und die Submukosa, die Betonung der apikalen Membran ist jedoch weniger ausgeprägt.

Gliadin ist auf den Enterozyten nur in geringen Mengen vorhanden; in einigen Enterozyten scheinen Vakuolen angefärbt. Auf Abb. 3.4 ist das gleichmäßig mit CD1d angefärbte Zytoplasma normaler Enterozyten bei einem Patienten mit M. Crohn zu erkennen. Gliadin ist auf der apikalen Membran und in den Zellkernen zu erkennen. Eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin im Zellkern zeigt sich nicht.

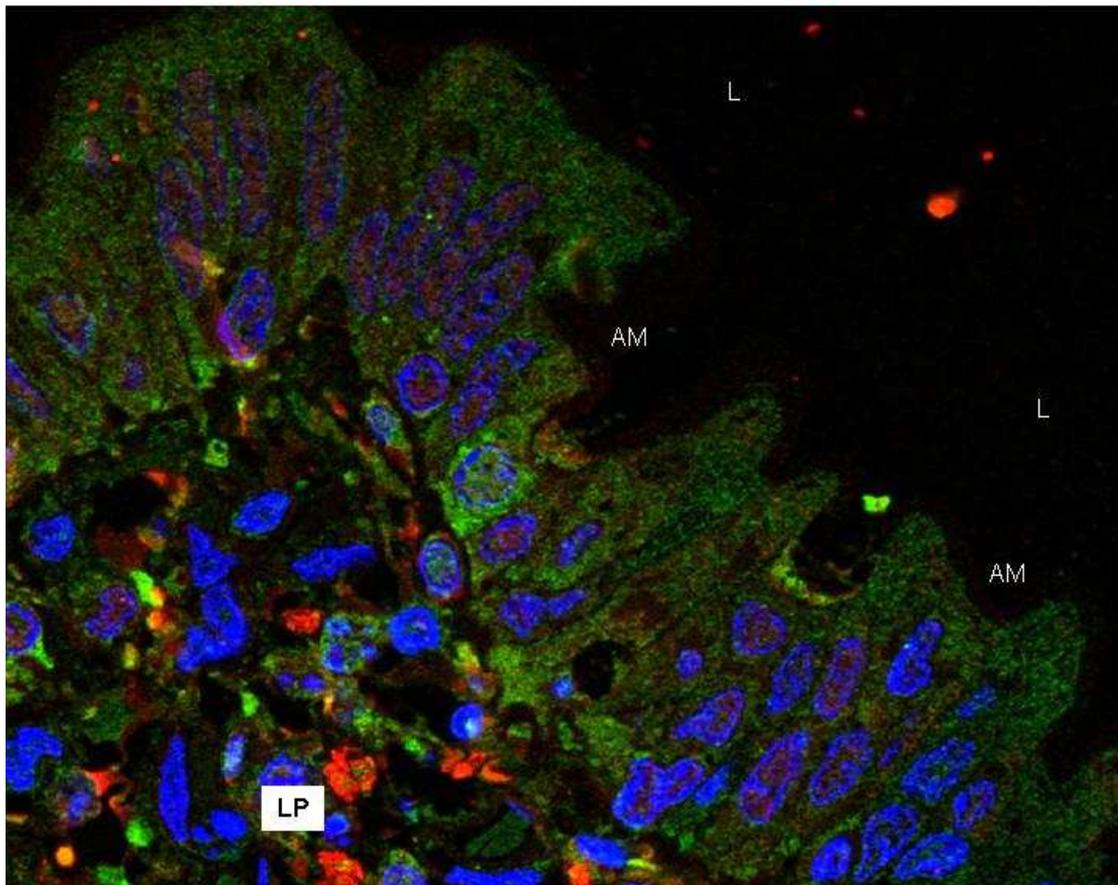


Abbildung 3.4

CD1d ist im Zytoplasma normaler Enterozyten bei kranken Kontrollen nachweisbar. Konfokale Laserimmunfluoreszenzmikroskopie einer Duodenalbiopsie eines M. Crohn-Patienten, Vergrößerungsfaktor 1:200.

grün markiert: CD1d

rot: Gliadin

blau: Zellkerne

AM: Apikale Membran

L: Lumen

LP: Lamina propria

3.1.3 CD1d und Gliadin in Duodenalbiopsien von gesunden Kontrollpatienten

Bei gesunden Kontrollpatienten ist CD1d in der Immunfluoreszenz wiederum gleichmäßig auf den Enterozyten verteilt; supranukleär sind einzelne Golgi-Apparate mit CD1d angefärbt (G, Abb. 3.5). Auf dem Zytoplasma zeigt sich ebenfalls eine homogene Anfärbung, die der auf dem entzündeten Darm der kranken Kontrollpatienten gleicht. Zellkerne sind dagegen in der Immunfluoreszenz weitgehend nicht positiv für CD1d.

Auf Abb. 3.5 ist die Verteilung von CD1d auf der Biopsie eines gesunden Kontrollpatienten dargestellt: die Kerne sind nicht mit dem CD1d-Antikörper markiert.

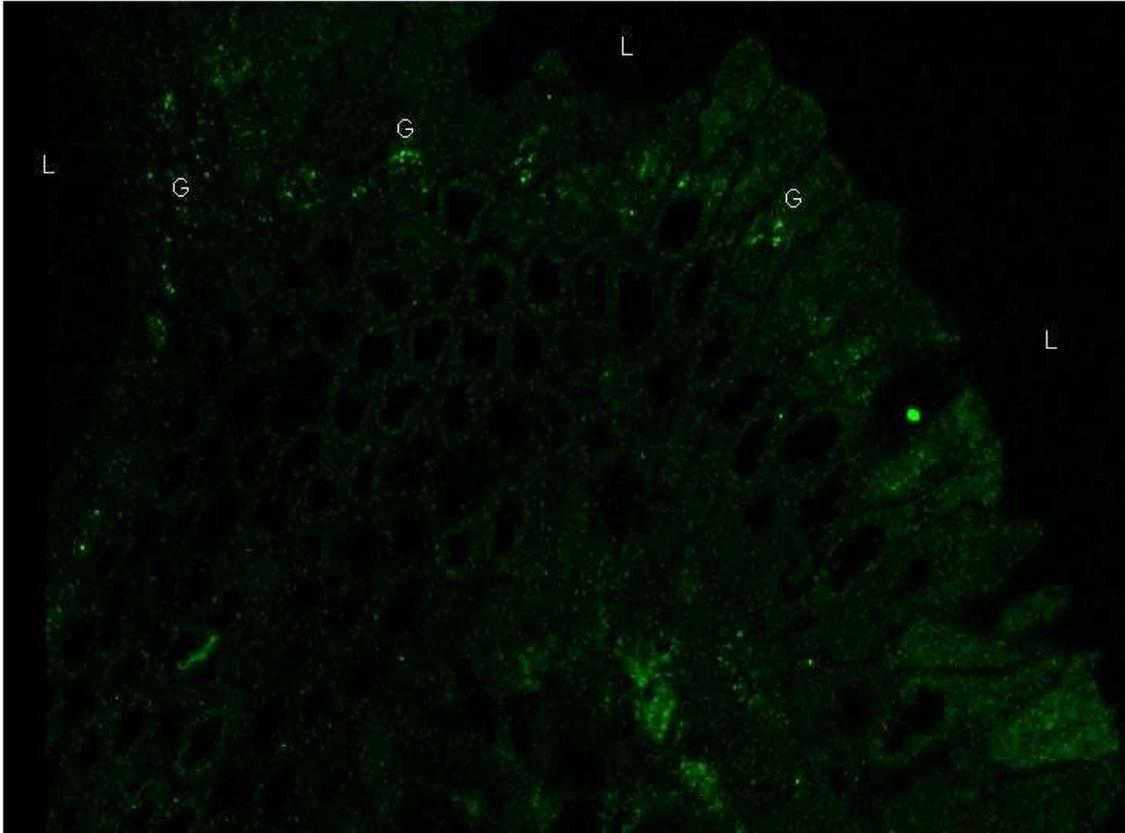


Abbildung 3.5

CD1d ist im Zytoplasma und auf dem Golgi-Apparat bei normalen Enterozyten von gesunden Kontrollen nachweisbar.

Konfokale Laserimmunfluoreszenzmikroskopie einer Duodenalbiopsie eines Kontrollpatienten. Vergrößerungsfaktor 1:60.

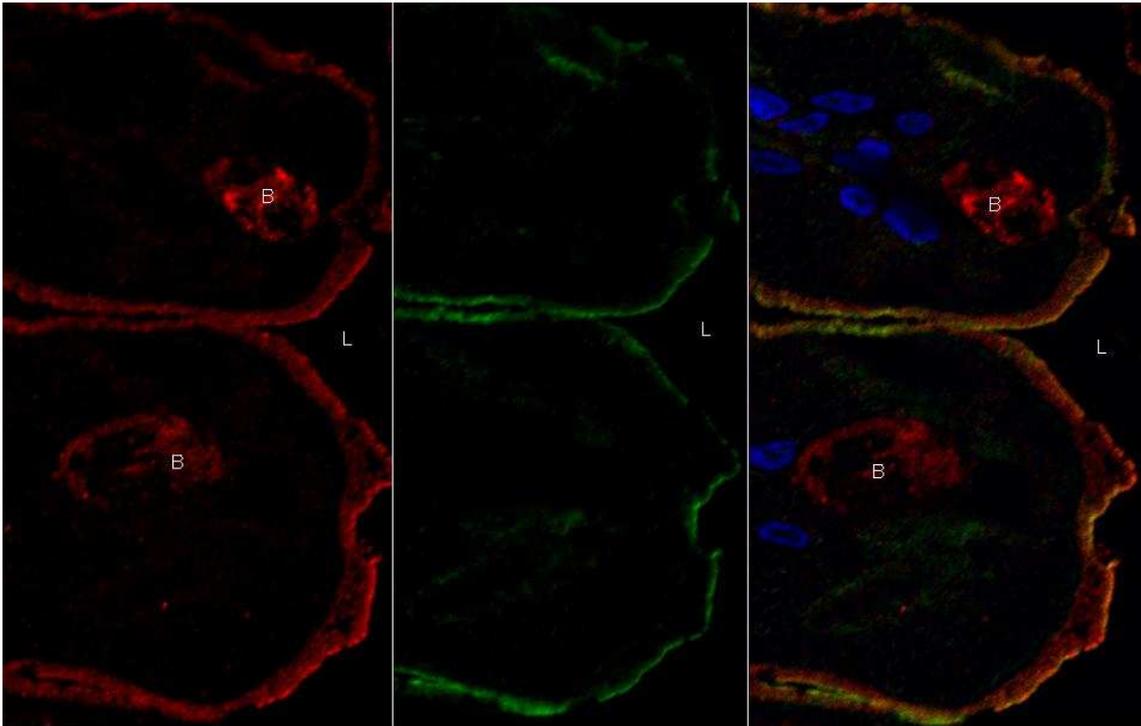
grün markiert: CD1d

G: Golgi-Apparat

L: Lumen

Gliadin stellt sich bei gesunden Kontrollen vorwiegend auf der apikalen Membran und auf Becherzellen dar. Eine Markierung der Zellkerne oder anderer Zellorganellen liegt nicht vor.

Eine Kolokalisierung von Gliadin und CD1d auf normalen Enterozyten von Kontrollpatienten zeigt sich schwach auf der apikalen Membran von wenigen Enterozyten, wie in Abb. 3.6 zu erkennen ist, auf der zwei nebeneinanderliegende Zotten dargestellt sind.

**Abbildung 3.6**

Gliadin kolokalisiert mit CD1d auf der apikalen Membran normaler Enterozyten von gesunden Kontrollen.

Konfokale Laserimmunfluoreszenzmikroskopie einer Duodenalbiopsie eines Kontrollpatienten. Vergrößerungsfaktor 1:200.

rot: Gliadin

grün: CD1d

blau markiert: Zellkerne

L: Lumen

B: Becherzelle

3.2 Lokalisierung von CD1d in Enterozyten mittels Immunelektronenmikroskopie

Die Untersuchungen erfolgten, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, mittels Kryo-Immunelektronenmikroskopie mit einem monoklonalen Antikörper der Maus gegen CD1d und einem polyklonalen Antikörper vom Kaninchen gegen Gliadin. Die Bindungsstellen der Antikörper wurden mit gegen Maus bzw. Kaninchen gerichteten Seren der Ziege, die mit 12 nm großen Gold-Partikeln konjugiert wurden, im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht.

Die Präparate wurden in einer Vergrößerung von 17.700 – 35.400 untersucht. Die Fotodokumentation erfolgte in der Vergrößerung 17.700, wobei möglichst randomisiert die stärksten Lokalisierungen festgehalten wurden. Die Markierungsdichte des Antikörpers gegen das nichtklassische HLA-Klasse-I-Molekül CD1d wurde quantitativ in unterschiedlichen Zellkompartimenten (z.B. Zellkern) untersucht. Die Bestimmung der Markierungsdichte erfolgte, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, mit der Formel

$$MD [GP / \mu m^2] = \frac{GP [GP] \times VG^2}{P \times d^2 [\mu m^2]}.$$

Dann erfolgte eine statistische Auswertung der Markierungsdichte auf den unterschiedlichen Zellkompartimenten. Als RACE-Enterozyten wurden nur Zellen gezählt, bei denen eindeutig größere Mengen Gliadin im Zytoplasma vorlagen. Die Lokalisierung von Gliadin auf den verschiedenen Zellkompartimenten wurde qualitativ beurteilt.

Die Auswertung der Immunelektronenmikroskopie erfolgte nach Zellkompartimenten; eine Ausschnittvergrößerung aus einem RACE-Enterozyten in einer Duodenalbiopsie eines Zöliakiepatienten zeigt Abb. 3.7. Hier ist gut die Verteilung von CD1d im Zytoplasma und im Zellkern zu erkennen. Die Markierung ist als spezifisch anzusehen, weil die Mitochondrien keine Bindungsstellen des Antikörpers zeigen und in den

benachbarten Enterozyten und Lymphozyten (in Abb. 3.7 nicht gezeigt, s. Abschnitt 3.2.1) CD1d nicht im Zytoplasma vorhanden ist.

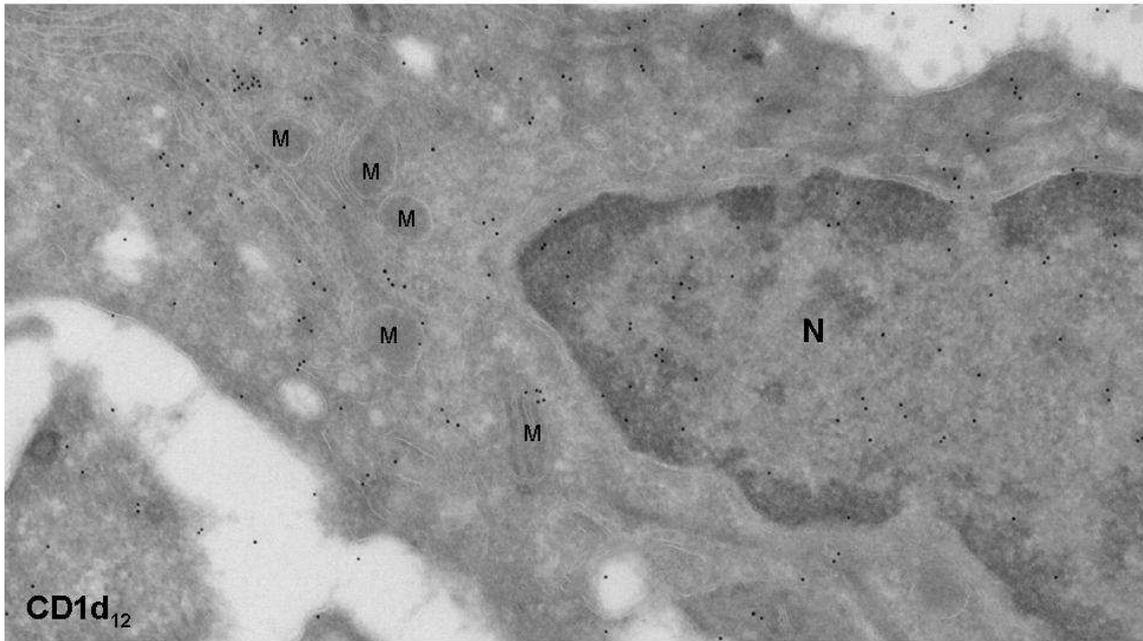


Abbildung 3.7

CD1d ist im Zytoplasma und im Zellkern von RACE-Enterozyten nachweisbar.

Immunelektronenmikroskopie mit CD1d aus einer Duodenalbiopsie eines Zöliakie-Patienten: Ausschnittvergrößerung aus einem RACE-Enterozyten. Vergrößerungsfaktor 1:35400

N: Zellkern

M: Mitochondrium

3.2.1 CD1d in normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten

In normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten kann das durch 12 nm große Goldpartikel markierte CD1d auf dem Golgi-Apparat, der apikalen Membran, der basolateralen Membran und auf dem Zellkern nachgewiesen werden. In Abb. 3.8 ist ein Ausschnitt aus einem normalen Enterozyten dargestellt, auf dem nur im Zytoplasma CD1d nachweisbar ist.

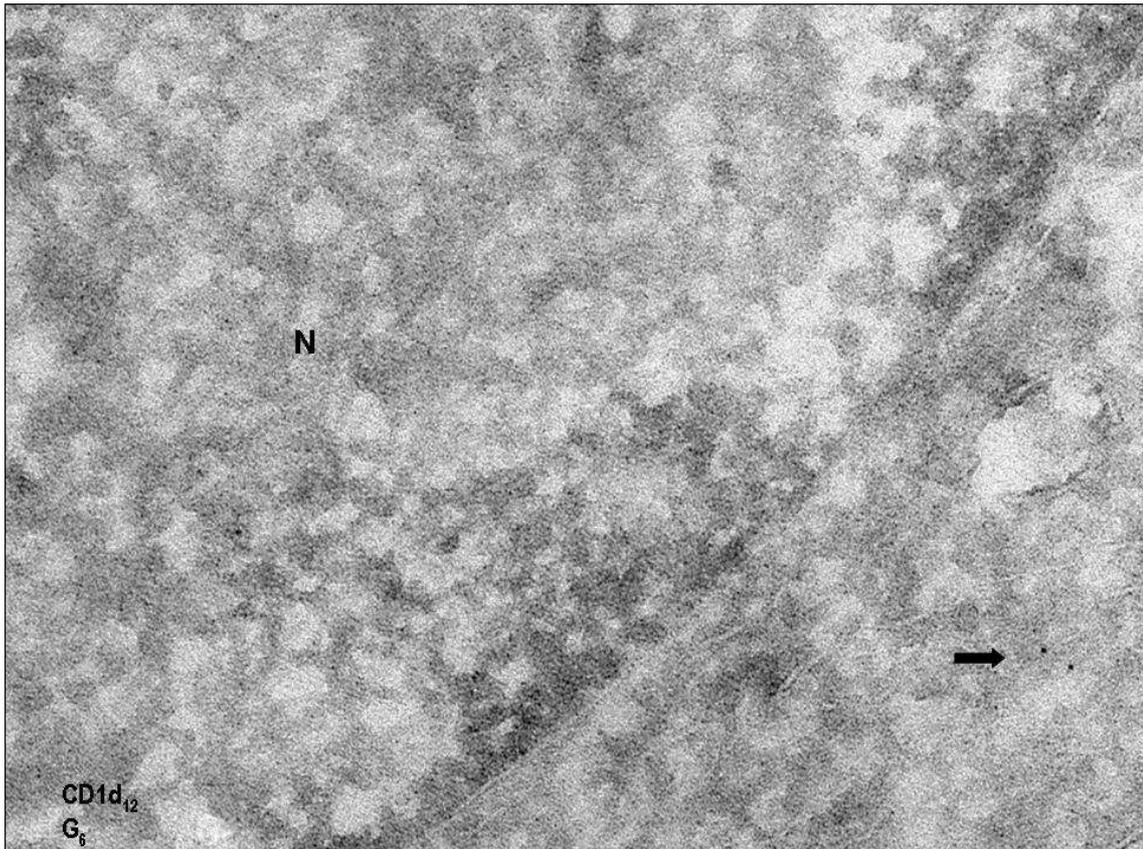


Abbildung 3.8 **Vergrößerungsfaktor 1:35400**
CD1d ist im Zytoplasma normaler Enterozyten von Zöliakiepatienten nachweisbar.
Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie
eines Zöliakie-Patienten: Ausschnittvergrößerung eines normalen Enterozyten.
N: Zellkern **Pfeil: CD1d**

Die mittlere Markierungsdichte von CD1d auf dem Zellkern normaler Enterozyten beträgt bei Zöliakiepatienten 0,2 Goldpartikel / μm^2 . Die durchschnittliche Markierungsdichte auf dem Zellkern von Lymphozyten von 0,1 Goldpartikel / μm^2 wurde als unspezifisches Label („Hintergrund“) angenommen.

Der Unterschied der Markierungsdichten zwischen Zellkernen von normalen Enterozyten bei Zöliakiepatienten und intraepithelialen Lymphozyten (IEL) ist nicht signifikant im student-t-test mit $p = 0,09$. Wir gehen daher davon aus, dass es sich bei der Markierung der Zellkerne normaler Enterozyten ebenfalls um ein unspezifisches Label handelt. Tabelle 3.1 gibt die Ergebnisse der Quantifizierung der Verteilung von CD1d bei normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten wieder.

Tabelle 3.1

Verteilung von CD1d auf normalen Enterozyten in Duodenalbiopsien von Zöliakie-Patienten

Lokalisation	Golgi-Apparat	apikale Membran	basolaterale Membran	Zellkern	IEL Kern
Schnittstellen	65	958	40	670	3284
Goldpartikel	100	152	2	19	25
Mittelwert Markierungsdichte [Goldpartikel / μm^2]	36,2	3,5	1,7	0,2	0,1
Standardabweichung Markierungsdichte [26,7	3,5	2,8	0,2	0,1

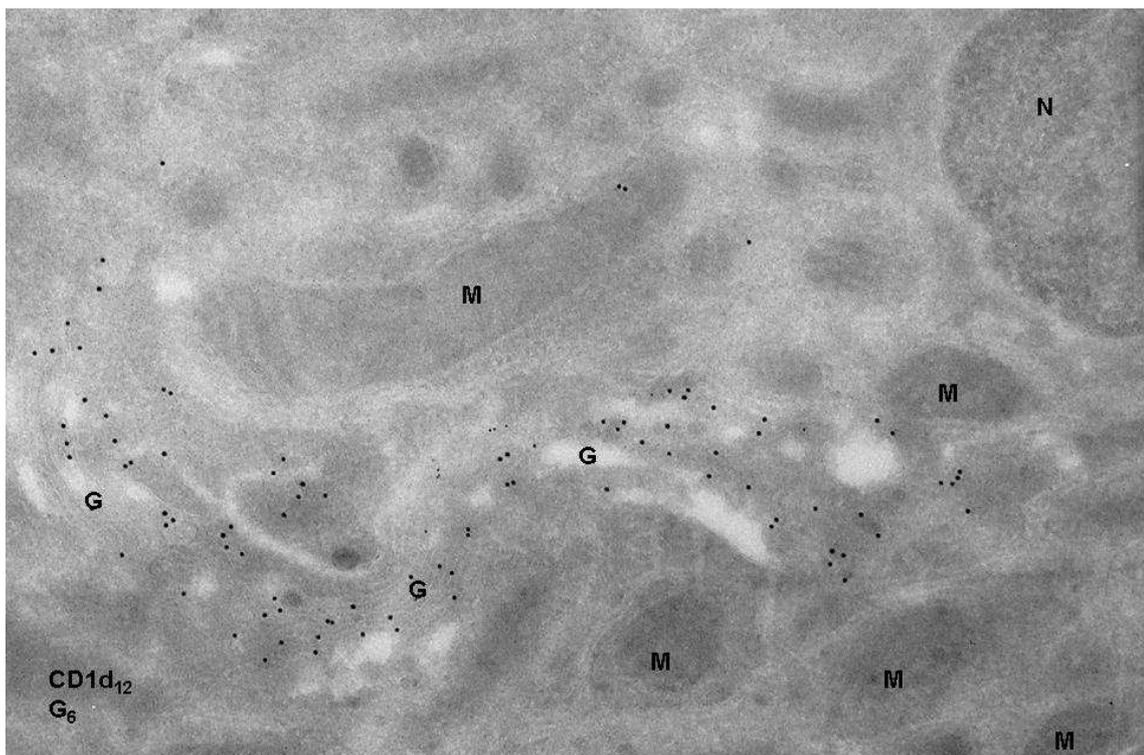


Abbildung 3.9

CD1d ist im Golgi-Apparat normaler Enterozyten von Zöliakiepatienten lokalisiert. Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Zöliakie-Patienten, Vergrößerungsfaktor 1:35400

N: Zellkern

G: Golgi-Apparat

M: Mitochondrien

Auf Abb. 3.9 ist die Markierung von CD1d auf dem Golgi-Apparat eines normalen Enterozyten zu erkennen. Einzelne 6-nm Goldpartikel zeigen Gliadin in der Golgi-Region an. Da Mitochondrien und Zellkern hier nicht markiert sind, ist dies als spezifisches Label anzusehen.

3.2.2 CD1d in RACE- Enterozyten von Zöliakiepatienten

In RACE-Enterozyten, einer speziellen Population von Enterozyten, die durch eine schnelle Aufnahme exogener Antigene in das Zytosol charakterisiert sind, kann CD1d im Zellkern in einer höheren Markierungsdichte nachgewiesen werden als in Zellkernen normaler Enterozyten. Die mittlere Markierungsdichte beträgt hier 0,4 Goldpartikel / μm^2 . Dieser Unterschied ist signifikant im student-t-test ($p < 0,05$). Auch die unterschiedliche Markierungsdichte gegenüber Kernen von Lymphozyten ist statistisch signifikant im student-t-Test. Darüber hinaus zeigt sich bei einem Teil der untersuchten Zöliakie-Patienten in der Elektronenmikroskopie eine Kolo-kalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Kern der RACE-Enterozyten. In Tabelle 3.2 ist die Auswertung der Quantifizierung von CD1d in Zellkernen von RACE-Enterozyten bei Zöliakiepatienten dargestellt.

Tabelle 3.2
Verteilung von CD1d auf RACE-Enterozyten in Duodenalbiopsien von Zöliakie-Patienten

Lokalisation	Zellkern RACE-Enterozyt
Schnittstellen	1823
Goldpartikel	35
Mittelwert Markierungsdichte [Goldpartikel / μm^2]	0,4
Standardabweichung Markierungsdichte [Goldpartikel / μm^2]	0,2

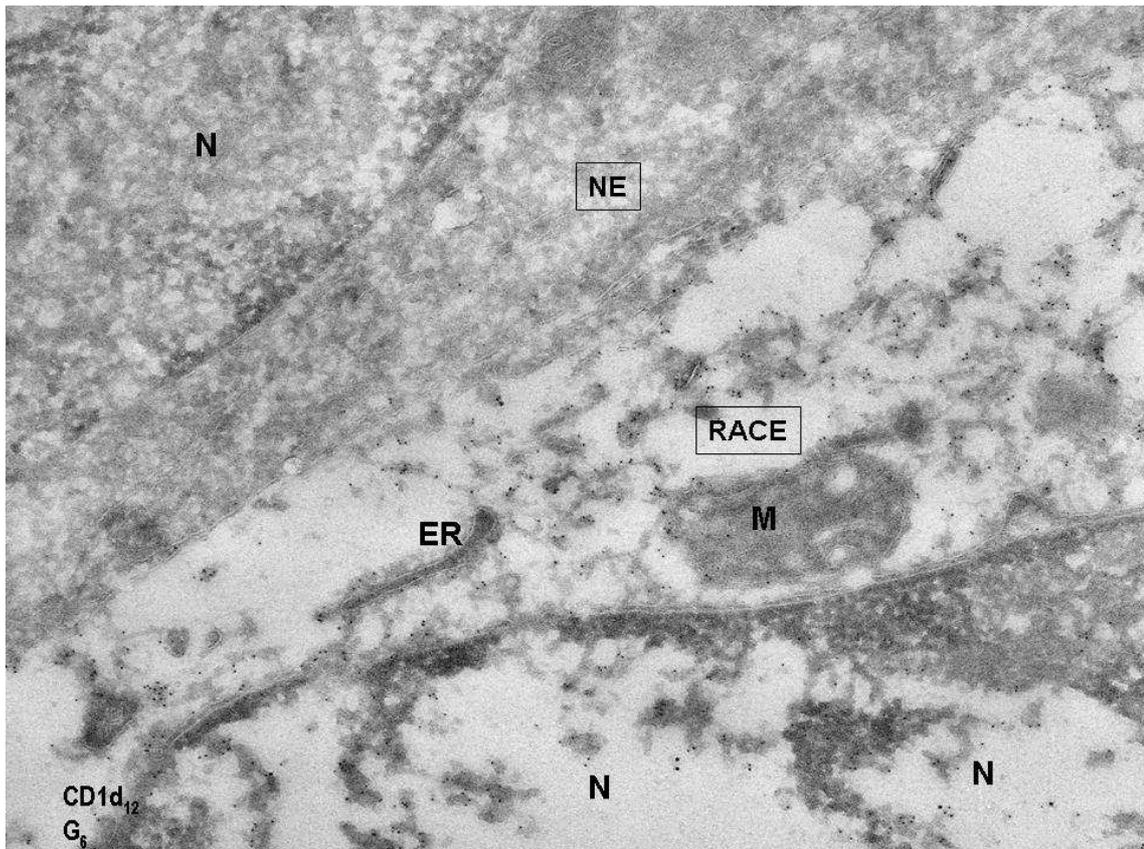


Abbildung 3.10

CD1d ist in normalen Enterozyten im endoplasmatischen Retikulum und in RACE-Enterozyten im Zytoplasma und im Zellkern nachweisbar.

Immunoelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Zöliakie-Patienten, Vergrößerungsfaktor 1:17700.

RACE: RACE-Enterozyt

NE: Normaler Enterozyt

N: Zellkern

M: Mitochondrium

ER: Endoplasmatisches Retikulum

In Abb. 3.10 ist die unterschiedliche Verteilung von CD1d auf 2 benachbarten Zellen gut zu erkennen. In der oberen Bildhälfte ist ein normaler Enterozyt zu sehen, bei dem im Kern kein und im endoplasmatischen Retikulum nur einige wenige Goldpartikel CD1d anzeigen. Auf dem RACE-Enterozyten in der unteren Bildhälfte ist die Markierungsdichte für CD1d sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern erheblich größer. Wie auf der nachfolgenden Ausschnittvergrößerung (Abb. 3.11) zu erkennen ist, zeigt sich deutlich eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern des RACE-Enterozyten.

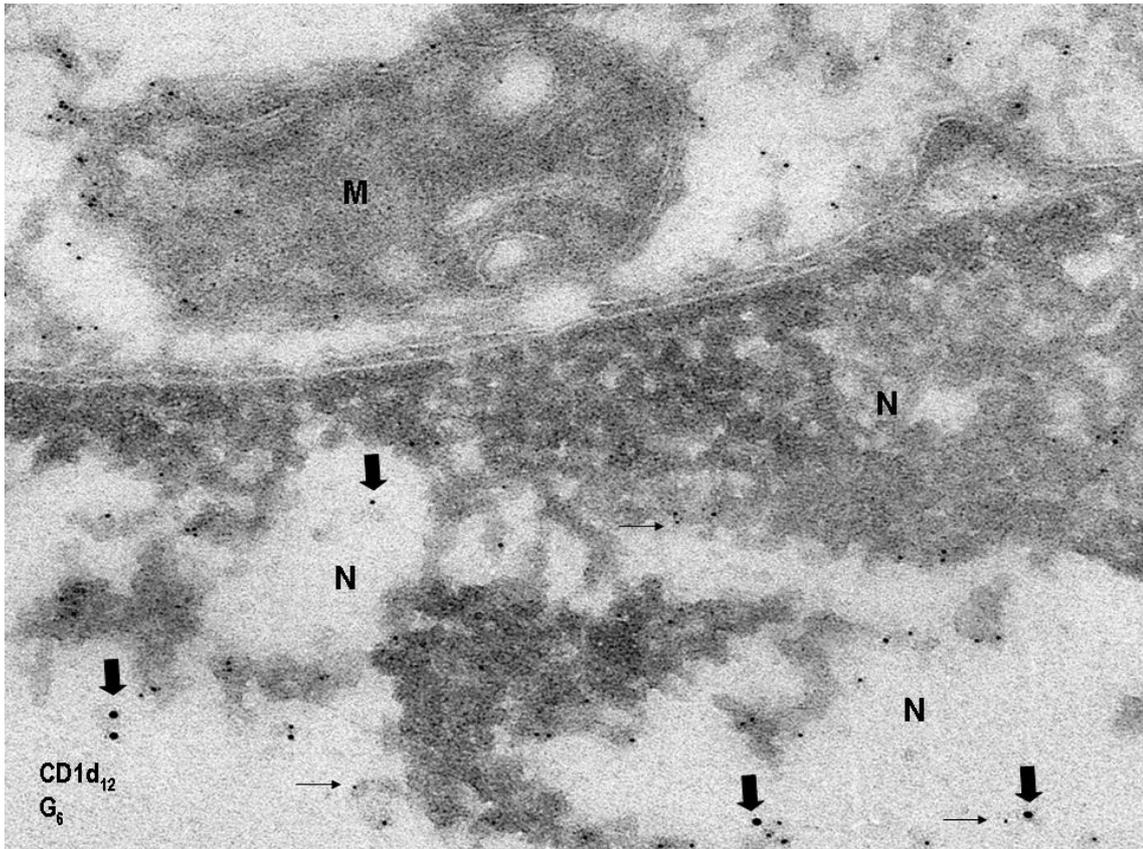


Abbildung 3.11

CD1d ist mit Gliadin im Zellkern von RACE-Enterozyten bei Zöliakiepatienten kolokalisiert.

Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin, Ausschnittvergrößerung aus einem RACE-Enterozyten eines Zöliakie-Patienten, Vergrößerungsfaktor 1:35400.

N: Zellkern

M: Mitochondrium

Dicke Pfeile: CD1d

Dünne Pfeile: Gliadin

Auch im Zytoplasma der RACE-Enterozyten ist eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin nachweisbar, wie die Ausschnittvergrößerung aus einer Biopsie eines anderen Zöliakiepatienten zeigt. (Abb. 3.12) Auch auf dem Golgi-Apparat sind CD1d und Gliadin kolokalisiert.

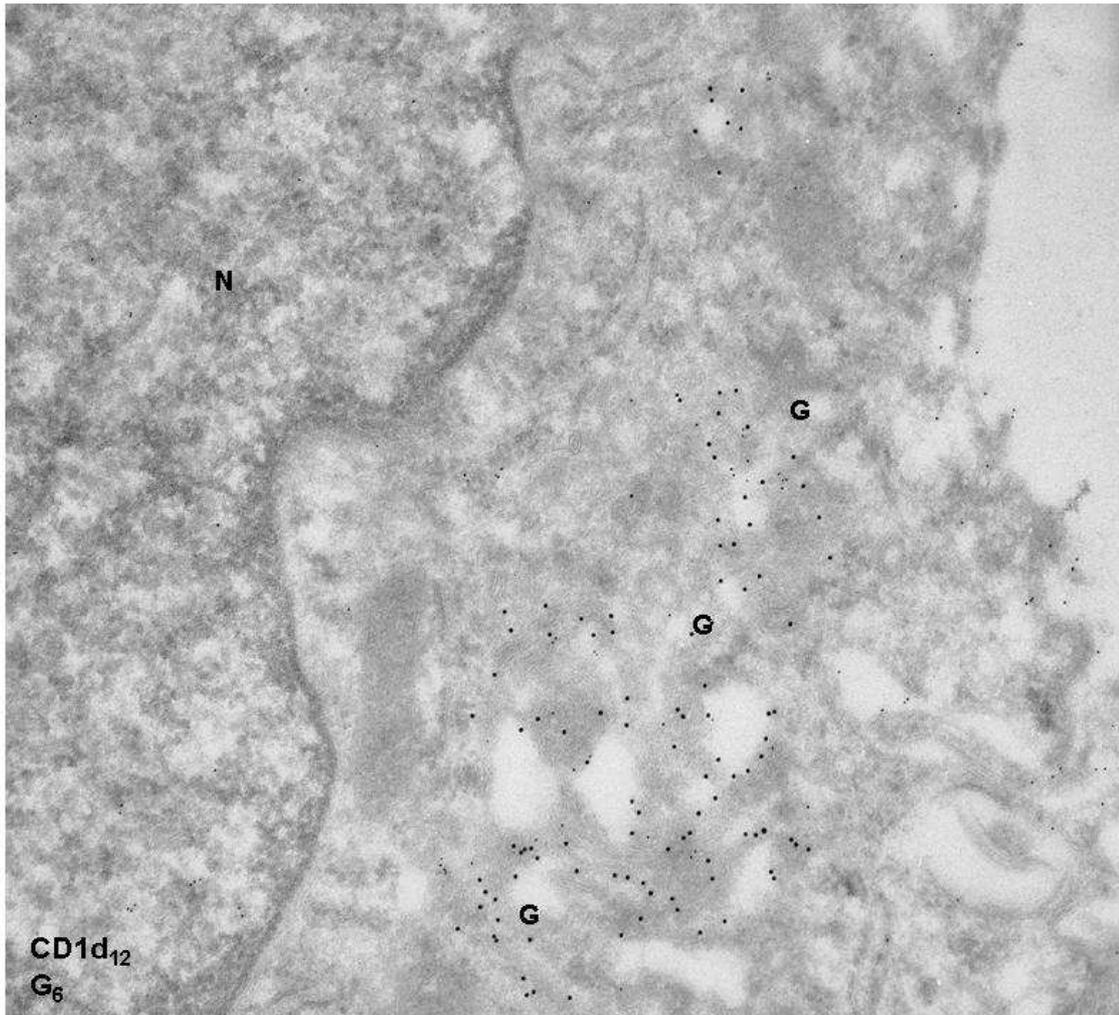


Abbildung 3.12

Gliadin kolokalisiert mit CD1d im Zytoplasma und auf dem Golgi-Apparat eines RACE-Enterozyten bei einem Zöliakiepatienten

Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin, Ausschnittvergrößerung aus einem RACE-Enterozyten eines Zöliakie-Patienten, Vergrößerungsfaktor 1:35400.

G: Golgi-Apparat

N: Zellkern

3.2.3 CD1d in Duodenalbiopsien von kranken Kontrollpatienten

Hier zeigt sich eine Verteilung der CD1d-Markierung, die im endoplasmatischen Retikulum und auf der apikalen und basolateralen Membran der auf normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten gleicht. Auf dem Golgi-Apparat ist allerdings eine erheblich niedrigere Markierungsdichte nachweisbar.

Auf den Zellkernen normaler Enterozyten liegt die Markierungsdichte bei durchschnittlich 0,3 Goldpartikeln / μm^2 . Das auf den mit erfassten

intraepithelialen Lymphozyten ermittelte unspezifische Label beträgt ebenfalls 0,3 Goldpartikel / μm^2 . Auch im student-t-Test zeigt sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied.

Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei der Markierung auf den Zellkernen normaler Enterozyten der kranken Kontrollen ausschließlich um ein unspezifisches Label („Hintergrund“) handelt. Auch eine Kolokalisierung von Gliadin und CD1d auf dem Zellkern ist auf diesen Zellen nicht nachweisbar.

In RACE-Enterozyten war jedoch, wie in der Gruppe der Zöliakiepatienten, eine solche Kolokalisation nachweisbar. Diese waren in der Elektronenmikroskopie von 4 Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung (2 mit Colitis ulcerosa, 2 mit M. Crohn) nur bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa zu identifizieren. Voruntersuchungen aus der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Anzahl der RACE-Enterozyten in entzündeter Schleimhaut mit dem Grad der Entzündung zunimmt und sie etwas häufiger bei M. Crohn zu finden sind. (Schurmann, Bruwer et al. 1999)

In der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie waren sie dagegen auch in der vorliegenden Untersuchung häufiger zu finden.

Tabelle 3.3 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Markierungsdichte von CD1d auf normalen Enterozyten kranker Kontrollen.

Tabelle 3.3
Verteilung von CD1d auf normalen Enterozyten von kranken Kontrollpatienten

Lokalisation	Golgi-Apparat	Apikale Membran	Basolaterale Membran	Zellkern	IEL
Schnittstellen	28	675	131	3490	2264
Goldpartikel	4	60	19	51	27
Mittelwert Markierungsdichte [Goldpartikel / μm^2]	3,0	2,4	3,5	0,3	0,3
Standardabweichung Markierungsdichte [Goldpartikel / μm^2]	0,4	2,4	2,7	0,3	0,1

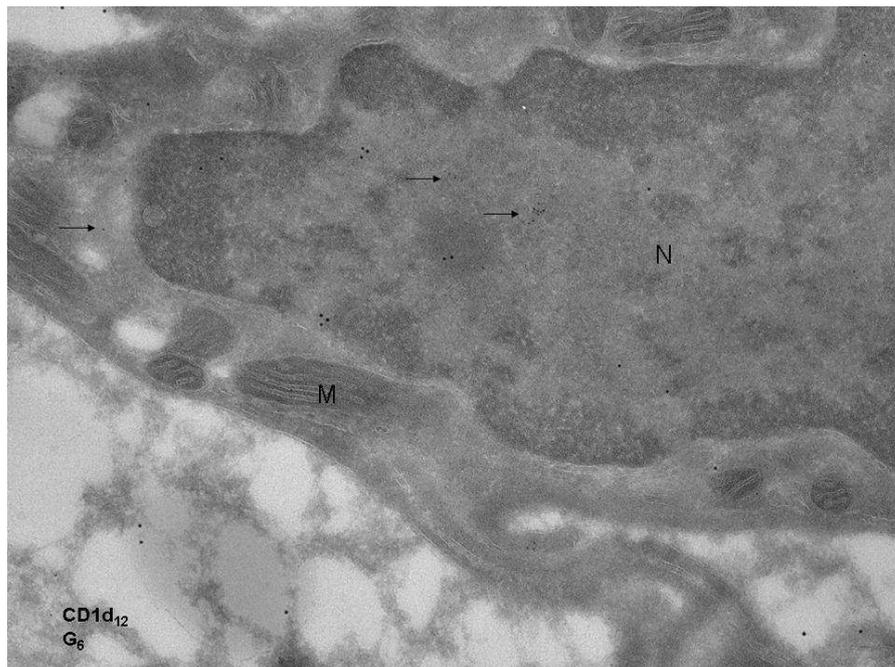


Abbildung 3.13
Kolokalisierung von Gliadin und CD1d im Zellkern eines RACE-Enterozyten. Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Patienten mit Colitis ulcerosa: Ausschnittvergrößerung aus einem RACE-Enterozyten, Vergrößerungsfaktor 1:35400

N: Zellkern

Pfeil: Gliadin

M: Mitochondrium

Im Zellkern dieses RACE-Enterozyten (Abb. 3.13) eines Patienten mit Colitis ulcerosa zeigt sich eine Kolokalisierung von Gliadin und CD1d.

Insgesamt waren bei diesem Patienten in der Elektronenmikroskopie nur 2 RACE-Enterozyten eindeutig zu identifizieren.

3.2.4 CD1d in Duodenalbiopsien von gesunden Kontrollpatienten

Bei den gesunden Kontrollen zeigt sich wiederum ein Verteilungsmuster in den Zellkompartimenten, das dem Befund auf normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten gleicht.

Die Markierungsdichte für CD1d auf den Zellkernen normaler Enterozyten bei den von uns untersuchten gesunden Kontrollen beträgt 0,5 Goldpartikel / μm^2 . Die in den gleichen Schnitten mit erfassten intraepithelialen Lymphozyten weisen ebenfalls eine Markierungsdichte von 0,5 / μm^2 auf, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei der Markierung in Zellkernen der Enterozyten um ein unspezifisches Label handelt. Eine Kolokalisierung mit Gliadin ist in den Zellkernen normaler Enterozyten ebenfalls nicht nachweisbar.

In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Markierungsdichte von CD1d auf Duodenalbiopsien gesunder Kontrollen dargestellt.

Tabelle 3.4
Verteilung von CD1d in Duodenalbiopsien von gesunden Kontrollen

Lokalisation	Golgi-Apparat	apikale Membran	basolaterale Membran	Zellkern	IEL Kern
Schnittstellen	12	777	152	4535	6083
Goldpartikel	37	107	10	134	107
Mittelwert Markierungsdichte [Goldpartikel / μm^2]	68,5	3,0	1,7	0,5	0,5
Standardabweichung Markierungsdichte [34,6	2,7	1,5	0,4	0,4

Bemerkenswert scheint ein Patient (V. a. Zöliakie, der bioptisch nicht gesichert werden konnte), bei dem auf dem Golgi-Apparat CD1d in sehr hoher Markierungsdichte nachweisbar ist. Histologisch bestand bei diesem Patienten eine leichtgradige Duodenitis mit einer leichten Erhöhung der Anzahl intraepithelialer Lymphozyten (15-20/100 Enterozyten) ohne Zottenatrophie oder Kryptenhyperplasie. Bei dem gleichen Patienten zeigt sich in einem anderen Schnitt eine Kolokalisierung von Gliadin und CD1d im Zytoplasma eines RACE-Enterozyten. Auch hier war insgesamt nur eine geringe Anzahl RACE-Enterozyten nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis auf eine Antigenpräsentation sein. Hierfür gibt es zunächst keine offensichtliche Erklärung. Die Verlaufskontrolle wird bei diesem Patienten zeigen, ob dieses Phänomen ein früher Hinweis für einen entzündlichen Prozess der Darmmukosa oder einen Zustand nach Darminfektion darstellt. Möglicherweise liegt auch bei diesem Patienten eine latente Zöliakie vor, die zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme noch nicht die histologischen Kriterien zur Diagnosestellung einer aktiven Zöliakie erreichte.

In der Abb. 3.14 ist ein Ausschnitt aus einem normalen Enterozyten des oben genannten Patienten dargestellt, auf dem sich im Bereich eines Golgi-Apparates eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin zeigt.

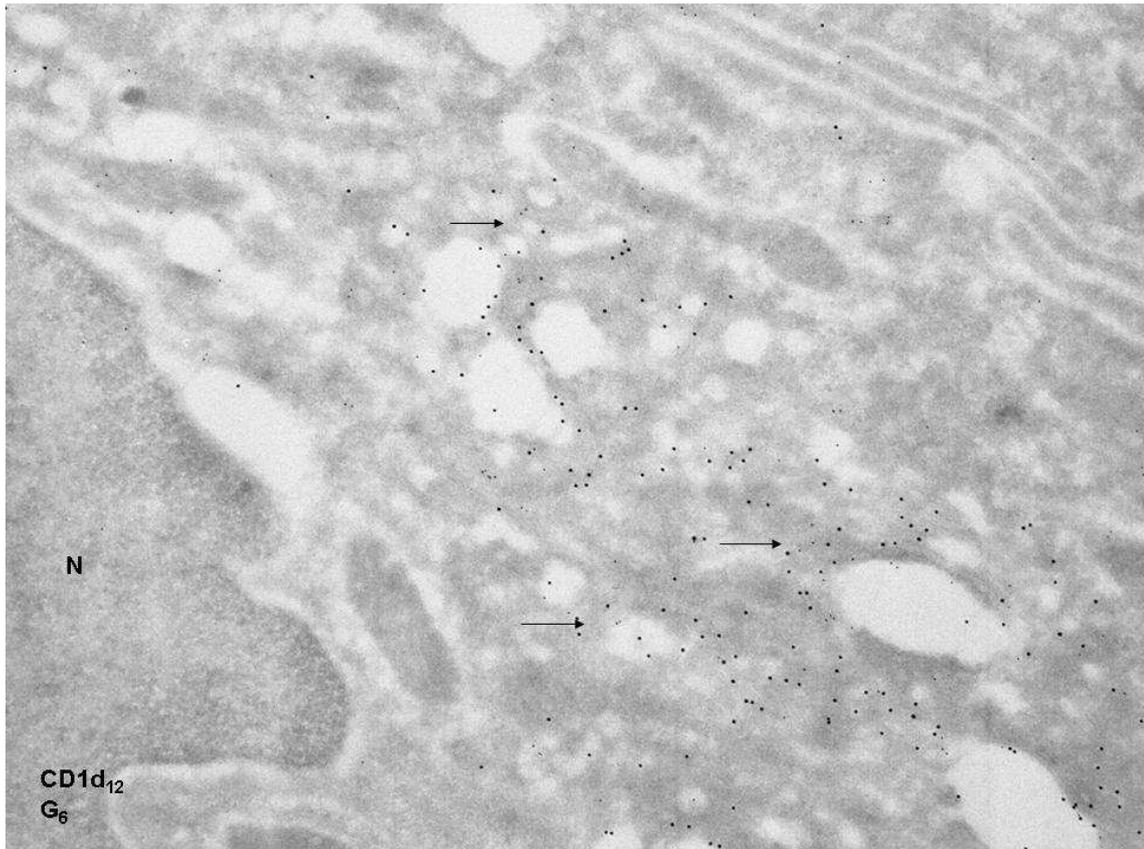


Abbildung 3.14

Kolokalisierung von Gliadin und Cd1d auf dem Golgi-Apparat eines normalen Enterozyten bei einem gesunden Kontrollpatienten.

Immunoelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Kontrollpatienten: Ausschnittvergrößerung, Vergrößerungsfaktor 1:35400.

N: Zellkern

→ Kolokalisierung CD1d / Gliadin

3.3 Lokalisierung von Gliadin mit der Elektronenmikroskopie

3.3.1 Gliadin auf normalen Enterozyten von Zöliakie-Patienten

Auf normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten zeigt sich Gliadin, das durch 6-nm-Goldpartikel markiert wurde, ausschließlich auf der apikalen Membran und in Endosomen. Diese Beobachtung entspricht denen früherer Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe (Zimmer, Weber et al. 1996).

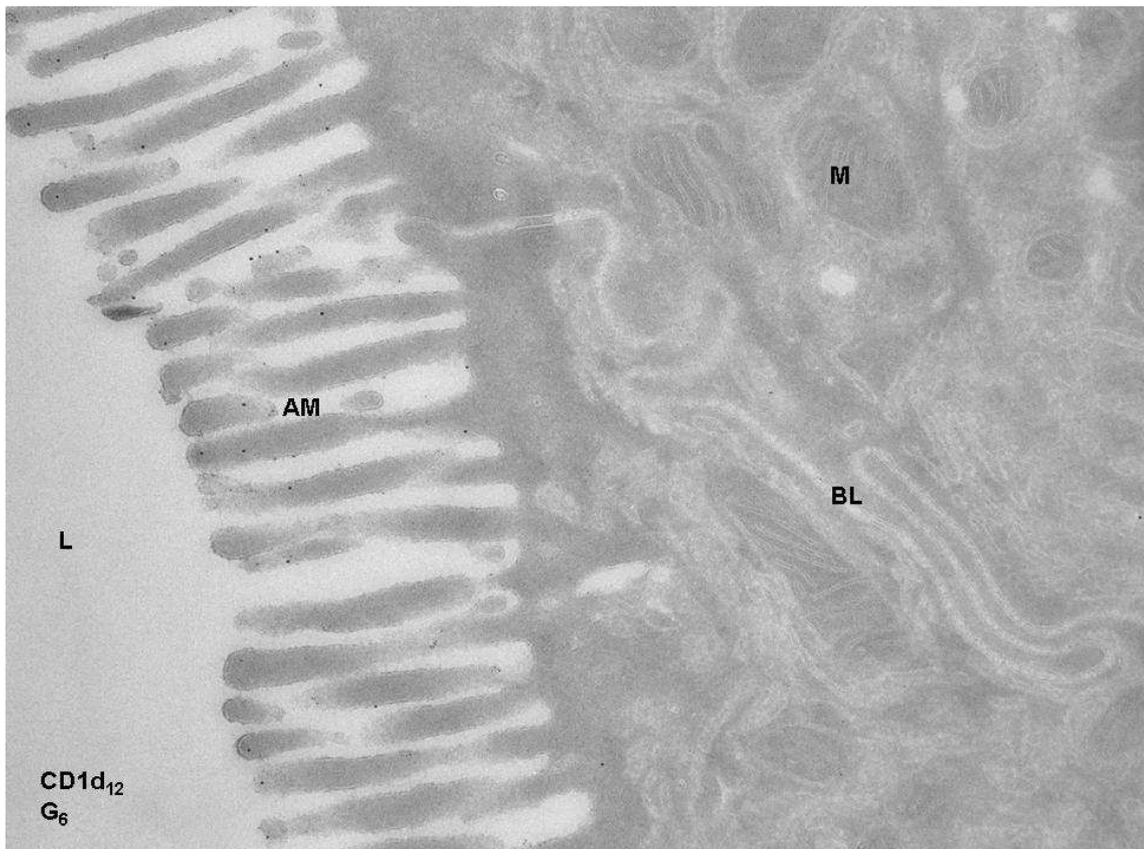


Abbildung 3.15

CD1d und Gliadin sind auf der apikalen Membran normaler Enterozyten von Zöliakiepatienten kolokalisiert.

Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Zöliakiepatienten: Ausschnittvergrößerung aus einem normalen Enterozyten, Vergrößerungsfaktor 1:17700.

AM: Apikale Membran

BL: Basolaterale Membran

M: Mitochondrium

L: Darmlumen

Auf Abb. 3.15 ist eine Ausschnittvergrößerung aus einem normalen Enterozyten eines Zöliakiepatienten dargestellt. Auf der apikalen Membran auf der linken Bildseite zeigen sowohl 6 nm-Goldpartikel Gliadin, als auch 12 nm-Goldpartikel CD1d an. Im Zytoplasma, den mit erfassten Mitochondrien und der basolateralen Membran sind in diesem Ausschnitt weder CD1d noch Gliadin nachweisbar.

3.3.2 Gliadin auf RACE-Enterozyten von Zöliakie-Patienten

Auf RACE-Enterozyten kann Gliadin auf der apikalen Zellmembran nachgewiesen werden, wie bei normalen Enterozyten.

Darüber hinaus ist Gliadin in großer Dichte im Zytoplasma nachweisbar, wie auch im Zellkern.

In der folgenden Abbildung (Abb. 3.16a) sind zwei nebeneinanderliegende Zellen zu erkennen. Der Interzellulärspalt ist mit einer gestrichelten Linie markiert. Am oberen Bildrand befindet sich ein normaler Enterozyt (NE), in der unteren Bildhälfte liegt ein RACE-Enterozyt. Bereits in der Übersicht ist eine unterschiedliche Verteilung von Gliadin auf den beiden Zellen zu erkennen. In der Vergrößerung des mit dem Rechteck markierten Bereichs (Abb. 3.16b) zeigt sich außerdem eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern des RACE-Enterozyten.

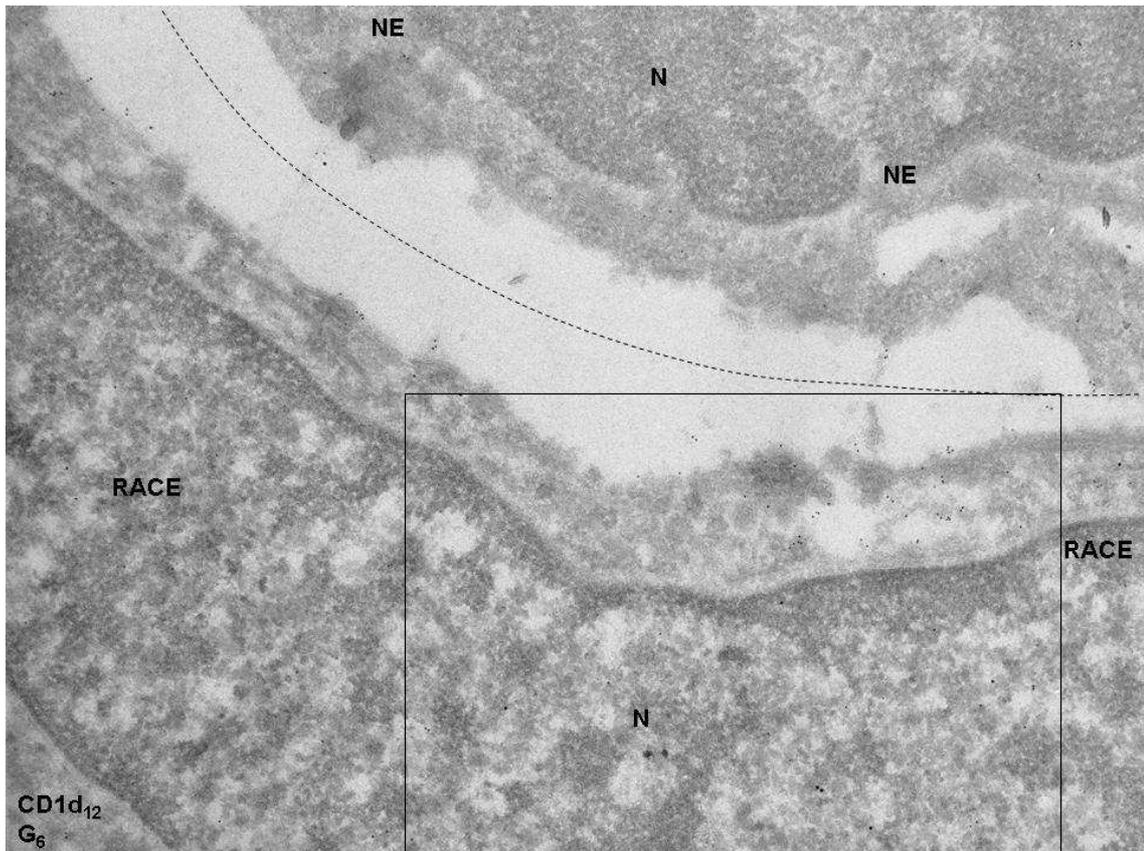


Abbildung 3.16a

Höhere Markierungsdichte von Gliadin und CD1d auf einem RACE-Enterozyten im Vergleich zu einem normalen Enterozyten.

Immunelektronenmikroskopie mit Gliadin und CD1d aus einer Duodenalbiopsie eines Zöliakiepatienten: Übersicht zweier nebeneinander liegender Enterozyten,

Vergrößerungsfaktor 1:17700

NE: Normaler Enterozyt

RACE: RACE-Enterozyt

N: Zellkern

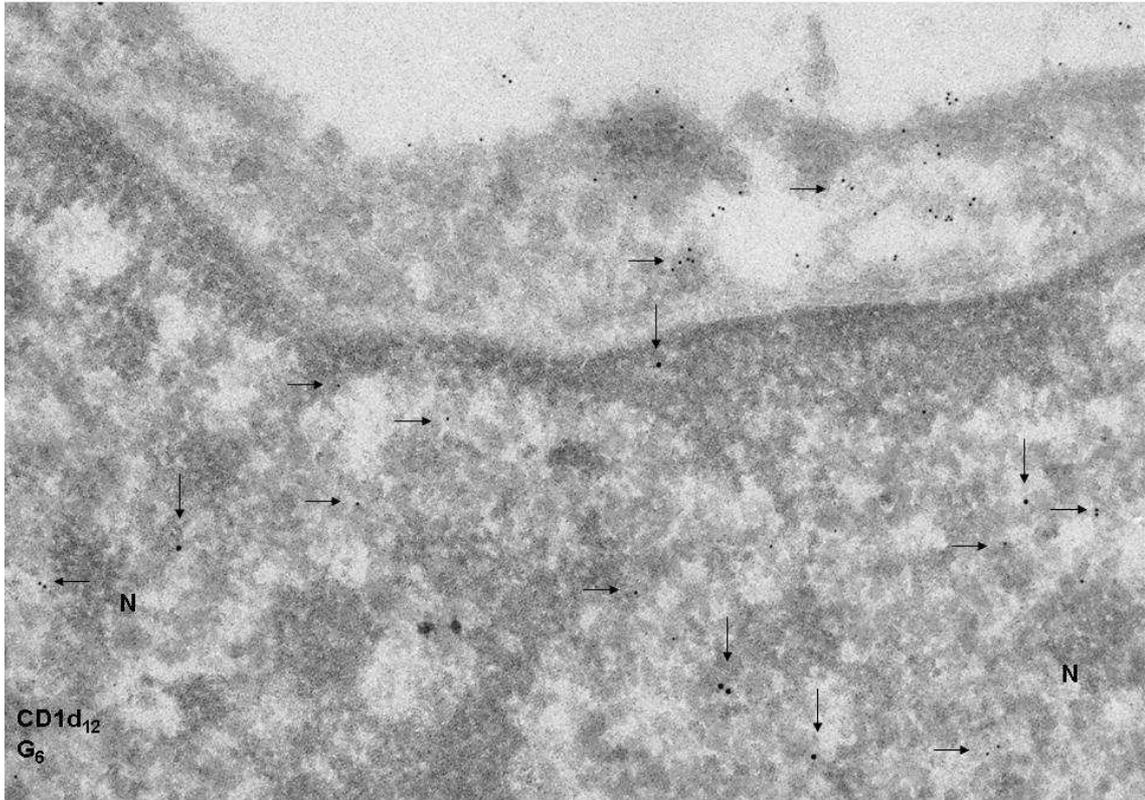


Abbildung 3.16b

Kolokalisierung von Cd1d und Gliadin im Zellkern eines RACE-Enterozyten bei einem Zöliakiepatienten

Immunelektronenmikroskopie mit Gliadin und CD1d aus einer Duodenalbiopsie eines Zöliakiepatienten: Ausschnittvergrößerung aus einem RACE-Enterozyten,

Vergrößerungsfaktor 1:35400

Senkrechte Pfeile: CD1d

Waagerechte Pfeile: Gliadin

N: Zellkern

Wie bereits in einem vorhergehenden Kapitel erwähnt, zeigt sich bei einem Teil der Zöliakiepatienten eine deutliche Kolokalisierung von Gliadin und CD1d im Zellkern von RACE-Enterozyten (Abb. 3.16b). Diese Kolokalisierung auf den Zellkernen von RACE-Enterozyten lässt sich in der Elektronenmikroskopie außer bei Zöliakie-Patienten nur noch bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa zeigen.

3.3.3 Gliadin auf Duodenalbiopsien von kranken Kontrollpatienten

Bei den kranken Kontrollpatienten war Gliadin nur in sehr geringer Markierungsdichte in normalen Enterozyten nachweisbar.



Abbildung 3.17

Gliadin ist bei kranken Kontrollen auf der apikalen Membran und in Vakuolen im Zytosplasma nachweisbar.

Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Patienten mit Colitis ulcerosa: Ausschnittvergrößerung aus einem normalen Enterozyten Vergrößerungsfaktor 1:17700.

L: Darmlumen

AM: Apikale Membran

M: Mitochondrium

Pfeil: Gliadin

In Abb. 3.17 ist Gliadin nur in sehr geringer Markierungsdichte auf der apikalen Membran zu erkennen. Das Zytosplasma und ebenfalls abgebildete Mitochondrien sind frei von Gliadin. In einem Vesikel unterhalb der apikalen Membran (Pfeil) sind zwei 6 nm-Goldpartikel zu erkennen, die Gliadin anzeigen.

3.3.4 Gliadin auf Duodenalbiopsien von gesunden Kontrollen

Bei Kontrollpatienten ist Gliadin in normalen Enterozyten ebenfalls nicht im Zytoplasma nachweisbar. Es zeigt sich in geringer Markierungsdichte auf der apikalen Membran und in Vakuolen der Enterozyten.

In Abb. 3.18 sind auf der apikalen Membran CD1d und Gliadin zu erkennen. Das darunterliegende Zytoplasma ist frei von Gliadin, es zeigt sich etwas CD1d.

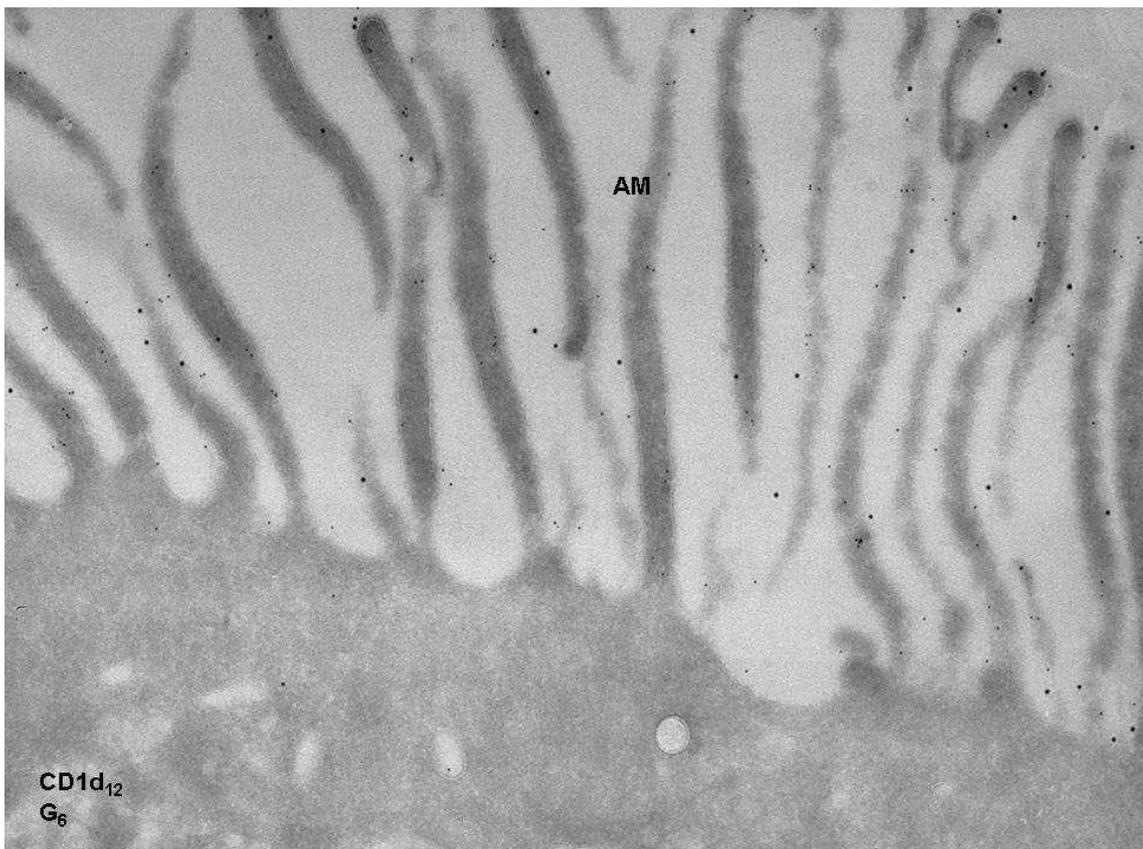


Abbildung 3.18

In normalen Enterozyten gesunder Kontrollen ist kein Gliadin nachweisbar.
Immunelektronenmikroskopie mit CD1d und Gliadin aus einer Duodenalbiopsie eines Kontrollpatienten: Ausschnittvergrößerung aus einem normalen Enterozyten, Vergrößerungsfaktor 1:17700.

AM: Apikale Membran

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

CD1d ist in normalen Enterozyten von Zöliakie-Patienten auf der apikalen und der basolateralen Membran, sowie im Golgi-Apparat nachweisbar.

In RACE-Enterozyten von Zöliakie-Patienten zeigt sich CD1d auf der apikalen und der basolaterale Membran als auch im Golgi-Apparat. Darüber hinaus auch im Zytoplasma und in Zellkernen.

Eine Kolokalisierung von Gliadin und CD1d in RACE-Enterozyten bei Zöliakie-Patienten zeigt sich auf der apikalen und basolateralen Membran und in Zellkerne. Eine solche Kolokalisierung war bei 5 der 16 untersuchten Zöliakie-Patienten festzustellen (31%). Bei 3 Patienten zeigte sich die Kolokalisierung sowohl in der Elektronenmikroskopie, als auch in der Immunfluoreszenz, bei 2 Patienten jeweils nur in einer der Methoden. Insgesamt waren RACE-Zellen in unserer Untersuchung bei den Zöliakie-Patienten in sehr schwankender Häufigkeit festzustellen, sie variierte in der Immunfluoreszenzmikroskopie zwischen 0/100 normale Enterozyten und 15/100 normale Enterozyten.

Bei den kranken Kontrollen war auf normalen Enterozyten eine ähnliche Verteilung von CD1d zu finden wie bei Zöliakie-Patienten. Die Zellkerne zeigten auch hier nur eine unspezifische Markierung. RACE-Zellen waren hier in ähnlicher Häufigkeit wie bei den Zöliakiepatienten zu finden. Eine eindeutige Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern eines RACE-Enterozyten zeigt sich bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa.

Die Verteilung von CD1d auf Enterozyten gesunder Kontrollen ähnelt der bei den kranken Kontrollen, RACE-Zellen waren hier vereinzelt nachweisbar.

4 Diskussion

4.1 Verteilung von CD1d in Enterozyten

Mehrere zurückliegende Arbeiten zeigen, dass das nichtklassische MHC-Klasse-I-Molekül CD1d auf intestinalen Epithelien exprimiert wird und die Expression bei verschiedenen zugrundeliegenden Erkrankungen deutlich variiert. (Canchis, Bhan et al. 1993; Balk, Burke et al. 1994; Perera, Shao et al. 2007) In der vorliegenden Arbeit zeigen sich Ergebnisse, die zum Teil mit denen der Voruntersuchungen übereinstimmen, sich in einigen Punkten aber auch unterscheiden.

Die Rolle von CD1d in der Regulation der Antigenpräsentierung durch Enterozyten ist noch ungeklärt. In Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es bei verschiedenen Erkrankungen und auch bei gesunden Kontrollen Klone CD1d-restringierter T-Lymphozyten in intestinalen Epithelien gibt. (Balk, Ebert et al. 1991; Balk, Burke et al. 1994) Auch konnte nachgewiesen werden, dass CD1d wichtig für die Interaktion zwischen CD8-positiven Lymphozyten und intestinalen Epithelien ist. (Panja, Blumberg et al. 1993). Untersuchungen mit Infektionserregern zeigten eine Kolo-kalisierung von Strukturen der Chlamydien mit CD1d auf dem ER uteriner Epithelzellen, was als Hinweis auf eine Antigenpräsentierung intrazellulärer Antigene unter Beteiligung nichtklassischer MHC-Klasse-I-Moleküle interpretiert wurde. (Giles and Wyrick 2008)

CD1d ist in der Lage sehr verschiedene Liganden, vorwiegend Lipide, aber auch andere Moleküle zu präsentieren. Es ist sowohl eine Präsentation gegenüber NKT-Zellen, als auch eine Stimulation von T-Suppressor-Zellen bekannt. (Brutkiewicz 2006) In intestinalen Epithelien ist CD1d nicht in der Lage Glykolipide zu präsentieren, kann aber über Endosome mit Antigenen in MHC-Klasse-II-positiven Kompartimenten in Kontakt kommen.

Die Lokalisierung des nichtklassischen MHC-Klasse-I-Moleküls CD1d auf normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten gleicht in der vorliegenden

Promotionsarbeit der Verteilung bei kranken und gesunden Kontrollpatienten. CD1d ist auf normalen Enterozyten auf der apikalen Membran, der basolateralen Membran und auf dem Golgi-Apparat nachweisbar. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch die Untersuchung der Arbeitsgruppe von Blumberg an der Harvard Medical School: CD1d kann mit immunologischen Methoden auf der apikalen und der lateralen Membran intestinaler Epithelzellen von Dünn- und Dickdarm nachgewiesen werden. Die Autoren interpretieren die Lokalisation des Moleküls als „ideale Position“ für Prozesse, die das Sammeln luminaler Antigene, ihre Prozessierung und die Antigenpräsentation gegenüber lokalen intraepithelialen Lymphozyten beinhalten. (Somnay-Wadgaonkar, Nusrat et al. 1999)

In einer Arbeit von Perera et al. wurde die Expression verschiedener nichtklassischer MHC-Klasse-I-Moleküle (Cd1d, MICA und HLA-E) bei erwachsenen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Hier hatte sich bei der Untersuchung von intestinalen Epithelien aus Dünn- und Dickdarm mit immunologischen und molekularbiologischen Methoden gezeigt, dass die Expression der untersuchten Moleküle sich deutlich von Enterozyten Gesunder unterscheidet. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war die Expression von CD1d, MICA/B und HLA-E reduziert. Bei Patienten mit M. Crohn exprimierten die Enterozyten HLA-E und MICA/B, aber kein CD1d. (Perera, Shao et al. 2007)

Im Gegensatz hierzu konnte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv von nur 4 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen CD1d sowohl bei Patienten mit M. Crohn, als auch mit Colitis ulcerosa auf intestinalen Epithelzellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine spezifische Markierung hier nur im Bereich des Golgi-Apparates, der basolateralen und der apikalen Membran, nicht aber im Bereich der Zellkerne. Mögliche Erklärungen für die abweichenden Ergebnisse wären unterschiedliche Spezifitäten der eingesetzten Antikörper oder die unterschiedliche Erkrankungsdauer von Erwachsenen mit entzündlichen

Darmerkrankungen gegenüber Kindern und Jugendlichen. Die eingesetzten Methoden in der vorliegenden Promotionsarbeit unterscheiden sich jedoch erheblich von denen in der Arbeit von Perera et al., die mit Durchflusszytometrie und dem Nachweis der m-RNA mittels RT-PCR arbeiteten. Daher könnten methodisch bedingt intrazelluläre Antikörperbindungsstellen (z.B. im Golgi-Apparat) in der Kryoelektronenmikroskopie, die in der Studie von Perera et al. nicht zur Verfügung stand, deutlicher in Erscheinung treten.

Die Autoren der Studie von Perera et al. hatten die fehlende Expression von CD1d, MICA und HLA-E als ein Versagen der Aktivierung von durch nichtklassische HLA-Klasse-I-Moleküle restringierten regulatorischen T-Lymphozyten interpretiert. Weiterhin vertreten die Autoren die Auffassung, dass dieses Versagen ein wichtiger Schritt in der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist.

Bei der Lokalisierung von CD1d auf den Zellkernen normaler Enterozyten zeigte sich weder bei Zöliakiepatienten, noch bei kranken oder gesunden Kontrollen eine spezifische Markierung.

Die Lokalisierung nichtklassischer MHC-Klasse-I-Moleküle in RACE-Enterozyten wurde bislang nicht untersucht. Auch ist bisher nicht geklärt, ob die RACE-Zellen bestimmte immunologische oder physiologische Funktionen erfüllen. Da ihre Zahl in entzündeter Schleimhaut höher ist, als in gesunden Epithelien, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Zelltyp entweder als Folge einer Entzündungsreaktion vermehrt gebildet wird oder an der Entstehung der Entzündungsreaktion beteiligt ist. Die Beschreiber dieser Zellpopulation konnten mit Hilfe des Markers Caspase-3 zeigen, dass es sich bei den RACE-Zellen nicht um apoptotische Zellen handelt. (Schurmann, Bruwer et al. 1999; Kersting, Bruwer et al. 2004)

Die Präsentation exogener Antigene zusammen mit MHC-Klasse-I-Molekülen gegenüber T-Lymphozyten wird als "Cross-Presentation" bezeichnet. (Jondal, Schirmbeck et al. 1996) Die Rolle, die diese Form der Antigenpräsentierung im Rahmen der Entwicklung oder des Verlusts

einer oralen Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen spielt, ist bislang noch unklar.

Eine wesentliche Voraussetzung der Präsentation exogener Antigene gegenüber MHC-Klasse-I restringenten Lymphozyten ist in jedem Fall das Vorliegen des Antigens im Zytosol der Antigenpräsentierenden Zelle. In der vorliegenden Untersuchung konnte CD1d auch in RACE-Enterozyten nachgewiesen werden, sowohl bei Zöliakiepatienten, als auch bei kranken Kontrollen. Es zeigte sich eine Lokalisierung des Moleküls auf der apikalen und der basolateralen Membran, sowie in geringer Menge im Zytoplasma der Zellen. Auch auf dem Zellkern von RACE-Zellen war CD1d nachweisbar, was bei normalen Enterozyten der untersuchten Patientengruppen nicht der Fall war. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine Präsentation von Antigenen aus dem Zytosol sein, die durch CD1d reguliert wird.

In einer Untersuchung der Pariser Arbeitsgruppe von Sophie Hue konnte nachgewiesen werden, dass bei Zöliakie durch Gliadin, speziell das toxische Peptid 31-49, eine Induktion der Expression des nichtklassischen MHC-Klasse-I-Moleküls MICA erfolgt. Eine Interaktion mit dem NKG2D-Rezeptor natürlicher Killerzellen könnte sowohl über Kostimulation, wie auch über direkte Aktivierung CD8-positiver T-Zellen zur zytotoxischen Antwort und damit zur Zottenatrophie führen. (Hue, Mention et al. 2004) CD1d gehört wie MICA zu den nichtklassischen MHC-Klasse-I-Molekülen. Das Gen für CD1d liegt auf Chromosom 1, das MICA codierende Gen auf Chromosom 6, Homologien sind bislang nicht berichtet worden.

Die Expression von MICA wird allgemein durch zellulären Stress induziert, auch bei Hitzeschock wird die Expression hochreguliert. (Perera, Shao et al. 2007)

4.2 Lokalisierung von Gliadin in Enterozyten

Ein geringer Anteil mit der Nahrung aufgenommener Proteine erreicht die Dünndarmschleimhaut in nativem Zustand. Moleküle von der Größe des Gliadin müssen aktiv endozytiert werden, um das Zellinnere eines

normalen Enterozyten zu erreichen. Ein parazellulärer Transport über „tight junctions“ ist bei intakter intestinaler Barriere ausgeschlossen.

Bei den Kontrollgruppen ist Gliadin nur auf der apikalen Zellmembran und in Vakuolen im Zellinneren nachweisbar. Hier unterscheiden sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht von vorangegangenen Untersuchungen.

Auf normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten kann Gliadin ebenfalls auf der apikalen Membran und in Vakuolen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Dieses Resultat entspricht denen früherer Untersuchungen zum Transport von Gliadin in Enterozyten, Es hatte sich mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen Gliadin gezeigt, dass Gliadin nach der Aufnahme in die Zelle in Vakuolen nachweisbar ist, die sowohl positiv für Cathepsin D, einen Marker für späte Endosomen, als auch für das MHC-Klasse-II-Antigen HLA-DR sind. Hiermit hatte sich die Hypothese einer Antigenpräsentation exogener Antigene durch Enterozyten als nichtprofessionelle antigenpräsentierende Zellen weiter untermauern lassen. Diese Eigenschaft schien zunächst spezifisch für Gliadin zu sein, eine Kollokalisierung von Ovalbumin mit HLA-DR zeigte sich zunächst nicht. (Zimmer, Poremba et al. 1995; Zimmer, Naim et al. 1998) In weiteren Untersuchungen zur Induktion oraler Toleranz konnte jedoch gezeigt werden, dass Ovalbumin nach oraler Aufnahme bei immunkompetenten Mäusen schnell in späte Endosomen gelenkt wird, die positiv für das Protein LAMP-1 sind und auch MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten. Bei SCID (**S**evere **C**ombined **I**mmuno **D**eficiency)-Mäusen war das nicht der Fall. Aus dieser Beobachtung folgerten die Autoren, dass die Lenkung dieses exogenen Antigens in den Enterozyten eine wichtige Voraussetzung für die Induktion einer oralen Toleranz ist. (Zimmer, Buning et al. 2000) Es blieb aber weiter unklar, auf welche Weise die Präsentation exogener Antigene durch Enterozyten entweder zur Toleranzinduktion führt oder eine zytotoxische Reaktion induziert wird. Später konnte nachgewiesen werden, dass auf den Vakuolen und dem Golgi-Apparat von Enterozyten Gliadinpeptide, CD8, der α/β - und γ/δ - T-

Zell-Rezeptor lokalisiert sind. (Zimmer, Naim et al. 1998) Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Aufnahme und Lenkung der Moleküle in den Enterozyten ein Schritt in der Pathogenese der Zöliakie ist.

In aktuellen Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe die Aufnahme des Gliadins und die Auftrennung der verschiedenen Gliadinpeptide weiter aufklären. Es wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die bestimmte (toxische) Aminosäuresequenzen im Gliadin erkennen, und mit synthetischen Gliadinpeptiden in Biopsien und Zellkulturmodell nachgewiesen, dass das toxische Gliadin-Peptid AA31-49 einen anderen Weg im endosomalen Pfad nimmt als das immunodominante Gliadinpeptid AA56-68 und das inerte Gliadinpeptid AA229-246. Das Peptid AA31-49 erreicht nicht die HLA-DR-positiven späten Endosomen in Enterozyten von Zöliakiepatienten. Es kann in frühen Endosomen lokalisiert werden, wird aber nicht wie die anderen untersuchten Peptide an der basolateralen Membran präsentiert. Daher, folgern die Autoren, kommt keine Induktion einer Toleranz zustande. Durch eine Konjugation des Peptids an Cholera-Toxin B ist jedoch eine Lenkung in HLA-DR-positive Endosomen möglich. Hier eröffnet sich vielleicht ein viel versprechender Ansatz, entweder prophylaktisch oder therapeutisch eine Toleranz gegen Gliadin zu induzieren. (Zimmer 2008)

In der vorliegenden Arbeit kann, wie in den Untersuchungen von Kersting et al., eine Aufnahme eines exogenen Antigens in das Zytoplasma von einer speziellen Population von Enterozyten nachgewiesen werden. Diese RACE-Enterozyten sind in unseren Untersuchungen sowohl bei Zöliakiepatienten, als auch bei kranken Kontrollen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisbar gewesen. Diese Zellen zeigen sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der Immunelektronenmikroskopie viel Gliadin im Zytoplasma. Auch auf dem Zellkern der RACE-Enterozyten können die aufgenommenen exogenen Antigene nachgewiesen werden. Die besondere Bedeutung der RACE-Zellen für die Pathogenese der Zöliakie liegt unter anderem in dem

eigentlich untypischen Vorliegen des exogenen Antigen Gliadin im Zytoplasma. Dieses exogene Antigen wird hierdurch dem Endozytose-Pfadweg entzogen und gelangt hierdurch nicht in jedem Fall in eine HLA-DR positive Umgebung, die zu einer Toleranzinduktion führen könnte. Wie frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, führt eine Gliadinexposition von Enterozyten von Zöliakiepatienten und Zellen der Kulturlinie HT 29 zu einer verstärkten Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen. (Fischer 2007)

4.3 Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern von RACE-Enterozyten bei Zöliakiepatienten

In den letzten Jahren ist die strikte Trennung zwischen dem exogenen Weg der Antigenpräsentation via MHC-Klasse-II-Molekülen und dem endogenen Weg in Anwesenheit von MHC-Klasse-I-Molekülen immer weiter aufgehoben worden. In vielen Arbeiten konnte für sehr unterschiedliche Arten Antigen-präsentierender Zellen gezeigt werden, dass ein weiterer Weg existiert, bei dem exogene Antigene unterschiedlicher Herkunft, wie Nahrungsmittelantigene oder Proteine, die im Rahmen angeborener Stoffwechselerkrankungen über den endosomalen Pfadweg in die Zellen gelangen, gegenüber MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Diese "Cross-Presentation" exogener Antigene gegenüber MHC-Klasse-I-Molekülen führt möglicherweise zur Aktivierung CD8-positiver Lymphozyten und NKT-Zellen. (Jondal, Schirmbeck et al. 1996; Hundorfean, Zimmer et al. 2007; Boes, Stoppelenburg et al. 2009) Besonders im Fall verschiedener Nahrungsmittelantigene ist bisher nicht sicher geklärt, wie das Antigen dem endosomalen Pfadweg entgeht oder ihn nur unvollständig durchläuft. Untersuchungen einer Arbeitsgruppe aus Norwegen und den USA zeigen, dass Gliadin aufgrund seiner Struktur sehr stabil gegenüber den üblichen Schritten zur Antigenprozessierung im Darmlumen und durch Antigenpräsentierende Zellen ist und daher besonders günstige

Vorraussetzungen für die Antigenpräsentation durch HLA DQ2 von dendritischen Zellen der Lamina propria bietet. (Qiao, Sollid et al. 2009) Aber auch andere Liganden werden endozytiert und werden dann nicht weiter über Endosomen zum Lysosom transportiert, sondern über das Cytosol zum endoplasmatischen Retikulum. Das konnte zum Bespie für bestimmte Viren nachgewiesen werden(Kartenbeck, Stukenbrok et al. 1989), wie auch Shiga-Toxin, Ricin und Cholera-Toxin.(Moore, Carbone et al. 1988; Tarrago-Trani and Storrie 2007). Viele Arbeiten zeigten, dass „ER-Stress“ die gemeinsame Folge vieler verschiedener Reize wie Hitzeschock, Virusreplikation, Hypoxie oder abnormaler Proteine im ER ist. Es konnte gezeigt werde, dass hierdurch die MHC-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentierung und damit auch die Erkennung durch CD8-positive T-Lymphozyten deutlich verändert wird.(Granados, Tanguay et al. 2009) In der vorliegenden Studie wurde die Lokalisierung von Gliadin und CD1d in normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten und RACE-Enterozyten vergleichend untersucht. Bei einem Teil der Zöliakiepatienten konnte mit beiden eingesetzten Methoden, bei einem anderen Teil nur mit einer der Methoden eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern der RACE-Enterozyten nachgewiesen werden. Auf allen identifizierbaren RACE-Enterozyten wurde eine Kolokalisierung von CD1d und Gliadin auf dem Zellkern. festgestellt.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur werten wir diese Kolokalisierung von Gliadin und CD1d als einen Hinweis auf eine “Cross-Presentation” des exogenen Antigens Gliadin unter Beteiligung des nichtklassischen MHC-Klasse-I-Moleküls CD1d. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung der TAP Lokalisation in RACE-Zellen (s. Seite 9, Einleitung) unterstützt.

Die funktionelle Bedeutung dieser Form der Antigenpräsentation ist auch für die Zöliakie bislang nicht sicher geklärt. Es ist durchaus möglich, dass dieser Transportprozess passiv im Rahmen eines Zelluntergangs zustande kommt. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass über den Weg der “Cross-Presentation” des Gliadins eine zytotoxische Antwort durch CD8-

positive T-Lymphozyten und NKT-Zellen induziert wird. (Mazzarella, Stefanile et al. 2008) Die Rolle des CD1d hierbei ist ebenfalls bislang nicht geklärt. Untersuchungen der sehr unterschiedlichen von CD1d präsentierten Antigene haben gezeigt, dass die Art der Antwort - Aktivierung eines NKT-Zell-Klons oder Stimulation anderer T-Zellsubpopulationen auch von der Struktur des Antigens abhängen. (Brutkiewicz 2006) Bei den meisten hier untersuchten Antigenen handelte es sich um Lipide, es konnte aber auch gezeigt werden, dass nach Induktion zytotoxischer Lymphozyten gegen Ovalbumin diese durch Antikörper gegen CD1d inaktiviert werden können.

Da die Präsentation des „toxischen“ Gliadin-Peptides AA31-49 in MHC-II-positiven späten Endosomen mit HLA-DR einen Toleranz induzierenden Effekt zu haben scheint, ist zu vermuten, dass die Kreuz-Präsentierung des Gliadins aus RACE-Enterozyten mit dem Zytotoxizität induzierenden CD1d, ähnlich wie das Molekül MICA (Hue, Mention et al. 2004) einen wichtigen Schritt der Pathogenese der Zöliakie darstellt. Auch ein tolerogener Effekt wäre denkbar, da es aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe Hinweise gibt, dass bei Zöliakiepatienten ein Mechanismus für die Aufnahme von CD8, den $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor und den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor besteht. (Zimmer, Naim et al. 1998) Untersuchungen einer Arbeitsgruppe aus New York zeigten dass eine Subpopulation der CD8-positiven Lymphozyten, die den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor tragen, auch eine immunregulierende Wirkung hat. (Bhagat, Naiyer et al. 2008)

4.4 Perspektiven

Die vorliegende Untersuchung eröffnet weitere Fragen zu der Rolle von CD1d auf der einen Seite und RACE-Enterozyten auf der anderen Seite bei der Pathogenese der Zöliakie. Besonders interessant in diesem Zusammenhang wäre es, weiter zu untersuchen, warum die Kolo-kalisierung von CD1d und Gliadin nur bei einem Teil der Zöliakiepatienten gelang und in welchen weiteren Merkmalen sich die Gruppen unterscheiden.

Hier könnte auch z. B. die Verteilung des nichtklassischen Moleküls MICA untersucht werden, dessen Rolle bei der Entstehung der Zottenatrophie vorbeschrieben ist (s. o.).

Auch sollte die Verteilung der verschiedenen Gliadin-Peptide (AA 31-49; AA56-68; AA229-246) in Biopsien von Patienten mit unbehandelter Zöliakie zusammen mit CD1d weiter beleuchtet werden. Möglicherweise ist hierdurch die Rolle von CD1d in der Antigenpräsentation und damit in der Pathogenese weiter aufzuklären.

Ob ein CD1d-Antikörper oder eine gezielte Lenkung einer CD1d-restringierten Immunreaktion eine therapeutische Rolle bei der Zöliakie oder bei anderen Erkrankungen spielen kann muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7 Literaturverzeichnis

- 1.) **Balk, S. P., S. Burke, et al.** (1994). "Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium." *Science* 265(5169): 259-62.
- 2.) **Balk, S. P., E. C. Ebert, et al.** (1991). "Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes." *Science* 253(5026): 1411-5.
- 3.) **Bhagat, G., A. J. Naiyer, et al.** (2008). "Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease." *J Clin Invest* 118(1): 281-93.
- 4.) **Biagi, F., K. P. Zimmer, et al.** (1999). "Is gliadin mispresented to the immune system in coeliac disease? A hypothesis." *QJM* 92(2): 119-22.
- 5.) **Blumberg, R. S., D. Gerdes, et al.** (1995). "Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins." *Immunol Rev* 147: 5-29.
- 6.) **Boes, M., A. J. Stoppelenburg, et al.** (2009). "Endosomal processing for antigen presentation mediated by CD1 and Class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction." *Immunology* 127(2): 163-70.
- 7.) **Braciale, T. J. and V. L. Braciale** (1991). "Antigen presentation: structural themes and functional variations." *Immunol Today* 12(4): 124-9.
- 8.) **Brutkiewicz, R. R.** (2006). "CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly." *J Immunol* 177(2): 769-75.
- 9.) **Canchis, P. W., A. K. Bhan, et al.** (1993). "Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d." *Immunology* 80(4): 561-5.

- 10.) **ESPGHAN** (1990). "Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition." *Arch Dis Child* 65(8): 909-11.
- 11.) **Fischer, I.** (2007). *Intrazelluläre Transportprozesse zur Pathogenese der Zöliakie in epithelialen Zelllinien des Darms.* Naturwissenschaftliche Fakultät. Hannover, Gottfried Wilhelm Leibnitz Universität Hannover. Dr. rer. nat.
- 12.) **Giles, D. K. and P. B. Wyrick** (2008). "Trafficking of chlamydial antigens to the endoplasmic reticulum of infected epithelial cells." *Microbes Infect* 10(14-15): 1494-503.
- 13.) **Granados, D. P., P. L. Tanguay, et al.** (2009). "ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides." *BMC Immunol* 10: 10.
- 14.) **Griffiths, G. and H. Hoppeler** (1986). "Quantitation in immunocytochemistry: correlation of immunogold labeling to absolute number of membrane antigens." *J Histochem Cytochem* 34(11): 1389-98.
- 15.) **Hoffmann, J. C., J. C. Preiss, et al.** (2008). "[Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]." *Z Gastroenterol* 46(9): 1094-146.
- 16.) **Hoffmann, J. C., M. Zeitz, et al.** (2004). "[Diagnosis and therapy of ulcerative colitis: results of an evidence based consensus conference by the German society of Digestive and Metabolic Diseases and the competence network on inflammatory bowel disease]." *Z Gastroenterol* 42(9): 979-83.
- 17.) **Holtmeier, W., J. Henker, et al.** (2005). "[Definitions of celiac disease--statement of an expert group from the German Society for Celiac Disease]." *Z Gastroenterol* 43(8): 751-4.

- 18.) **Hue, S., J. J. Mention, et al.** (2004). "A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease." *Immunity* 21(3): 367-77.
- 19.) **Hundorfean, G., K. P. Zimmer, et al.** (2007). "Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(4): G798-808.
- 20.) **Jondal, M., R. Schirmbeck, et al.** (1996). "MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens." *Immunity* 5(4): 295-302.
- 21.) **Kartenbeck, J., H. Stukenbrok, et al.** (1989). "Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 2721-9.
- 22.) **Kaser, A., E. E. Nieuwenhuis, et al.** (2004). "CD1d-restricted T cell pathways at the epithelial-lymphocyte-luminal interface." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39 Suppl 3: S719-22.
- 23.) **Keller, K. M.** (2003). "Klinische Symptomatik: „Zöliakie, ein Eisberg“." *Monatsschr Kinderheilkd* 2003(151): 706-714.
- 24.) **Kersting, S., M. Bruewer, et al.** (2004). "Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases." *Am J Pathol* 165(2): 425-37.
- 25.) **Koning, F.** (2003). "The molecular basis of celiac disease." *J Mol Recognit* 16(5): 333-6.
- 26.) **Marsh, M.** (2000). *Celiac disease: methods and protocols.*
- 27.) **Mazzarella, G., R. Stefanile, et al.** (2008). "Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis." *Gastroenterology* 134(4): 1017-27.
- 28.) **Moore, M. W., F. R. Carbone, et al.** (1988). "Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation." *Cell* 54(6): 777-85.

- 29.) **Mothes, T.** (2007). "Deamidated gliadin peptides as targets for celiac disease-specific antibodies." *Adv Clin Chem* 44: 35-63.
- 30.) **Mukherjee, S., R. N. Ghosh, et al.** (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* 77(3): 759-803.
- 31.) **Panja, A., R. S. Blumberg, et al.** (1993). "CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions." *J Exp Med* 178(3): 1115-9.
- 32.) **Perera, L., L. Shao, et al.** (2007). "Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells." *Inflamm Bowel Dis* 13(3): 298-307.
- 33.) **Qiao, S. W., L. M. Sollid, et al.** (2009). "Antigen presentation in celiac disease." *Curr Opin Immunol* 21(1): 111-7.
- 34.) **Schurmann, G., M. Bruwer, et al.** (1999). "Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease." *Int J Colorectal Dis* 14(1): 41-6.
- 35.) **Somnay-Wadgaonkar, K., A. Nusrat, et al.** (1999). "Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form." *Int Immunol* 11(3): 383-92.
- 36.) **Tarrago-Trani, M. T. and B. Storrie** (2007). "Alternate routes for drug delivery to the cell interior: pathways to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum." *Adv Drug Deliv Rev* 59(8): 782-97.
- 37.) **Telega, G. W., D. C. Baumgart, et al.** (2000). "Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states." *Gastroenterology* 119(6): 1548-59.
- 38.) **Tonutti, E., D. Visentini, et al.** (2009). "Diagnostic efficacy of the ELISA test for the detection of deamidated anti-gliadin peptide antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease." *J Clin Lab Anal* 23(3): 165-171.

- 39.) **Zimmer, K. P., J. Buning, et al.** (2000). "Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes." *Gastroenterology* 118(1): 128-37.
- 40.) **Zimmer, K. P., H. Naim, et al.** (1998). "Targeting of gliadin peptides, CD8, alpha/beta-TCR, and gamma/delta-TCR to Golgi complexes and vacuoles within celiac disease enterocytes." *FASEB J* 12(13): 1349-57.
- 41.) **Zimmer, K. P., C. Poremba, et al.** (1995). "Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes." *Gut* 36(5): 703-9.
- 42.) **Zimmer, K. P. et al.** (2008). "Endocytotic Segregation of Gliadin Peptide 31-49 in Enterocytes " *Gut* accepted for Publication 05-27-2009.

6 Zusammenfassung

Die exakte Pathogenese der Zöliakie ist bislang trotz intensiver Forschung noch nicht geklärt. Verschiedene zurückliegende Arbeiten zeigten Hinweise auf eine Kreuzpräsentierung exogener Antigene mit MHC-Klasse-I-Molekülen gegenüber T-Lymphozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisierung von Gliadin und CD1d in Enterozyten aus Duodenalbiopsien von Gesunden, kranken Kontrollen und Zöliakie-Patienten untersucht. Hintergrund ist die Frage, welche Rolle das nichtklassische MHC-Klasse-I-Molekül CD1d bei der Kreuzpräsentierung spielt und wie Antigene vom exogenen Weg der Antigenpräsentierung zur Induktion einer (zytotoxischen) Immunreaktion im endogenen Weg gelangen.

Die Lokalisierung von CD1d und Gliadin wurde mittels konfokaler Laserimmunfluoreszenzmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie untersucht.

Hierbei zeigte sich CD1d in normalen Enterozyten von Zöliakiepatienten auf der apikalen Membran, der basolateralen Membran und auf dem Golgi-Apparat. In RACE-Enterozyten, einer speziellen Enterozytenpopulation, die exogene Antigene in das Cytosol aufnehmen, konnte darüber hinaus CD1d auch auf dem Zellkern nachgewiesen werden. Hier zeigte sich bei einem Teil der Zöliakiepatienten auch eine Kolo-kalisierung von CD1d und Gliadin.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur werten wir diese Kolo-kalisierung von Gliadin und CD1d als einen Hinweis auf eine "Cross-Presentation" des exogenen Antigens Gliadin unter Beteiligung des nichtklassischen MHC-Klasse-I-Moleküls CD1d.

Die funktionelle Bedeutung dieser Form der Antigenpräsentierung für die Pathogenese der Zöliakie ist bislang nicht geklärt und sollte weiter untersucht werden, insbesondere auch die Frage einer möglichen therapeutischen Rolle, die die Lenkung einer CD1d-restringierten Immunreaktion haben könnte.

7 Summary

In spite of intensive research throughout the last years, the exact pathogenesis of Celiac disease has not been explained completely. Recent investigations indicated a „cross-presentation“ of exogenous antigens with HLA-class-I-molecules to T-lymphocytes. In this study we investigated the localization of gliadin and CD1d in duodenal biopsies of healthy individuals, sick controls and patients with Celiac disease. The aim was to analyze the function of the nonclassical HLA-class-I-molecule CD1d in the process of cross-presentation of antigens, leading from a tolerance inducing way to a cytotoxic reaction.

The localization of CD1d and gliadin was examined using laser-immunofluorescence microscopy and immunoelectron microscopy.

CD1d could be localized in normal enterocytes of Celiac patients on the apical cellular membrane, on the basolateral membrane and on the Golgi apparatus. RACE-enterocytes are characterized by an increased rate of antigen transport into the cytosol. Here, also a co-localization of gliadin and CD1d could be detected in some of the Celiac patients.

Considering the current literature we conclude that this is suggestive of a “cross-presentation” of the exogenous antigen gliadin involving the non-classical MHC-class-I-molecule CD1d.

The functional implication of this kind of antigen presentation remains unclear and needs further investigation. Especially the question of a possible therapeutic impact of the direction of a CD1d-restricted immune reaction should be the subject of following studies.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Zimmer danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung und Unterstützung während der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Bettina Goritzka, Frau Larissa Thiessen und Frau Dr. Nelli Baal für die freundliche und engagierte Unterstützung im Labor bedanken.

Frau Imke Panzer danke ich herzlich für das Gegenlesen und die Korrektur der Arbeit.