

Charakterisierung der Funktion von NOD2/CARD15 für die bakterielle Translokation im Kolon bei Morbus Crohn

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(FB08: Biologie und Chemie)
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

vorgelegt von

Katrin Menzel

2007

Promotionsgesuch eingereicht am 04.10.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Michael Martin, Fachbereich 08, Justus-Liebig-Universität Giessen
Prof. Dr. rer. nat. Werner Falk, Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg

Gutachter:

1. Gutachter (1. Prüfer):	Prof. Dr. rer. nat. M. Martin
2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. rer. nat. W.Falk

Dissertation

durchgeführt von Februar 2004 bis Juli 2007
am Institut für Innere Medizin I der Universität Regensburg
unter Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. Michael Martin
FB08 (Biologie und Chemie) der Justus-Liebig-Universität Giessen

und

Prof. Dr. rer. nat. Werner Falk
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg

“Sein und Wissen ist ein uferloses Meer:
Je weiter wir vordringen, um so unermesslicher
dehnt sich aus, was noch vor uns liegt; jeder Triumph des
Wissens schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich“

Isaac Newton

Für meine Familie
In Gedenken an Papa

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin and biotinylated horseradish peroxidase complex</i>
AJ	<i>adherens junction</i>
APAF-1	apoptotic protease-activating factor-1
APC	<i>antigen presenting cell</i>
AS	Aminosäure
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid solution</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CATERPILLER	<i>CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding , pyrin, lots of leucin rich repeats</i>
cDNA	<i>complementary DNA, "copy DNA"</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CTSB	Cathepsin B
CTSD	Cathepsin D
CTSL	Cathepsin L
CU	Colitis ulcerosa
d	Tag
DAP	Diaminopimelinsäure
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DC	<i>dendritic cell</i>
DHR	Dihydrorhodamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	<i>Dextran Sodium Sulfate</i>
DTT	Dithiothreitol

EBD	Effektorbindedomäne
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FAM	5'-Carboxyfluorescein
FISH	Fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
IEZ	intestinale Epithelzellen
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I-κB	<i>inhibitor of nuclear factor- κB</i>
IKK	I-κB Kinase
IL	Interleukin
IMAC	intestinale Makrophagen
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LPMNZ	<i>Lamina Propria</i> mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
LRD	<i>ligand recognition domain</i> (Ligandenerkennungsdomäne)
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-dipeptid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)

ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
MZS	multizellulärer Sphäroid
NACHT	NAIP (<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>), CIITA (<i>MHC class II transcription activator</i>), HET-E (<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>) und TP1 (<i>telomeraseassociated protein</i>)
NADPH	Nikotinaminadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR-, and PYD-containing proteins</i>
NB-ARC	<i>nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, certain R gene products and CED-4</i>
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NCBI	Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen
NEAs	<i>non-essential amino acids</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDG	Peptidoglykan
PE	Phycoerythrin
Pep A	Pepstatin A
PP	Peyer'sche Plaques
PRR	<i>PAMP recognition receptor</i>
RFU	<i>relative fluorescent unit</i>
RICK	<i>RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffmetabolite)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TJ	<i>tight junction</i>

TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	<i>units</i>
ÜN	über Nacht
vs.	<i>versus</i>
WDR	WD40 <i>repeat(s)</i>
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	<i>Zona occludens</i> protein-1
μ	mikro (10^{-6})

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	7
Einleitung.....	1
1.1 Der humane Darm	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.2 Die Kolonmukosa.....	3
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.2.1 Morbus Crohn	4
1.2.2 Colitis ulcerosa.....	4
1.2.3 Einflüsse und Ursachen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	5
1.3 Die intestinale Barriere.....	7
1.3.1 Das intestinale Immunsystem	7
1.3.1.1 Immunhomöostase im gesunden Darm.....	7
1.3.1.2 Orale Toleranz	9
1.3.2 Zelluläre Integrität und epithelialer Zusammenhalt: Die Zell-Zell-Kontakte	10
1.3.2.1 Proteine der <i>Tight Junctions</i>	11
1.3.2.2 Proteine der <i>Adherens Junctions</i>	12
1.4 Die intestinale Mikroflora – Freund und Feind.....	13
1.5 CED - eine genetisch determinierte Dysregulation des GALT	14
1.5.1 Die zellulären Komponenten des intestinalen Immunsystems	15
1.5.2 Die sensorischen Komponenten des intestinalen Immunsystems	16
1.5.2.1 NOD2/CARD15.....	18
1.5.2.2 CIAS1/PYPAF1/Nalp3	24
1.5.3 Die CED-assoziierte Entzündung - ein multifaktorielles Geschehen.....	24
1.6 Zelluläre Proteinasen.....	27
1.6.1 Die Cysteinproteinasen Cathepsin B und Cathepsin L	28
1.6.2 Die Aspartat-Proteinase Cathepsin D.....	29
1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit	30
Material	32
2.1 Zellkultur	32

2.2	Isolierung humaner <i>Lamina propria</i> mononukleärer Zellen (LPMNZ)	33
2.3	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	33
2.4	Proteinbestimmung.....	33
2.5	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
2.6	<i>in vivo</i> Experimente	34
2.7	Verbrauchsmaterialien	34
2.8	Geräte	35
2.9	Fertigkombinationen von Biochemikalien	36
2.10	Oligonukleotide	37
2.10.1	Oligonukleotide für qualitative PCR	37
2.10.2	Oligonukleotide für <i>Real-Time</i> PCR	38
2.10.3	Oligonukleotide für Promoterklonierung	38
2.10.4	Sonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	38
2.11	Antikörper	39
2.12	Nährmedien und Antibiotika	41
2.13	Puffer und Lösungen	41
2.14	Reagenzien zur Messung der H ₂ O ₂ -Produktion	44
2.15	Größenstandards.....	44
2.16	Vektoren und Organismus	45
Methoden		46
3.1	Zellkultur	46
3.1.1	Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen	46
3.1.1.1	Isolierung humaner <i>Lamina propria</i> mononukleärer Zellen aus Resektaten ..	46
3.1.1.2	Isolierung von IMAC mittels magnetischer Zellsortierung	48
3.1.1.3	Isolierung von Monozyten aus Blut	49
3.1.1.4	Herstellung von multizellulären Sphäroiden (MZS).....	49
3.1.2	Zelllinien.....	49
3.2	RNA-Isolierung	50
3.2.1	polyA mRNA-Isolierung	50
3.2.2	Gesamt-RNA-Isolierung	51
3.3	Gelelektrophorese	52
3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	52
3.3.2	DNA-Isolierung aus Agarosegel	52
3.3.3	Diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)	52
3.4	DNA-Klonierung	53
3.5	Reinigung von Plasmid-DNA.....	56

3.6	Reverse Transkription - PCR (RT-PCR).....	56
3.7	<i>Real-Time</i> PCR (Taqman®).....	58
3.7.1	Prinzip.....	58
3.7.2	Datenanalyse	60
3.8	Sequenzierung	60
3.9	Durchflusszytometrie	60
3.10	Quantitative Proteinanalyse	62
3.10.1	BCA-Test	62
3.10.2	Zytokin-ELISA.....	62
3.10.3	Western Blot	63
3.10.5	Proteindetektion durch Chemilumineszenz.....	64
3.11	Immunhistochemische und immunfluoreszente Färbungen.....	65
3.11.1	Immunhistochemische Einzelfärbungen	65
3.11.2	Immunhistochemische und immunfluoreszente Doppelfärbungen.....	66
3.11.3	HE Färbung.....	68
3.12	Fluoreszente <i>In Situ</i> Hybridisierung	69
3.13	Transiente Transfektion und Stimulierung von HEK293T Zellen	69
3.14	Luziferase Assay	70
3.15	Bestimmung der Cathepsin-Aktivität im murinen Kolongewebe	70
3.16	Hemmung von CTSB, CTSD und CTSL <i>in vivo</i>	71
3.16.1	Tiermodell	71
3.16.2	Cathepsin-Hemmung <i>in vivo</i>	72
3.16.3	Histologischer Score	72
3.16.4	Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität.....	73
3.17	Messung der ROS-Produktion durch IMAC mit Dihydrorhodamin 123	73
3.18	Statistische Auswertung.....	74
Ergebnisse.....		75
4.1	Isolierung humaner intestinaler Makrophagen	75
4.2	Bakterielle Translokation und Wege der Überwindung der epithelialen Barriere im Krankheitsbild Morbus Crohn	76
4.2.1	Nachweis und Lokalisation bakterieller Translokation im intestinalen Gewebe	76
4.2.1.1	Der intestinale Mukus von MC-Patienten zeigt eine starke bakterielle Besiedelung.....	77

4.2.1.2	MC-Patienten zeigen im Gegensatz zu Kontrollpatienten eine starke NOD2/CARD15-Genotyp-spezifische Akkumulation bakteriellen Endotoxins.....	78
4.2.2	Paraepitheliale Überwindung der physikalischen Barriere durch Modifikationen der Zell-Zell-Kontakte.....	80
4.2.2.1	Epitheliale Zell-Zell-Kontakte sind im Krankheitsbild MC morphologisch unverändert	81
4.2.2.2	Die Menge funktionell essentieller Zell-Zell-Kontaktproteine ist im Darmepithel von MC-Patienten verändert.....	81
4.3	Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation des intrazellulären MDP-Sensorproteins NOD2/CARD15 und die intestinale Entzündung im Krankheitsbild Morbus Crohn	87
4.3.1	MDP induziert die Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors in vitro	87
4.3.2	MDP induziert die NOD2/CARD15 Genotyp-spezifische Aktivierung des NF-κB Signalweges in vitro	88
4.3.3	Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten kommt es zur NOD2/CARD15 Genotyp-assoziierten Aktivierung von NF-κB.....	90
4.3.4	Die Aktivität der NADPH-Oxidase ist in IMAC bei MC erhöht	93
4.4	Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation von Nalp3 und die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms	95
4.4.1	Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten kommt es zur Induktion von Nalp3	95
4.4.1.1	Nalp3 ist im intestinalen Gewebe bei MC erhöht.....	95
4.4.1.2	IEZ im gesunden Darm sind Nalp3-negativ	96
4.4.1.3	In entzündungsassoziierten IMAC sind sowohl Nalp3-mRNA als auch Nalp3-Protein verstärkt nachweisbar	98
4.4.2	Im entzündungsassoziierten intestinalen Gewebe kommt es zur Aktivierung des Nalp3 Inflammasoms.....	100
4.4.3	Nalp3 im dreidimensionalen multizellulären Sphäroidmodell	102
4.5	Die lysosomalen Proteinasen Cathepsin B, Cathepsin D und Cathepsin L in der Pathogenese der CED	105
4.5.1	Die bakterielle Zellwandkomponente MDP induziert CTSB und CTSL <i>in vitro</i>	105
4.5.2	Der CTSB- und CTSL mRNA-Gehalt ist in humanen entzündungsassoziierten IMAC erhöht	107
4.5.3	CTSB und CTSL Protein ist in humanen entzündungsassoziierten IMAC verstärkt nachweisbar.....	109

4.5.4	Die Hemmung der Cathepsin-Aktivität resultiert in einer verminderten Entzündungsreaktion im murinen DSS-Colitis-Modell <i>in vivo</i>	112
4.5.4.1	Die Cathepsine B, D und L sind im murinen Kolon aktiv	112
4.5.4.2	Die Hemmung von CTSD reduziert Colitis-typische Symptome	113
4.5.4.3	Die Blockierung von CTSB/CTSL reduziert Colitis-assoziierte Symptome ..	119
Diskussion.....		123
5.1	Isolierung humaner intestinaler Makrophagen	124
5.2	Bakterielle Translokation und Wege der Überwindung der epithelialen Barriere im Krankheitsbild Morbus Crohn	124
5.3	Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation des intrazellulären Sensorproteins NOD2/CARD15 und die intestinale Entzündung im Krankheitsbild Morbus Crohn.....	127
5.3.1	MDP induziert die Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors sowie des NF-κB Signalweges <i>in vitro</i>	127
5.3.2	Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten kommt es zur NOD2/CARD15 Genotyp-spezifischen Aktivierung von NF-κB.....	129
5.4	Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation von Nalp3 und die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms.....	132
5.5	Weitere NOD2/CARD15-abhängige Folgen der Aktivierung mit Einfluss auf die Entzündung	138
5.6	Pathogenetisches Modell.....	142
Zusammenfassung		145
Ausblick		148
Literaturverzeichnis.....		150
Anhang.....		166
Danksagung		169
Erklärung		171

Kapitel 1

Einleitung

Der humane Organismus ist permanent sowohl extern als auch intern einer großen Zahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Neben der mikrobiellen Besiedelung der Haut, der Mundhöhle, der Atemwege, des Urogenitaltrakts und des Magens stellt der Darm mit seinen komplexen Nährstoff- und Umweltbedingungen ein optimales Milieu für eine große und vielfältige Population von Mikroorganismen dar. Im gesunden Organismus steht der Darm mit einer Gesamtoberfläche, die zwei Tennisplätzen entspricht, mit dem luminalen Fäces mit einer Bakteriendichte von bis zu 10^{14} Bakterien pro Gramm in einem physiologischen Gleichgewicht [1-3], welches sowohl metabolische als auch (immun)regulatorische Funktionen erfüllt. Eine Störung dieses Gleichgewichts bildet neben genetischen Faktoren und Umweltfaktoren die Basis für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der bakteriellen Flora und invasiver Keime auf das Ausmaß der chronischen Darmentzündung untersucht und mögliche Signalwege der bakterienvermittelten Entzündungsantwort aufgedeckt.

1.1 Der humane Darm

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die gastrointestinale Mukosa stellt mit einer Oberfläche von 400 m² die größte Kontaktfläche des Körpers mit der Außenwelt dar [4]. Über diese Oberfläche, die 200 mal größer ist als die der Haut, muss der Darm permanent die Passage potentiell toxischer Stoffe und pathogener Mikroorganismen in den Wirt verhindern, aber die Aufnahme von Nährstoffen aus dem intestinalen Lumen in die Mukosa und die systemische Zirkulation

erlauben. Diese diffizilen Aufgaben spiegeln sich im Aufbau der Darmwand wider. Die Wand des Dünndarms und Dickdarms ist bis auf geringe Unterschiede aus vier konzentrischen Schichten aufgebaut (Abb. 1.1):

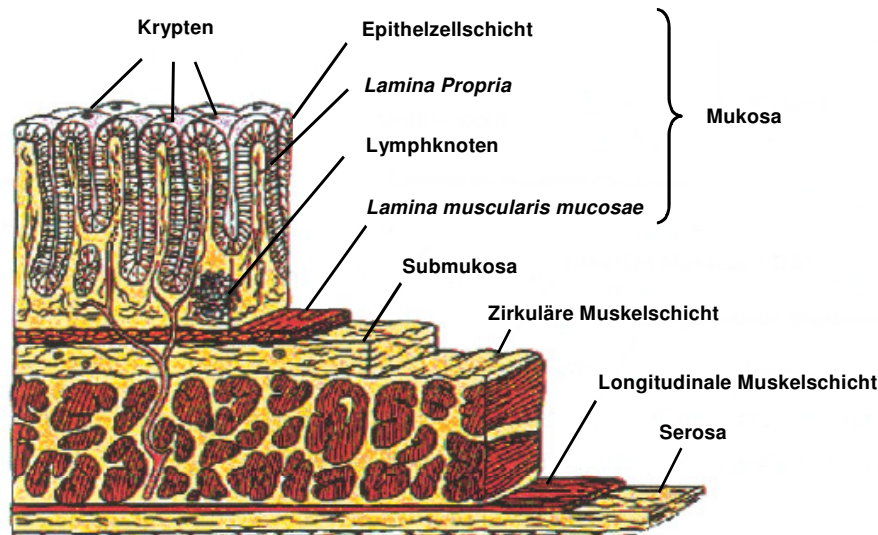


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Darmwand (adaptiert nach [5])

Das Darmlumen ist von einer spezialisierten Schleimhaut, der Mukosa, umgeben. Diese wird luminal von einer Schicht aus schleimbedeckten Epithelzellen begrenzt, welche die unregelmäßigen Gewebserhebungen, die Zotten, und die zwischen den Zotten liegenden Gewebseinsenkungen, die Krypten, auskleiden. Durch die durch Gewebserhebungen und – einsenkungen erzielte Oberflächenvergrößerung wird eine möglichst effiziente Verdauung und Absorption von Nährstoffen im Dünndarm sowie eine optimale Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts im Dickdarm sichergestellt. Das Gewebe unter der Epithelzellschicht, die *Lamina propria*, wird von Lymphgefäßen, Blutgefäßen und Nervenbahnen durchzogen. Im Bindegewebe der *Lamina propria* befinden sich hauptsächlich Fibroblasten, Lymphozyten und Makrophagen. Die vorherrschenden Strukturproteine im Darm sind Kollagene, welche von Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert werden. Die *Lamina propria* wird durch die *Muscularis mucosae* von der Submukosa getrennt. Die *Muscularis mucosae* ist eine etwa fünfzellige Schicht aus glatten Muskelzellen, die für die Darmmotilität von besonderer Bedeutung ist. Die Submukosa verbindet durch ihre lose Maschenwerkstruktur aus dünnen Kollagenfibrillen die Mukosa mit der *Muscularis propria* und ist von Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen. Unterhalb der Submukosa schließt sich eine Schicht aus Ringmuskulatur und Längsmuskulatur an. Die Darmwand wird durch die Serosa begrenzt,

die beim Dünndarm durch das Mesenterium an der hinteren Bauchwand befestigt ist (Mesenterialwurzel).

1.1.2 Die Kolonmukosa

Die dreischichtige Mukosa ist für die meisten physiologischen Funktionen des Darms verantwortlich. Die Mukosa des Dickdarms (Kolonmukosa) wird von einer einschichtigen Epithelzellschicht bedeckt. Die Zellen dieses Oberflächenepithels sind von einer protektiven Schleimschicht aus muzinösen Glykoproteinen, Phospholipiden und Lipidmediatoren überzogen und auf einer vom Stroma abgegrenzten Basalmembran fixiert. Sie kleiden das gesamte Darmlumen samt der Gewebseinsenkungen – der Krypten – aus (Abb. 1.1). Jede Krypte besteht aus etwa 250 Epithelzellen, wobei die tatsächliche Anzahl von der anatomischen Lage der Krypte abhängt [6]. Das Querschnittrelief der Kolonmukosa ist relativ flach und besitzt nur halbmondförmig ausgebildete Falten und Ausbuchtungen. Die Kolonmukosa ist durch eine exklusive Kriptenarchitektur, eine weitgehend parallele Anordnung der Krypten, ein becherzellreiches Epithel und ein leukozytenarmes Stroma gekennzeichnet. Das Oberflächenepithel besitzt einen Bürstensaum, der allerdings weit weniger ausgeprägt ist als im Dünndarm. Die Länge der Krypten nimmt von oral nach aboral hin zu [7].

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa stellen die klinisch-histologisch definierten Hauptformen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) dar [8;9]. Seit ihrer ersten Beschreibung vor etwa 75 Jahren konnte die Ätiologie beider CEDs trotz zahlreicher Studien bis heute nicht abschließend geklärt werden. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge liegt die jährliche Neuerkrankungsrate des Morbus Crohn (MC) bei 2 – 4 und der Colitis ulcerosa (CU) bei 3 – 9 Personen pro 100.000 Einwohner. Der Altersgipfel der Krankheitsmanifestation befindet sich zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr, wobei es zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr zu einem zweiten Anstieg der Neuerkrankungsrate kommt. Bei einer Prävalenz in Deutschland von 250-500/100.000 Einwohner leiden derzeit ca. 300.000 Bundesbürger an einer CED [10;11]. MC und CU unterscheiden sich durch eine Vielzahl klinischer und pathophysiologischer Veränderungen, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.2.1 Morbus Crohn

Beim MC kann sich die Entzündung über den gesamten Gastrointestinaltrakt von oral bis anal manifestieren. Die häufigste Lokalisation befindet sich im Dün- und Dickdarm (Abb. 1.2). Ein typisches Merkmal des MC ist die transmurale Entzündung der Darmwand, wobei im Gegensatz zur CU alle Wandschichten betroffen sein können. Charakteristisch bei MC ist weiterhin der segmentale Befall des Darms, die sogenannten diskontinuierlichen „*Skip-Lesions*“, mit abwechselnd gesunden und erkrankten Darmabschnitten. Die klinische Symptomatik ist sehr vielfältig und reicht von krampfartigen Bauchschmerzen bis zu rezidivierenden Diarrhöen mit bis zu 15 Stuhlgängen pro Tag, Fieber und Gewichtsverlust. Krankheitskomplizierend können extraintestinale Manifestationen wie Arthralgien, Erythema nodosum, Uveitis oder Iritis sowie Fistel- und Stenosenbildung auftreten, die häufig ein operatives Eingreifen erfordern, welches die Rezidivgefahr und Prognose allerdings nicht verbessert. Der Krankheitsverlauf ist chronisch schubweise. Eine Heilung der Erkrankung ist bisher nicht möglich; Therapie-Optionen zielen vorwiegend auf Immunsuppression und Remissionserhaltung ab.

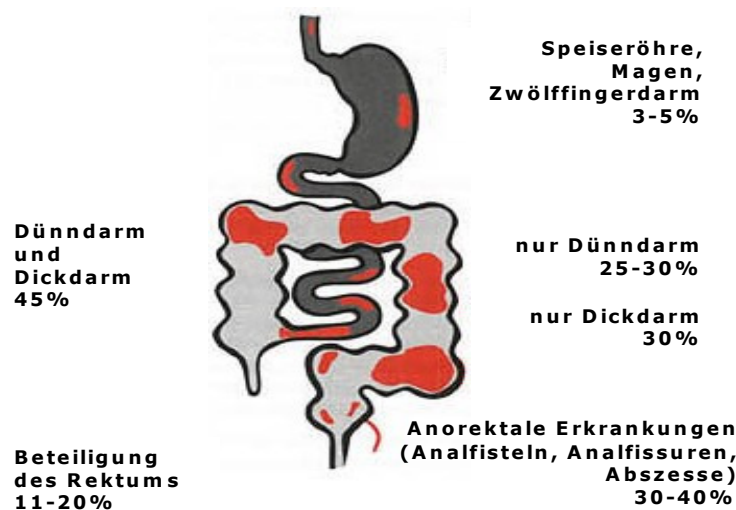


Abb. 1.2: Lokalisation des Morbus Crohn (Quelle: www.hdm-stuttgart.de).

1.2.2 Colitis ulcerosa

Bei der CU betrifft die Entzündung nur die Dickdarmmukosa, weshalb die Erkrankung auch als „mukosale Colitis“ bezeichnet wird. Die Entzündung beginnt dabei immer im Rektum. Sie kann auf das Rektum beschränkt bleiben, sich als klinisch linksseitige Colitis manifestieren oder sich kontinuierlich proximal über das gesamte Kolon ausbreiten (Abb.

1.3). Die klinische Symptomatik korreliert bei der CU mit dem Ausmaß der Entzündungsausbreitung. Die Erkrankung verläuft schubweise. CU-Patienten zeigen in Abhängigkeit von Aktivität und Ausdehnung des Krankheitsgeschehens blutig-schleimige Diarrhöen mit einer Frequenz von bis zu 40 Stuhlgängen/Tag, Fieber, Dehydratation und Gewichtsverlust. Extraintestinale Manifestationen der Erkrankung können ebenso wie beim MC auftreten. Eine lebensbedrohliche Komplikation stellt das toxische Megakolon dar. Nach mehr als 10jährigem Verlauf steigt das Risiko, ein Kolonkarzinom zu entwickeln. Durch Koloproktomie kann bei Versagen einer immunsuppressiven medikamentösen Therapie eine Heilung erzielt werden.

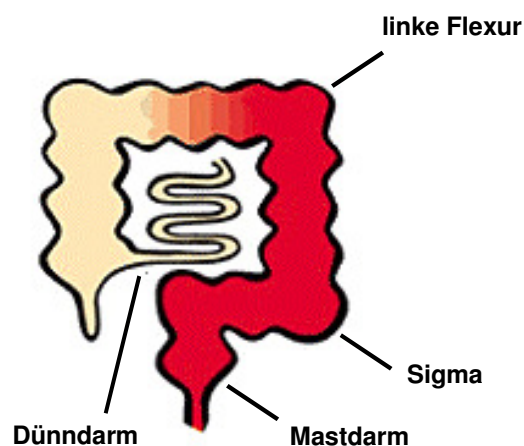


Abb. 1.3: Lokalisation der Colitis ulcerosa (Quelle: www.dccv.de).

1.2.3 Einflüsse und Ursachen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die Ätiologie der CED MC und CU ist bis heute nicht vollständig geklärt. Am ehesten sind beide Erkrankungen Folge eines multifaktoriellen Geschehens, da bisher keine Einzelursache nachgewiesen werden konnte. Wichtige Einflussparameter sind dabei Reaktionen auf Umwelteinflüsse, Störungen des Darmmilieus, eine Dysregulation intestinaler Immunreaktionen, sowie genetische Prädispositionen. Zusätzlich unterhalten Mechanismen, die eine bakterielle Invasion der Darmschleimhaut und Darmwand ermöglichen, die CED. Eine rein infektiöse Ursache, welche wiederholt in den letzten Jahren vermutet wurde, konnte bis heute nicht bestätigt werden und erscheint aufgrund der Heterogenität beider Erkrankungen auch unwahrscheinlich. Auch der psychosomatische Ansatz bietet allein keine kausale Erklärung.

Epidemiologie Die höchste Inzidenz der CED wird in Nordamerika und (Nord-) Europa beobachtet, während in Südamerika, Asien und Afrika wesentlich weniger Fälle vorkommen (allerdings mit steigender Tendenz) [12]. Zusätzlich zu den geografischen werden auch ethnische Unterschiede beobachtet: In den USA sind Kaukasier deutlich häufiger betroffen als Afro-Amerikaner, letztere wiederum häufiger als Asiaten [13;14].

Genetik Aus familiären Untersuchungen konnte als größter Risikofaktor sowohl für MC als auch CU eine positive Familienanamnese identifiziert werden [15-18]. MC-Patienten haben in 2,2–16,2% der Fälle einen Verwandten ersten Grades, der ebenfalls an MC leidet, das Risiko für Geschwister von MC-Patienten liegt sogar noch höher. CU-Patienten haben in 5,7–15,5% der Fälle einen an CU erkrankten Verwandten ersten Grades. Die Übereinstimmung in Krankheitstyp, Krankheitsmuster und Präsenz extraintestinaler Manifestationen beträgt 80%, 64% und 70% [19]. Konkordanzstudien an Zwillingen belegen ein 15- bis 35-fach erhöhtes Risiko für monozygote Geschwister von MC-Patienten (im Vergleich zur Normalbevölkerung) an MC zu erkranken [20;21]. Durch genomweite Untersuchungen ist es gelungen, zahlreiche Suszeptibilitätsregionen auf verschiedenen Chromosomen zu lokalisieren [22-25]. Der bisher überzeugendste Nachweis einer Assoziation mit CED wurde durch die Lokalisation des für NOD2 codierenden CARD15 Gens auf Chromosom 16 erbracht [26-28]. Neueren Untersuchungen zu Folge könnten Mutationen im NOD2/CARD15 Gen eine wichtige ätiopathogenetische Rolle bei MC spielen [29;30]. Kürzlich wurden weitere MC-assoziierte Gene identifiziert – OCTN (*organic cation transporter*) und DLG5 (*Drosophila melanogaster discs large homologue 5 gene*), deren Mutationen in einer gestörten epithelialen Permeabilität resultieren [23;24], sowie ATG16L-1 (*autophagy-related 16-like 1 gene*), IL-23R und PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) [31-33], deren Mutationen zu einer fehlerhaften Immunabwehr gegen Darmbakterien führen.

Umwelt Umwelteinflüsse wie Ernährungsgewohnheiten [34;35], Infektionen und Rauchen scheinen ebenfalls an der Entstehung von CED beteiligt zu sein [21;36;37]. Bei MC stellt Rauchen einen grossen Risikofaktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und das postoperative Rezidiv dar. Interessanterweise zeigte dagegen das Rauchen bei CU in mehreren Studien einen protektiven Effekt auf die Krankheitsmanifestation [21]. Durch das zunehmende Migrationsverhalten und die steigende Neuerkrankungsrate in den bisher gering prävalenten Gebieten wird vermutet, dass auch sozioökonomische Faktoren (Gesundheitswesen, Industrialisierung, sanitäre und hygienische Verhältnisse) einen Beitrag zur Ätiologie der CED leisten [38;39].

1.3 Die intestinale Barriere

Das intestinale Epithel stellt eine hochselektive Barriere dar, welche die Passage verschiedener Substanzen, wie z.B. H^+ -Ionen, chemotaktischer Peptide, potentiell antigen wirkender Proteine sowie von Bakterienbestandteilen und -produkten in den Wirt verhindert, aber die digestiv-resorptive Nahrungsassimilation erlaubt. Die Permeabilität der Barriere wird dabei von extrinsischen (mukosale Schleimschicht) und intrinsischen Komponenten (epitheliale Zell-Zell-Kontakte) erfüllt. Schleimhautschädigungen können, ebenso wie primäre Störungen der Epithelzellen oder der aus Muzinen gebildeten Schleimschicht, zu einem unphysiologischen Einstrom von Antigenen in die Darmwand führen und eine Entzündung auslösen oder verstärken. Entzündliche Prozesse werden hierbei durch engen Kontakt zwischen Epithelschicht und den Immunzellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes, welches das größte Immunorgan des Menschen darstellt, begünstigt [40].

1.3.1 Das intestinale Immunsystem

Die Komplexität der immunologischen und immunregulatorischen Aufgaben wird im Darm von einer Vielzahl spezialisierter Kompartimente übernommen, welche man in drei funktionelle Bereiche gliedern kann: (1) organisierte lymphatische Gewebe (subepitheliale lymphatische Follikel, Peyer'sche Plaques, mesenteriale Lymphknoten, Appendix); (2) freie lymphatische Zellen der *Lamina propria* und (3) intraepitheliale Lymphozyten. Die besondere Aufgabe des Darm-assoziierten Immunsystems (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) besteht im Aufbau einer effektiven Immunantwort mit dem Ziel der Neutralisation oder Eliminierung schädlicher Antigene (Immunität; 1.3.1.1) und gleichzeitig Verhinderung schädlicher Effekte auf körpereigene Gewebe durch eine immuntolerante Antwort (Toleranz; 1.3.1.2) auf harmlose Antigene (Nahrungsmittel, kommensale Darmflora).

1.3.1.1 Immunhomöostase im gesunden Darm

Ort der intestinalen Immunantwort ist die *Lamina propria*, in die gereifte B- und T-Zellen nach Induktion durch ein Antigen in den Peyer'schen Plaques (PP) wandern [41]. Zu Beginn einer Immunantwort werden luminale Antigene am „induktiven Ort“ endozytotisch über *Microfold* („M“) Zellen sowie nicht-professionelle und professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) transepithelial aufgenommen.

Nicht-professionelle APCs, wie intestinale Epithelzellen, können mit naiven T-Zellen (Th0) über *major histocompatibility complex* (MHC)-II Rezeptoren interagieren und in Abwesenheit von Entzündungen kostimulatorische Signale produzieren [42]. Dadurch wird in mukosalen T-Zellen Anergie induziert [43]. Professionelle APCs, wie Dendritische Zellen (DC), exprimieren ein vielfältiges Spektrum an *pattern recognition receptors* (PRRs) sowie nach Antigenaufnahme kostimulatorische Moleküle. Sie kontrollieren einerseits die Differenzierung naiver T-Zellen in Effektor-T-Zellen (Th1, Th2, Th17) und regulatorische T-Zellen (Tr, Th3), die im Rahmen einer adaptiven Immunantwort zur Bekämpfung von Pathogenen essentiell sind. Andererseits wird die angeborene Immunantwort u.a. mit der Aktivierung natürlicher Killer (NK)-Zellen unterstützt. Ein Teil der aktivierten T-Lymphozyten, welche das Integrin $\alpha 4\beta 7$ exprimieren, tritt dann über die mesenterialen Lymphknoten in die Zirkulation ein und kann von dort selektiv durch Bindung an mukosale Adressine in die *Lamina propria*, den „Effektorort“, rezirkulieren. Dieses darmspezifische *Homing* wird durch die Expression des $\alpha 4\beta 7$ Liganden MADCAM-1 durch Darmendothelzellen und epitheliale Chemokinproduktion vermittelt. *Lamina propria* T-Zellen (LPT) unterscheiden sich von peripheren, zirkulierenden T-Zellen durch ein distinktes, stark limitiertes Muster an Oberflächenmolekülen [44-46].

Aktivierte mukosale B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und sezernieren Immunglobulin (Ig)A [47;48]. Im Gegensatz zu nicht-mukosaassoziierten B-Zellen, die vorwiegend IgG und IgM sezernieren, produzieren die Plasmazellen der *Lamina propria* fast ausschließlich neutralisierendes IgA, welches über Transzytose ins Darmlumen gelangt. IgA Antikörper führen nicht zu gewebedestruktiven Erscheinungen – ein autoprotektiver Effekt des menschlichen Darms zum Schutz der mukosalen Schleimhaut. In der *Lamina propria* befinden sich außerdem sekundäre Effektorzellen, wie Granulozyten, Mastzellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen und Makrophagen sowie intrazelluläre blockierende Mechanismen, welche die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und chemotaktischer Faktoren verhindern.

In Abwesenheit von Entzündungen und Anwesenheit von kommensalen Bakterien besteht ein Gleichgewicht zwischen effektorischen und regulatorischen Immunsubpopulationen (Abb. 1.4). Zelluläre Kontakte und Signale sind hierfür gleichermaßen wichtig. Antigene der Nahrungsmittel und der intestinalen Mikroflora führen somit automatisch zur Anwesenheit spezifischer, immunkompetenter Zellen in der gastrointestinalen Schleimhaut.

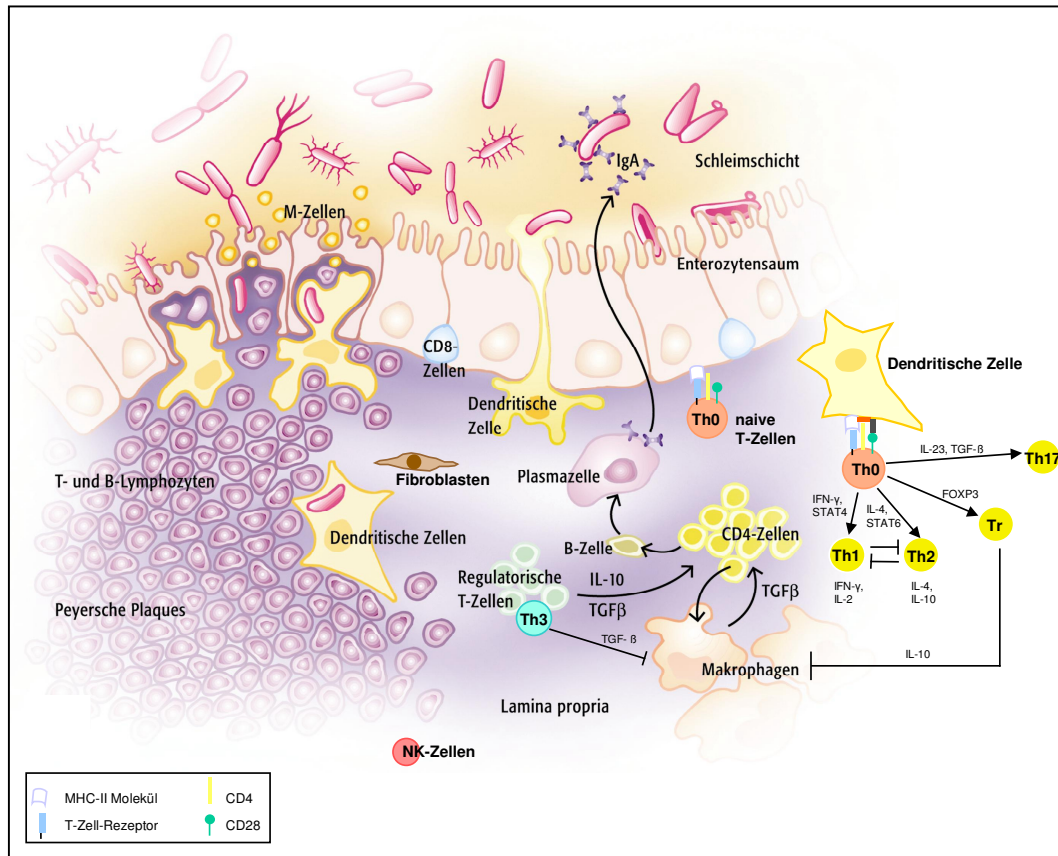


Abb. 1.4: Das Darm-assoziierte Immunsystem

Das Darmepithel, welches das Darm-assoziierte Immunsystem apikal begrenzt, enthält M-Zellen und Antigenpräsentierende Zellen, die permanent Darmbakterien und Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen. Intestinale Epithelzellen interagieren mit naiven T-Zellen (Th0) über MHC-II Rezeptoren und produzieren in Abwesenheit von Entzündungen kostimulatorische Signale. Dendritische Zellen kontrollieren die Differenzierung naiver T-Zellen in effektorische Th1, Th2 bzw. Th17 Subpopulationen sowie in die regulatorischen T-Zellen Tr und Th3. Mukosale Plasmazellen produzieren und sezernieren transluminal IgA. (modifiziert nach Pharmazeutische Zeitung, 05/2005, www.pharmazeutische-zeitung.de).

1.3.1.2 Orale Toleranz

Die physiologische Antwort des Immunsystems auf oral aufgenommene Nahrungsmittelantigene und die kommensale Darmflora ist das Fehlen einer spezifischen peripheren Immunantwort, welches als orale Toleranz bezeichnet wird [49;50]. Die orale Toleranz wird durch ein komplexes Zusammenspiel immunregulatorischer Mechanismen vermittelt; die wichtigsten sind die klonale Deletion antigenspezifischer T-Zellen, die Anergie durch das Fehlen kostimulatorischer Moleküle und die Präsenz regulatorischer T-Zellen, wie z.B. Tr1- oder Th3-Zellen (Abb. 1.4). Das Immunsystem des Darms zeigt beim gesunden Menschen also einen relativ niedrigen Aktivierungszustand.

In einer Reihe von Tiermodellen wurde die orale Gabe von Antigenen als Therapieansatz für chronische Entzündungen untersucht. In Modellen der rheumatoiden Arthritis [51], der multiplen Sklerose [52], des Diabetes mellitus [51] und der Colitis [53] konnten dadurch der Krankheitsausbruch verhindert bzw. die Erkrankungsaktivität deutlich reduziert werden [50]. Diese Ergebnisse haben dazu geführt, dass die orale Antigengabe als Therapieansatz derzeit auch in klinischen Studien getestet wird [51].

1.3.2 Zelluläre Integrität und epithelialer Zusammenhalt: Die Zell-Zell-Kontakte

Neben der apikal aufgelagerten Schleimschicht und der basolateralen Zellmembran spielen auch die benachbarte Epithelzellen verbindenden Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion des intestinalen Epithels. Die Zell-Zell-Kontakte werden in Abhängigkeit vom Zelltyp von unterschiedlichen Adhäsionsproteinen vermittelt. Zwischen benachbarten Epithelzellen und Endothelzellen bilden sich *Tight Junctions* (TJ), die u.a. für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere und Polarität von entscheidender Bedeutung sind. Direkt unterhalb der TJ befinden sich die *Adherens Junctions* (AJ), über die der interzelluläre Kontakt durch Assoziation von Cadherinen zustande kommt (Abb. 1.5).

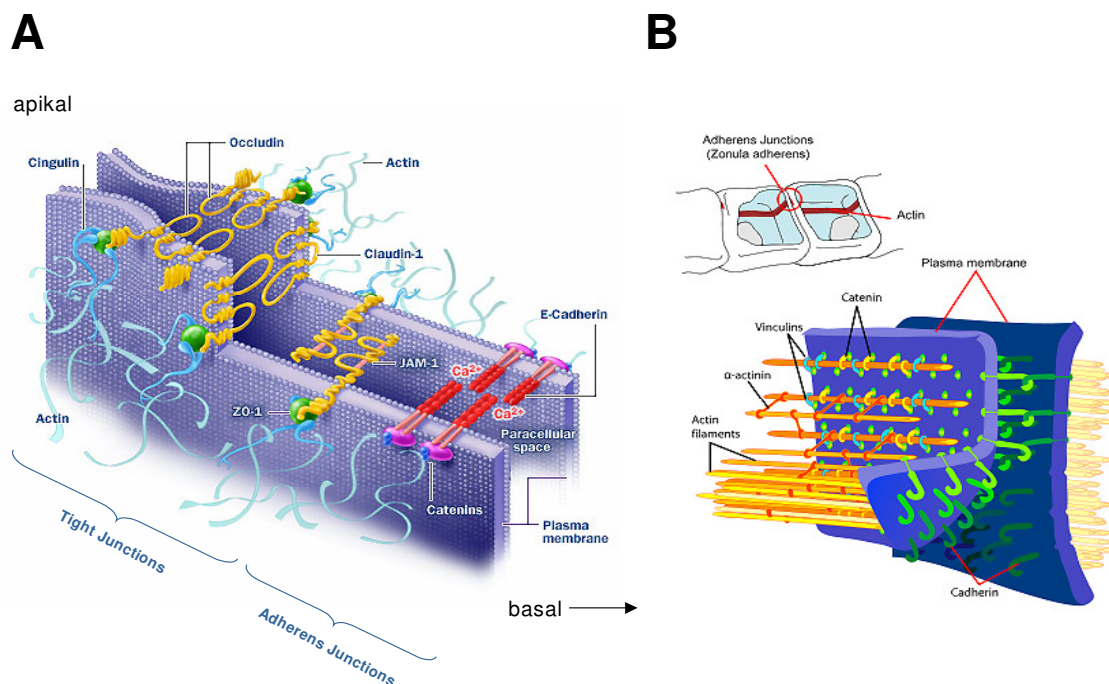


Abb. 1.5: Schematischer Aufbau von Tight Junctions und Adherens Junctions

(A) Komponenten der Zell-Zell-Kontakt-vermittelnden Tight und Adherens Junctions [modifiziert nach http://www.nastech.com/nastech/junctions_biology]. (B) Wechselwirkungen struktureller Proteine an Cadherin-abhängigen adherens junctions [Quelle: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cadherin>].

1.3.2.1 Proteine der *Tight Junctions*

Die integralen transmembranären Bestandteile der TJ umfassen drei Gruppen von Proteinen – Occludin, Claudine und *Junctional Adhesion Molecules* (JAM) – welche mit einer Vielzahl assoziierter *Zonula occludens*-Proteine interagieren.

Occludin

Das Transmembranprotein Occludin (lat. *occludere* – verschließen) wurde 1993 erstmals als TJ-assoziiertes Protein in Epithelien und Endothelien beschrieben [54]. Mit einem Molekulargewicht von 65 kDa besitzt es vier transmembranöse Segmente, die zwei extrazelluläre Schleifen bilden. Durch alternatives Spleißen entstehen multiple mRNA Varianten [55;56]. Die extrazellulären Schleifen beinhalten insgesamt nur neun geladene Aminosäuren. Schleifen benachbarter Zellen sind demnach über energetisch günstige hydrophobe Kontakte im parazellulären ionenreichen Milieu verknüpft. Der hohe Glyzin- und Tyrosingehalt der Schleifen ist wahrscheinlich für die hohe Flexibilität und dichte Schichtung der Schleifen verantwortlich. Diese molekulare Anatomie bildet möglicherweise die Voraussetzungen für eine reißverschlussartige Verzahnung der extrazellulären Schleifen benachbarter Zellen, um den Parazellularraum zu versiegeln.

Die genaue Funktion von Occludin in der parazellulären Abdichtung ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Die Transfektion von Occludin in Zellen, die kein endogenes Occludin exprimierten, führte zur Ausbildung von TJ-förmigen Strukturen und lieferte den Beweis dafür, dass Occludin als funktionelle Komponente der TJ an der Barrierefunktion beteiligt ist [54;57]. Occludin-defiziente embryonale Stammzellen waren hingegen unfähig, sich zu polarisierten epithelialen Zellen zu entwickeln und funktionelle TJ auszubilden [58]. Auch die Überexpression mutierter Occludin-Varianten führte zur Veränderung der Barrierefunktion der TJ [57;59;60].

Claudine

Die zentralen strukturellen Bestandteile der TJ bilden die Claudine (lat. *claudere* – schließen), eine Familie von bisher 24 beschriebenen kleinen Transmembranproteinen mit einem Molekulargewicht von 20 bis 27 kDa. Claudine durchspannen die Zellmembran mittels vier Transmembrandomänen, wodurch wiederum zwei extrazelluläre Schleifen entstehen. Während der Ausbildung von TJ-Strängen interagieren Claudine gegenüberliegender Zellmembranen sowohl homophil (Claudin-1/Claudin-1) als auch heterophil (Claudin-1/Claudin-3) [61]. Claudine werden gewebspezifisch exprimiert und sind als zentrale

Komponenten der TJ vermutlich für die Dichtigkeit und spezifische Ionenselektivität der Epithelien und Endothelien verantwortlich.

Durch *knockout*-Studien an Mäusen wurde gezeigt, dass **Claudin-1** entscheidend an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion beteiligt ist. Claudin-1 defiziente Mäuse zeigten schwere Schädigungen der epithelialen Barriere und verstarben postnatal innerhalb weniger Stunden aufgrund massiver Dehydrierung über die Haut [62]. **Claudin-2** bildet parazelluläre Poren und Kanäle, die selektiv für kleine Kationen sind [63]. **Claudin-4** ist für die transzelluläre Na⁺-Permeabilität verantwortlich [64].

***Zonula occludens*-Proteine**

Als primäre Adaptoren verbinden die *Zonula occludens* (ZO)-Proteine über spezifische PDZ (*Post synaptic density95_SAP90/Disc large/ZO-1*) -Domänen Occludin, Claudine und JAM mit dem Actin-Cytoskelett und anderen TJ-assoziierten Proteinen [65-70]. Das wichtigste ZO-Protein ist hierbei ZO-1, welches außerdem eine wichtige Rolle im Rahmen der Zellzyklusregulation spielt. Durch Promotorregulationen beeinflusst ZO-1 die parazelluläre Permeabilität und epitheliale Differenzierung/Zellteilung [71].

1.3.2.2 Proteine der *Adherens Junctions*

Die Proteinfamilie der **Cadherine** besteht aus *single-pass*-Transmembran-Glykoproteinen, die eine Ca²⁺-abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Zu den klassischen Cadherinen gehören E-Cadherin (in Epithelzellen), N-Cadherin (in Endothel-, Neuronal- und Muskelzellen) und P-Cadherin (in Zellen der Plazenta). Die durch die Cadherine vermittelte Zelladhäsion kann zwischen homotypischen Zellen (z.B. über E-Cadherin der Intestinalen Epithelzellen (IEZ)) oder heterotypischen Zellen (z.B. die Bindung von Melanomzellen an Fibroblasten durch N-Cadherin) erfolgen [72;73]. Um die Stabilität der Zell-Zell-Interaktion zu verstärken, sind die intrazellulären Domänen der Cadherine über Ankerproteine – unter anderem α -, β - und γ -**Catenin** – mit dem Actin-Zytoskelett verbunden.

1.4 Die intestinale Mikroflora – Freund und Feind

Die bakteriellen Bewohner des Gastrointestinaltrakts bilden ein enormes, komplexes Ökosystem aus aeroben und anaeroben Mikroorganismen. Die Flora des Dickdarms stellt dabei mit bis zu 10^{12} *colony forming units/ml* und über 400 Bakterienspezies die höchste Bakteriendichte im Verdauungstrakt dar [74]. Viele Bakterien leben im Lumen und nutzen Verdauungsprodukte als Nährstoffe. Fakultativ aerobe Bakterien wie *Escherichia coli* (E.coli) sind im Dickdarm nur untergeordnet präsent und dienen vor allem dem Sauerstoffverbrauch, wodurch ein strikt anaerobes Milieu entsteht. Prädominierende Vertreter der Kolonmikroflora sind vor allem aggressive obligat anaerobe Bakterien der Spezies *Bacteroides*, *Eubacterium* und *Enterococcus* [74] sowie die kommensalen Bakterienspezies *Lactobacillus* und *Bifidobakterium* [3] (Abb. 1.6). Im gesunden Darm herrscht ein Gleichgewicht zwischen aggressiven und protektiven Bakterienspezies.

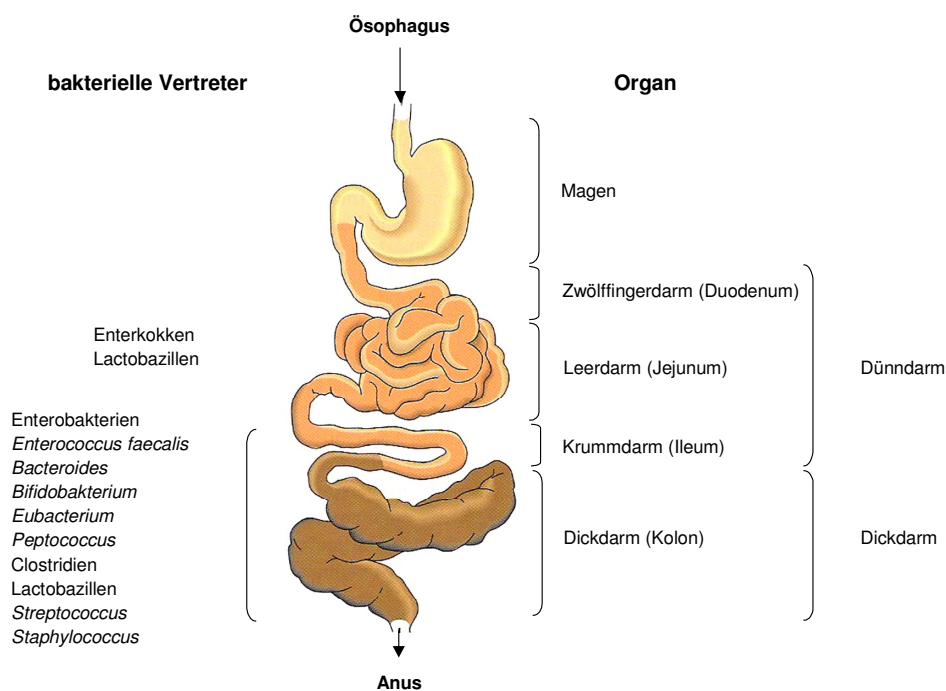


Abb. 1.6: Mikrobielle Besiedelung des humanen Magen-Darm-Trakts (modifiziert nach [75]).

Exogene Faktoren wie Alter, Ernährung, Infektionen und Medikamente können die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora beeinflussen. Auch endogene Faktoren sind an der Regulation der intestinalen Flora beteiligt. Durch die Produktion organischer Säuren (Buttersäure, Essigsäure) oder chemisch modifizierter Gallensäuren aus dem Steroidstoffwechsel schaffen Darmbakterien beispielsweise lokal ein ungünstiges Milieu für

pathogene Keime [76]. Neben der Sekretion von Muzinen durch epitheliale Becherzellen dienen auch die Darmmotilität sowie der aktive intraluminale Chloridtransport durch IEZ der Prävention bakterieller Adhäsion. Kommensale Bakterien sind an der Regulation der intestinalen Immunhomöostase und epithelialer Zellfunktionen beteiligt. Protektive Effekte konnten z.B. für *Lactobacillus rhamnosus*, welcher die Zytokinproduktion Lipopolysaccharid (LPS)-aktivierter Makrophagen inhibierte [77] oder *Lactobacillus acidophilus*, der enteroinvasive Barrieredefekte verhinderte [78] nachgewiesen werden.

Allen Bakterien gemeinsam ist eine Peptidoglykan (PDG)-haltige Zellwand. Der PDG-Anteil beträgt in grampositiven Bakterien bis zu 90% der Zellwand, die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht nur zu 25% aus PDG. PDG ist nur in Bakterien enthalten und wird extrazellulär von Immunzellen über den *Toll-like*-Rezeptor 2, sowie intrazellulär als Spaltprodukt über NOD-Proteine erkannt (1.5.2.1.2). Gramnegative Bakterien erzeugen Lipopolysaccharide, die man aufgrund ihrer zellgebundenen Lokalisation auch als Endotoxine bezeichnet. Eine fehlregulierte bakterielle Zusammensetzung oder gar Invasion des Darms kann somit zu toxischen und/oder pathologischen Veränderungen führen.

Eine besondere Bedeutung in der Abwehr potentieller Pathogene kommt den Defensinen zu, welche sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten synthetisiert werden. Defensine sind kleine, Cystein-reiche, kationische Peptide, die aktiv gegen Bakterien, Pilze und Viren (mit Virushülle) wirken. Die meisten Defensine wirken durch Penetration der mikrobiellen Zellmembran aufgrund ihrer elektrischen Ladung und der Bildung von Poren, wodurch es zur mikrobiellen Zellyse kommt. In Säugern existieren drei (bekannte) Defensin-Formen: α -, β - und θ -Defensine. α -Defensine werden primär in Neutrophilen, Makrophagen und Paneth-Zellen des Darms exprimiert. β -Defensine sind am weitesten verbreitet und werden von Leukozyten und Epithelzellen in zahlreichen Geweben (Mandeln, Haut, Cornea, Nieren, Ösophagus, Respirationstrakt) exprimiert. Die θ -Defensine sind eher selten und wurden bisher nur in Leukozyten von Rhesusaffen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass eine gestörte Defensin-Produktion zu Erkrankungen beitragen kann. So wurde nachgewiesen, dass eine Defensin-Imbalance zu Akne führt [79] und eine Reduktion der ilealen Defensinproduktion an der Prädisposition des MC beteiligt ist [80;81].

1.5 CED - eine genetisch determinierte Dysregulation des GALT

Zahlreiche Tiermodelle und Studien haben in den letzten Jahren den Fokus auf die mikrobielle Darmflora als essentielle Komponente der Pathogenese von CED gelenkt. So konnten als fundamentale Basis der CED ein oder mehrere genetisch determinierte Defekte identifiziert werden konnten, die zu einer Überreaktion des GALT auf die normale mukosale

Mikroflora führen [42]. Diese Defekte werden durch Veränderungen in der epithelialen Darmbarriere unterstützt, welche den Kontakt des mukosalen Immunsystems mit mikrobiellen Komponenten zusätzlich verstärken [42;82].

Zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge bei der dysregulierten Immunantwort des GALT wird zunächst auf die zellulären und sensorischen Komponenten des intestinalen Immunsystems eingegangen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden und im Anschluss die Immunregulation bei CED beschrieben.

1.5.1 Die zellulären Komponenten des intestinalen Immunsystems

Neben intraepithelialen Lymphozyten und *Lamina propria* Lymphozyten spielen IEZ und intestinale Makrophagen (IMAC) eine Rolle im Netzwerk des GALT.

Das intestinale Epithel ist durch einen hohen Zellumsatz mit nahezu komplettem Austausch der IEZ-Population innerhalb von 24 bis 96 Stunden gekennzeichnet [83]. Das proliferative IEZ-Kompartiment ist innerhalb der Krypten lokalisiert und räumlich von einem funktionellen IEZ-Kompartiment getrennt, das zum Teil aus hochdifferenzierten Epithelzellen im intestinalen Villusbereich besteht. IEZ des funktionellen Kompartiments migrieren in Richtung Villusspitze und durchlaufen dabei eine zunehmende Differenzierung und Spezialisierung. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Neubildung von IEZ und dem Verlust von Zellen durch mechanische Abschilferung und Apoptose. Eine Zerstörung der epithelialen Barriere, welche im Zusammenhang mit CED diskutiert wird, bewirkt ein gesteigertes Eindringen schädlicher luminaler Bestandteile und führt zur Aktivierung des GALT [84]. Sekundär kann der epitheliale Transport und damit wiederum die Barrierefunktion beeinflusst werden.

Die intestinale Makrophagenpopulation im Darm von CED-Patienten zeigt ein atypisches Muster an Oberflächenrezeptoren. Im gesunden Darm exprimieren IMAC weder den LPS/LPS-Bindeprotein (LBP)-Rezeptor CD14 [85;86], *Toll-like* Rezeptor (TLR) 2 und 4 [87] noch den Fcγ III Rezeptor [88]. CD11b ist auf <5% der IMAC nachweisbar [89]. Die entzündungsassoziierte IMAC-Population in der Mukosa von CED-Patienten zeigt eine deutliche Expression des LPS-Rezeptors [85] sowie des Fcγ III Rezeptors [86;88]. Die T-Zell-kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), welche auf IMAC aus gesunder Mukosa nicht nachweisbar sind, konnten auf der entzündungsassoziierten IMAC-Population lokalisiert werden [90]. Des weiteren wurde in IMAC aus entzündetem Gewebe eine erhöhte NADPH-Oxidaseaktivität (Oxidativer Burst) nachgewiesen [91]. In der Mukosa von CED-Patienten koexistieren somit zwei verschiedene Makrophagenpopulationen, von denen eine einen erhöhten Aktivierungszustand aufweist.

1.5.2 Die sensorischen Komponenten des intestinalen Immunsystems

Die Erkennung und Abwehr eingedrungener Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem spielt für das Überleben vielzelliger Organismen eine entscheidende Rolle. Pflanzen und Tiere bedienen sich hierbei spezifischer Rezeptoren (PRRs), welche molekulare Muster von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen können. Hierzu zählen z.B. bakterielle Zellwandbestandteile (LPS, PDG, Lipoproteine) oder Nukleinsäuren. Neben der bekannten Antwort auf extrazelluläre PAMPs, z.B. durch TLRs [92;93] oder membranständige R-Proteine in Pflanzen [94] wurde die Existenz intrazellulärer Mechanismen zur Erkennung eingedrungener Bakterien vermutet [95]. Die Identifizierung der zytosolischen Proteine NOD1 und NOD2, die aufgrund ihrer speziellen Struktur diese Aufgaben erfüllen könnten, bestätigte die Hypothese [96;97].

Die Familie der intrazellulären NOD-Proteine, welche auch unter dem Namen CATERPILLER (*CARD*, *transcription enhancer*, *R(purine)-binding*, *pyrin*, *lots of leucin rich repeats*) bekannt ist [98], umfasst 30 beschriebene Mitglieder. Die korrespondierenden Gene sind auf acht Chromosomen mit einer Häufung auf den Chromosomen 11, 16 und 19 verteilt [99;100]. Allen NOD-Proteinen gemeinsam ist neben ihrer Struktur die Fähigkeit, durch Oligomerisierung und Rekrutierung nachgeschalteter Signalproteine Effektorkaskaden auszulösen (Abb. 1.7). Flankiert von einer aminoterminalen Effektorbindedomäne (EBD), z.B. CARD (*caspase recruitment domain*) oder PYD (*pyrin domain*) und einer carboxyterminalen Ligandenerkennungsdomäne (*ligand recognition domain*, LRD), z.B. LRR (*leucin rich repeats*), liegt die zentrale nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne (NOD). Die LRRs weisen strukturelle Homologien zu den R-Genen der Pflanzen auf, welche dort eine Resistenz gegen spezifische Pathogene vermitteln. Die Erkennung intrazellulärer Pathogene durch R-Proteine führten in der betroffenen Pflanzenzelle zur Einleitung einer Form des programmierten Zelltods („Hypersensitivitätsreaktion“) und somit über das Absterben der „infizierten“ Zellen zur Eindämmung der Infektion [94]. Die aminoterminalen Region der NOD enthält einen P-Loop, welcher auch in ATP/GTPasen gefunden wurde, sowie eine Mg^{2+} -Bindestelle, die als nukleotidbindendes ARC-Motiv (NB-ARC) definiert werden konnte [101]. Das NB-ARC Motiv vermittelt die Nukleotidbindung und ist für die nachgeschaltete Selbstoligomerisierungskaskade verantwortlich. Die Funktionsweise der NOD-Proteine wurde durch Studien an APAF1, dem ersten identifizierten Vertreter dieser Familie, aufgeklärt [102]. Die C-terminale LRD von APAF1 besteht aus zahlreichen WD40 *repeats* (WDRs), welche Cytochrom c binden können, das im Verlauf der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt wird. Die Bindung von Cytochrom c führt zur Oligomerisierung von APAF1-Molekülen und zur Rekrutierung und Autoaktivierung von pro-Caspase-9 [103;104].

Dieser Multiproteinkomplex wird als „Apoptosom“ bezeichnet und ähnelt den „Inflammasom“-Komplexen Nalp1 (NACHT-, LRR-, and PYD-containing protein 1) [105] und Nalp3 [106] mit ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), Caspase-5 und/oder Caspase-1. Die Bildung des „Nalp3-Inflammasoms“ führt zur Aktivierung von Caspase-1 und zur Prozessierung von pro-IL1 β [105].

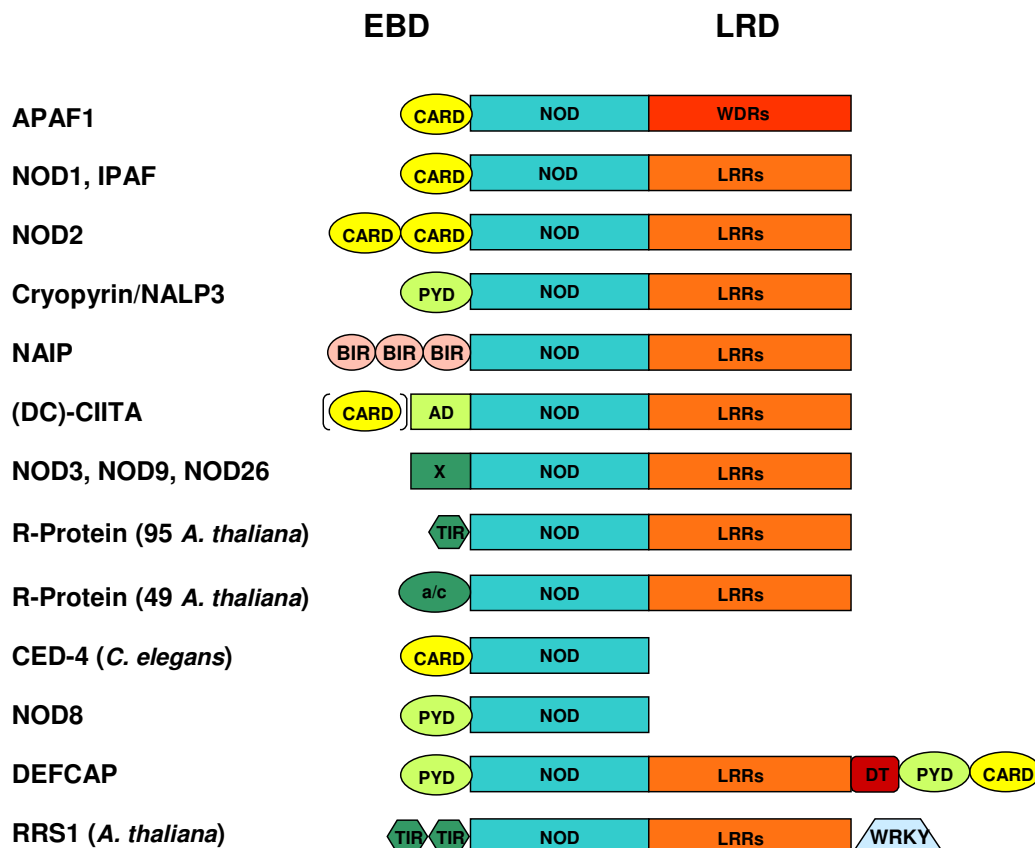


Abb. 1.7: Die NOD-Proteinfamilie

Schematische Darstellung der Domänen der NOD-Proteinfamilie. Die zentrale nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne (NOD) wird aminoterminal von variablen Effektorbindedomänen (EBD) und carboxyterminal von Ligandenerkennungsdomänen (LRD) flankiert. Die Zahl der LRRs (leucin-rich repeats) sowie der TIRs (Toll/IL-1-Rezeptordomänen) kann zwischen den einzelnen NOD-Proteinen variieren. X - unbekannte EBDs; a/c – α -Helix/coiled-coil-reich; AD – Aktivierungsdomäne; APAF1 – Apoptose-Protease aktivierender Faktor 1; BIR – Baculovirus-inhibitor of apoptosis-repeats; CARD – caspase recruitment domain; CIITA – MHC-II Transaktivator; DT – DEFCAP/TUCAN ausgedehnte Homologiedomäne; IPAF – ICE-Protease aktivierender Faktor; NAIP – neuronales Apoptose-inhibierendes Protein; PYD – Pyrindomäne, WDRs – WD40 repeats. (modifiziert nach [99])

1.5.2.1 NOD2/CARD15

Das auf Chromosom 16 lokalisierte NOD2/CARD15-Gen besteht aus 12 Exons und kodiert für ein 1040 Aminosäuren langes Protein mit einer Molekularmasse von 116 kDa. Die zentrale NOD wird aminoterminal von 2 CARDS und carboxyterminal von 10 LRRs flankiert (Abb. 1.8).

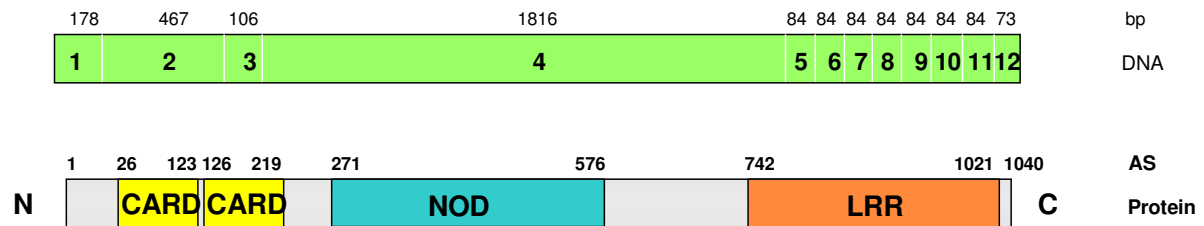


Abb. 1.8: Genkarte und Proteinstruktur von NOD2/CARD15

Das NOD2/CARD15-Gen besteht aus 12 Exons mit insgesamt 3120 Basenpaaren (bp) und codiert für ein 1040 Aminosäuren (AS) langes Protein mit einer Molekularmasse von 116 kDa. Die zentrale NOD wird aminoterminal (N) von zwei CARD-Domänen und carboxyterminal (C) von 10 LRRs flankiert.

1.5.2.1.1 Expression von NOD2/CARD15

NOD2/CARD15 wird zytosolisch hauptsächlich von APCs und Epithelzellen exprimiert. Interessanterweise exprimieren die meisten IEZ zwar NOD2/CARD15, auf Proteinebene wurde jedoch kein oder nur sehr wenig NOD2/CARD15 Protein nachgewiesen. Die Expression scheint dabei vor allem auf die Paneth-Zellen beschränkt zu sein [107-109]. Deren α -Defensin-Produktion (1.4) hängt ebenfalls von der NOD2/CARD15-Aktivierung ab [107;109]. Die Expression von NOD2/CARD15 wird durch proinflammatorische Zytokine reguliert. In Epithelzellen ist die basale Expression gering und kann durch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und IFN- γ induziert werden [110]. Die TNF-vermittelte Entzündungsantwort führt zur Aktivierung von *Nuclear factor-kappaB* (NF- κ B). Durch die Bindung von NF- κ B an adäquate Bindestellen im NOD2/CARD15-Promotor kann sich die NOD2/CARD15-Expression somit selbst hochregulieren. Des weiteren scheinen die Typ I-Interferon-vermittelten Signalwege an der NOD2/CARD15-Expression beteiligt zu sein [111].

1.5.2.1.2 NOD2/CARD15-vermittelte Signalwege

Die strukturellen Homologien der LRRs von NOD2/CARD15 zu den pflanzlichen R-Proteinen, welche die Erkennung intrazellulärer Pathogene vermitteln, sowie dessen Synthese im Zytosol implizieren, dass die Liganden dieses Proteins mikrobielle Komponenten sein können [99]. Obwohl initial LPS als Ligand identifiziert wurde [30], zeigen neuere Studien, dass die Derivate der bakteriellen Zellwandkomponente PDG γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) [112;113] und Muramyldipeptid (MDP) [112;113] an NOD2/CARD15 binden. NOD2/CARD15 fungiert somit als intrazellulärer Sensor grampositiver und gramnegativer Bakterien.

Die Aktivierung des NOD2/CARD15-vermittelten Signalweges erfolgt durch den Kontakt der LRRs des NOD2/CARD15 Proteins mit dem Liganden MDP, welcher vermutlich durch den Verdau von Bakterien in Phagolysosomen durch APCs [114] oder durch den apikalen Peptidtransporter PEPT1 in Epithelzellen [115] das Zytosol erreicht. Die Interaktion der LRR-Domänen des NOD2/CARD15 Proteins mit dem Liganden erfolgt vermutlich nicht durch direkte Bindung, sondern über Ko-Faktoren, wodurch eine komplexe Konformationsänderung induziert wird [116-118] (Abb. 1.9). Als Schutz vor unkontrollierter Selbstaktivierung interagieren in Abwesenheit der Liganden die LRRs wahrscheinlich mit der eigenen NOD-Domäne [119].

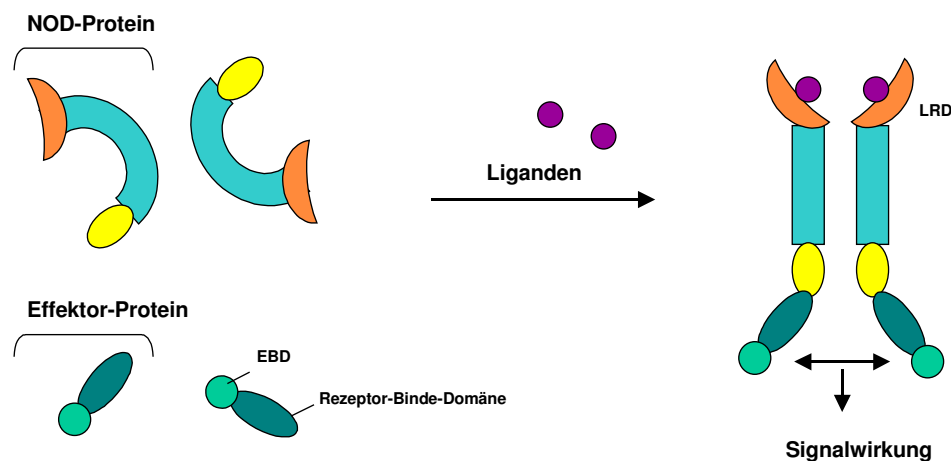


Abb. 1.9: Aktivierung der NOD-Proteine durch Oligomerisierung

Die Erkennung exogener oder endogener Liganden durch die Ligandenerkennungsdomäne (LRD) der NOD-Proteine führt zur Konformationsänderung und Selbstoligomerisierung über NOD. Dadurch werden nachfolgende Effektormoleküle über die Effektorbindedomäne (EBD) der NOD-Proteine rekrutiert. (modifiziert nach [99])

Die NOD2/CARD15-vermittelte Aktivierung von NF- κ B

Der direkt NOD2/CARD15-vermittelte Signalweg endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser evolutionär konservierte Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Regulation diverser Gene, die mit der Entwicklung angeborener und adaptiver Reaktionen zur Erkennung und immunologischer Kontrolle pathogener Organismen assoziiert sind. Weiterhin reguliert NF- κ B zelluläre Prozesse, die für eine koordinierte Immunreaktion essentiell sind, wie Aufrechterhaltung der Homöostase, Entzündungsreaktionen, Zellproliferation und -differenzierung, Überleben und Zelltod [120]. Eine Dysregulation des NF- κ B-Signalweges ist mit pathologischen Störungen - von Hautentzündung, ähnlich der *Incontinentia pigmenti*, über Diabetes mellitus bis hin zu Krebs - assoziiert [121]. NF- κ B wird im Organismus ubiquitär exprimiert und ist als inaktiver zytosolischer Proteinkomplex an Inhibitorproteine der *inhibitor of NF κ B* (I κ B)-Klasse gebunden. Die I κ B-Proteine maskieren die nukleäre Lokalisationssequenz und die DNA-Bindungsdomäne des NF- κ B-Komplexes und sind so maßgeblich an der negativen Regulation des Signalgeschehens beteiligt [122-124]. Zu den unterschiedlichen Aktivatoren des NF- κ B-Signalweges gehören neben Zytokinen wie TNF und IL-1 β hauptsächlich allgemeine Stressfaktoren (Pathogenbefall durch Bakterien und Viren, UV-Strahlung, oxidativer Stress und Chemikalien) [120;125]. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalfads hat differentielle Auswirkungen. Einerseits induziert NF- κ B eine Vielzahl proinflammatorischer Gene, welche eine Rolle bei der Regulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort spielen [120;125], z.B. die Kontrolle der Expression unterschiedlicher Immunmodulatoren (Interleukine wie IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, Chemokine) und ihrer Rezeptoren, wichtiger Enzyme (iNOS, MMP-9) oder Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle (E-Selektine) [126]. Andererseits fungiert die Expression anti-apoptotischer Gene über NF- κ B als molekularer Gegenspieler des physiologischen Zelltods, da die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose inhibieren kann [127]. Wichtige Mitglieder NF- κ B-abhängiger anti-apoptotischer Proteine sind FLIP_L, TRAF1 oder Vertreter der Bcl2-Genfamilie [128-131].

Im klassischen Weg der NF- κ B-Aktivierung erfolgt die Rekrutierung nachgeschalteter Signalproteine durch die homophile CARD/CARD-Interaktion mit RICK (*recruitment receptor-interacting serine/threonine-kinase*). Die Aktivierung von RICK führt zur Polyubiquitinierung des Inhibitors der NF- κ B(I κ B)-Kinase- γ (IKK- γ , NEMO). Die RICK-IKK- γ Interaktion induziert die Phosphorylierung von IKK- β und I κ B mit nachfolgender Freisetzung von NF- κ B und Translokation seiner transkriptionellen Komponente in den Nukleus (Abb. 1.10A).

Die NOD2/CARD15-vermittelte NF- κ B-Aktivierung erfolgt bereits durch starke transiente Überexpression ohne zusätzlichen Stimulus [132]. Mutationsanalysen zeigten,

dass beide CARDS für die homophile Interaktion mit der CARD-Domäne von RICK/RIP2 notwendig sind und dass die komplette Deletion der LRR zu einer deutlichen Verstärkung der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung führt [120;132]. In RICK/RIP2^{-/-}-Zellen konnte nur nach Rekonstitution der Zellen mit RICK/RIP2-Expressionsplasmiden über NOD2/CARD15 NF- κ B aktiviert werden [133]. Eine direkte pro-apoptotische Rolle von NOD2/CARD15, wie sie z.B. für NOD1 über RICK/RIP2 nachgewiesen wurde, konnte nicht gezeigt werden [120].

NOD2/CARD15 und *Toll-like*-Rezeptoren

NOD2/CARD15 kann regulierend in TLR-vermittelte Signalwege eingreifen [134]. Eine Interaktion von NOD2/CARD15 wurde z.B. mit TLR2 nachgewiesen [134]. Die Stimulierung von TLR2 durch PDG vermittelt über MyD88 die Aktivierung von NF- κ B (Abb. 1.10 A). Durch *in vivo* Studien konnte nachgewiesen werden, dass die PDG-vermittelte Aktivierung von TLR2 durch die MDP-vermittelte NOD2/CARD15-Aktivierung negativ reguliert wird und dass in Abwesenheit von NOD2/CARD15 diese Negativregulation aufgehoben ist [134]. Die Blockade des TLR2-vermittelten Signalweges durch NOD2/CARD15 führt somit zu einer reduzierten NF- κ B-Aktivierung und verminderten IL-12-Produktion. In einer Studie an einer murinen NOD2/CARD15 *knockin*-Mutante, welche der humanen NOD2/CARD15 SNP13 Variante entspricht, konnte im experimentellen Colitismodell durch bakterielle Stimulierung (MDP und/oder LPS) ebenfalls eine Verstärkung der intestinalen Entzündung aufgrund übermäßiger IL-1 β Sekretion beobachtet werden [135]. TLR2 kann ebenfalls direkt RICK aktivieren, wodurch es zu einer NOD2/CARD15-unabhängigen Aktivierung von NF- κ B kommt [133].

Ein potentieller Einfluss von NOD2/CARD15 auf den TLR4-Signalweg wird vermutet, jedoch scheint es sich hierbei nicht um einen dominant herabregulierenden Effekt zu handeln, wie er für TLR2 beschrieben ist. Die Aktivierung des extrazellulären TLR4 durch den Liganden LPS führt nicht nur zur MyD88-vermittelten Aktivierung von NF- κ B, sondern auch zu einer gesteigerten Expression von NOD2/CARD15, wobei NOD2/CARD15 wiederum die Expression von MyD88 induziert (Abb. 1.10 B). Es wird außerdem vermutet, dass NOD2/CARD15 eine gesteigerte IKK γ -Aktivierung über einen unabhängig positiven Effekt durch RICK vermittelt (Abb. 1.10 B).

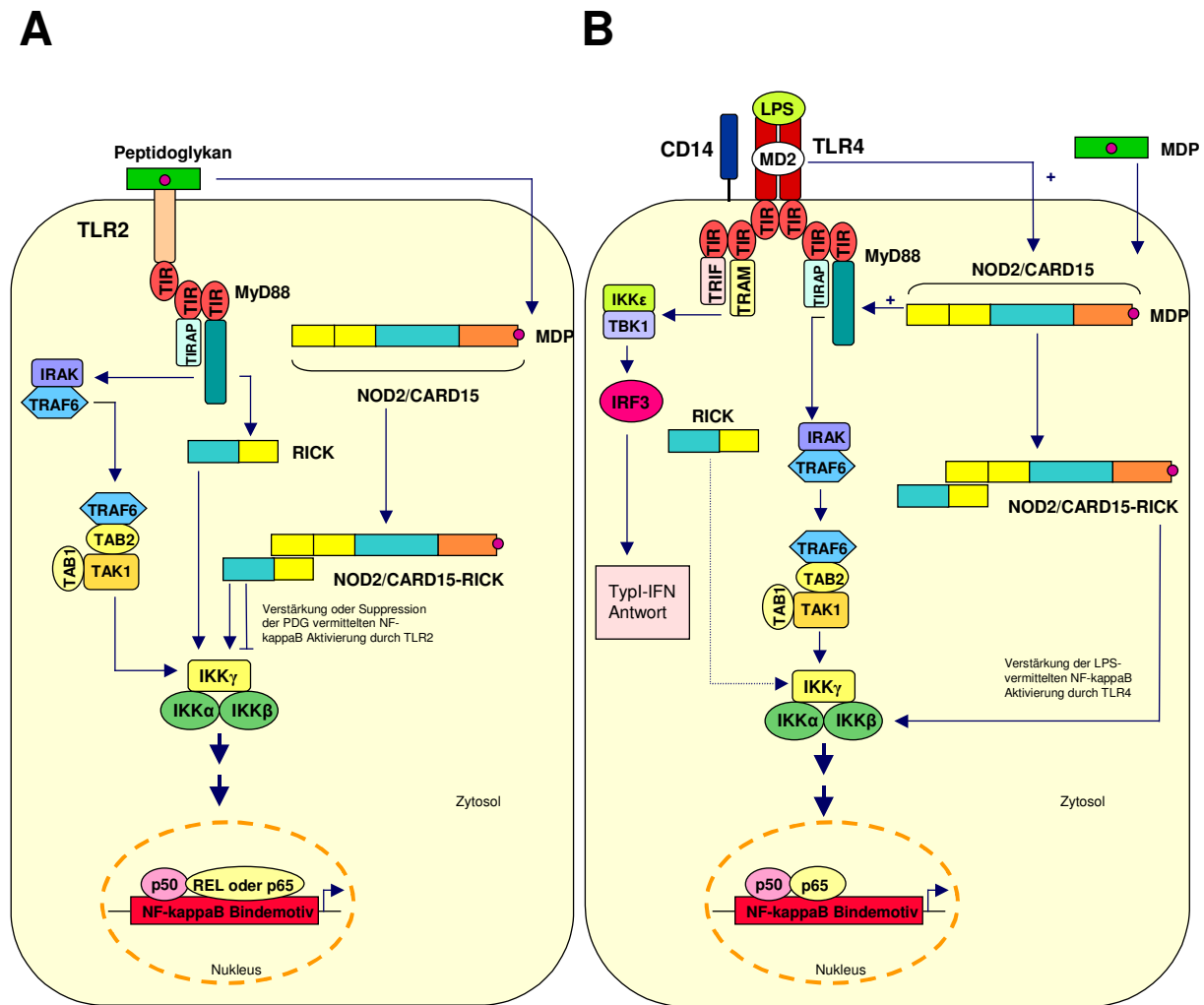


Abb. 1.10: Der NOD2/CARD15 Signalweg und seine Interaktionen mit TLR2 und TLR4

(A) Peptidoglykan (PDG) aktiviert sowohl extrazellulär den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) sowie zytosolisch über die Generierung von Muramylpeptid (MDP) NOD2/CARD15. Die Stimulierung von TLR2 durch PDG vermittelt die Assoziation mit MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) über TIR (Toll/ IL-1 receptor domain) und Rekrutierung von IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4) und IRAK1. TRAF6 (tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) bindet IRAK1 um anschließend einen Komplex mit TAK1 (transforming-growth-factor- β -activated kinase 1), TAB1 (TAK1-Bindeprotein) und TAB2 zu bilden. Diese Komplexbildung mündet im IKK-vermittelten Weg der NF- κ B Aktivierung. TLR2 vermittelt außerdem die Aktivierung von RICK (receptor-interacting serin/threonine kinase). Die gleichzeitige Aktivierung von NOD2/CARD15 durch MDP führt zur Aktivierung von RICK durch NOD2/CARD15 und Herabregulation des TLR2-Signalweges. **(B)** LPS aktiviert den Ko-Rezeptor-Komplex von TLR4 und MD2 und initiiert die MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signalwege. Der MyD88-abhängige Signalweg ähnelt dem in (A) beschriebenen Weg; im MyD88-unabhängigen Signalweg sind TRIF (Toll-/IL-1R-domain-containing adaptor protein inducing interferon- β) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule) involviert und führen zur Aktivierung von IRF3 (IFN-regulatory factor 3) sowie zur TypI-IFN Produktion. Aktivierter TLR4 führt zur gesteigerten Expression von NOD2/CARD15 (+) und dies wiederum zur Induktion von MyD88 (+). Der gepunktete Pfeil indiziert einen hypothetischen Signalpfad. TIR: Toll/IL-1R; TIRAP: TIR-domain-containing adaptor protein. (modifiziert nach [93;136]).

1.5.2.1.3 Morbus Crohn und Mutationen in NOD2/CARD15

Aufgrund der Lokalisation von CARD15 in der minimalen Kopplungsregion von *IBD 1* auf Chromosom 16 (16q12) [30] wurde vermutet, dass NOD2-Mutationen mit CED assoziiert sein könnten. Durch genetische Studien an großen Kohorten von MC-Patienten konnte im Jahr 2001 gezeigt werden, dass 10-15% der Patienten homozygote Mutationen in CARD15 aufwiesen [29;30]. Diese Mutationen resultieren in den Aminosäure-Austauschen Arg702Trp, Gly908Arg und Leu1007fsinsCys (fsinsCys beschreibt eine Leserasterverschiebung durch Insertion eines Cystein-Restes und resultiert in einem verfrühten Stop-Codon und einem trunkierten Protein), welche als *single nucleotide polymorphism* (SNP) 8, SNP12 und SNP13 bezeichnet werden. Ein heterozygotes Vorliegen eines mutierten Allels steigert das Risiko an MC zu erkranken um das 2- bis 4-fache; Homozygotie bzw. verbundene Heterozygotie führt zu einem 20-bis 40-fach erhöhten Risiko [29;30;137]. Alle Mutationen betreffen die LRR-Domäne und somit die Ligandenerkennungsfunktion des Proteins. Die Auswirkungen der Mutationen werden kontrovers diskutiert. So zeigen alle drei SNPs primär eine verminderte Induzierbarkeit von NF- κ B nach Stimulierung mit Bakterienwandbestandteilen [99;138]. Die Stärke des Funktionsverlustes korreliert dabei mit der individuellen Mutation und dem Erkrankungsrisiko [138]. Der Verlust der Erkennung bakterieller Bestandteile führt sekundär über einen NOD2/CARD15-unabhängigen Weg zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung und Entzündungsreaktion im intestinalen Gewebe. Möglicherweise führt der veränderte NOD2/CARD15-Signalweg zu einer fehlerhaften Induktion kostimulatorischer Signale für T-Zellen und somit zur Entwicklung entzündlicher Erkrankungen [120], wobei der genaue pathophysiologische Mechanismus dieser Signalfade bisher nur spekulativ erörtert wurde. Aminosäuresubstitutionen innerhalb der kodierenden Region der NOD-Domäne von NOD2/CARD15 (Arg334Trp, Arg334Gln, Leu469Phe) konnten mit der dominant vererbten Krankheit Blau-Syndrom assoziiert werden [139;140]. Die resultierenden modifizierten Proteinvarianten induzieren interessanterweise eine gesteigerte basale NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp [112]. Die Beteiligung von NOD2/CARD15 an der Pathogenese unterschiedlicher mukokutaner Entzündungssyndrome deutet auf eine besondere Rolle dieses Proteins in der Regulation der angeborenen Immunabwehr epithelialer Grenzflächen hin [120].

1.5.2.2 CIAS1/PYPAF1/Nalp3

Ein weiterer Vertreter der CATERPILLER-Genfamilie ist CIAS1 (Synonyme: PYPAF1/Nalp3), welches im Folgenden als Nalp3 bezeichnet wird. Nalp3 ähnelt strukturell NOD2/CARD15 – die zentrale NOD-Domäne wird carboxyterminal von LRRs und aminoterminal von einer PYD flankiert. Durch *Two-Hybrid*-Analysen konnte eine homophile Interaktion der PYD-Domäne von Nalp3 mit der PYD-Domäne von ASC beschrieben werden. Ko-Expressionsversuche zeigten eine signifikante NF- κ B-Aktivierung, welche über die alleinige Nalp3-Expression nicht erfolgte [120;141]. In einer anderen Studie konnte der synergistische Effekt von Nalp3 und ASC zusätzlich für die Aktivierung von pro-Caspase-1 nachgewiesen werden [142]. Nalp3 alleine reduziert allerdings die Aktivierung von NF- κ B und pro-Caspase-1. Dieser Effekt scheint unabhängig von PYD über die NOD- und LRR-Region vermittelt zu werden [143;144].

Mutationen im Nalp3-Gen sind z.B. mit den heterogenen Krankheiten Familiäre Kälteurtikaria und dem *Muckle-Wells*-Syndrom, die sich durch rezidivierende Entzündungsanfälle mit Arthritis, Fieber und Nesselausschlag auszeichnen, assoziiert [145]. Bisher wurden 27 *missense*-Mutationen beschrieben, die alle in den zentralen NACHT-Exons liegen und zum Teil Analogien zu den Blau-Syndrom-assoziierten Mutationen aufweisen [120;146]. Nalp3 ist Bestandteil des sogenannten „Nalp3-Inflammasoms“, einem Multiproteinkomplex aus ASC, Caspase-1, CARDINAL/CARD8 und Nalp3 [106]. Die Bildung dieses Komplexes induziert die Aktivierung von pro-IL1 β durch Caspase-1 und Sekretion von reifem IL-1 β . Kürzlich wurde gezeigt, dass Nalp3-Variationen spontan proinflammatorische Reaktionen auslösen können, welche aus einer gesteigerten Assoziation von Nalp3 mit ASC und einer erhöhten IL-1 β Synthese resultiert [106]. Die genaue Funktion des Wildtyp-Proteins ist jedoch noch weitgehend unklar.

1.5.3 Die CED-assoziierte Entzündung - ein multifaktorielles Geschehen

Mutationen in den für NOD2/CARD15, DLG5, OCTN, ATG16L-1, IL-23R und PPAR γ codierenden Genen sind mit der Entwicklung von MC assoziiert [23;24;32;147]. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass MC primär Folge einer Hyperreaktion auf kommensale Keime in der normalen mukosalen Mikroflora ist und nicht Antwort auf ein spezifisches Pathogen [148]. Überzeugende Beweise dieser Hypothese lieferten *in vivo* Studien an Mausmodellen mukosaler Entzündung. Mäuse, die unter keimfreien Bedingungen gehalten wurden, entwickelten keine Darmentzündung, wohl aber wenn sie unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden [149]. Der Organismus ist lebenslang

Antigenen ausgesetzt, die mit seiner normalen mukosalen Mikroflora assoziiert sind. Hierbei sind einige Antigene häufiger involviert als andere [150]. Im gesunden Darm besteht die physiologische Antwort des Immunsystems auf oral aufgenommene Nahrungsmittelantigene und die kommensale Darmflora im Fehlen einer spezifischen peripheren Immunantwort (orale Toleranz; 1.3.1.2). Im Krankheitsbild MC ist diese Toleranz gestört und es kommt zu einer atolerogenen Antwort auf mikrobielle und Nahrungsmittelantigene, welche in einer hyperreaktiven, NF- κ B-vermittelten IL-12-/IL23-produzierenden T-Helferzell-1 (Th1) Immunantwort resultiert (Abb. 1.11) [148]. Durch mikrobielle Stimuli kommt es bei MC zusätzlich zur Veränderung autoprotektiver Schutzmechanismen des Darmepithels. Die Produktion und Sekretion von α -Defensinen durch Paneth-Zellen (1.4) hängt nämlich ebenfalls von der NOD2/CARD15-Aktivierung ab, so dass es im Darmepithel von MC-Patienten zu einer reduzierten Sekretion dieser antimikrobiellen Peptide kommt (Abb. 1.11) [107;109].

In welcher Art und Weise die kommensale Darmflora und das Immunsystem des Darms kommunizieren und interagieren wird noch immer kontrovers diskutiert. Die MC-assoziierte Darmentzündung könnte (i) durch eine anormale starke Effektorzellantwort, welche den Toleranzmechanismus ausschaltet, ausgelöst werden, oder (ii) durch einen primären Defekt in der Toleranzvermittlung, welcher sekundär zu einer normalen Effektorzellantwort führt [136]. Die orale Toleranz wird unter anderem durch regulatorische T-Zellen vermittelt [149;151]. Fehlfunktionen dieser Zellen könnten somit Ursache der Erkrankung sein, worauf zahlreiche Studien an CED-Modellen hindeuten [149;151]. Die Erkenntnis, dass Mutationen im NOD2/CARD15-Gen ein starkes Risiko an MC zu erkranken, darstellen, lässt vermuten, dass das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt.

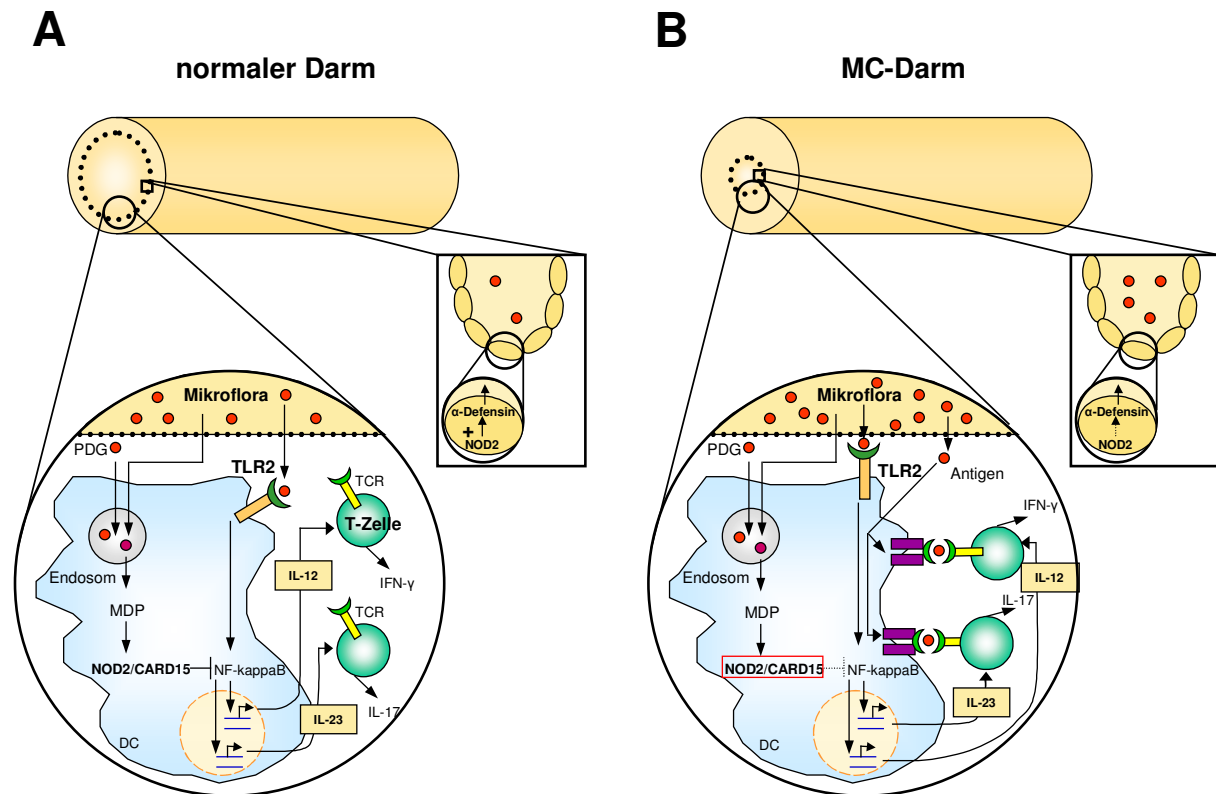


Abb. 1.11: Die mukosale Immunantwort im gesunden Darm und bei MC-Patienten mit NOD2/CARD15 Defekten

(A) Die Zellwandkomponente kommensaler Bakterien - Peptidoglykan (PDG) – wird auf der Oberfläche Dendritischer Zellen (DC) durch den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt. Die Bindung von PDG an TLR2 führt zur Aktivierung von NF-κB, der Schlüsselkomponente für die Differenzierung IFN-γ und IL-17 produzierender Zellen. Diese proinflammatorischen Zytokine scheinen für die MC-assoziierte Darmentzündung verantwortlich zu sein. PDG wird ebenso intrazellulär in den Endosomen abgebaut, das resultierende Spaltprodukt ist Muramyldipeptid (MDP), welches von NOD2/CARD15 erkannt wird. Die Bindung von MDP an NOD2/CARD15 führt zu dessen Aktivierung und initiiert einen Mechanismus, durch den die PDG-vermittelte NF-κB Aktivierung inhibiert wird, was wiederum eine Herabregulation der TLR-induzierten Zytokinproduktion zur Folge hat. **(B)** In MC-Patienten mit NOD2/CARD15 Mutationen ist die NOD2/CARD15 Modulation gestört, wodurch es zu einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt. Kooperativ mit der Reaktion von T-Zellen auf mukosale Antigene führt dies zu Entzündungen, Rekrutierung weiterer Immunzellen und final zur chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Zusätzlich ist die NOD2/CARD15-abhängige Produktion der antimikrobiellen α-Defensine durch Paneth-Zellen an der Kryptenbasis des terminalen Ileums in MC-Patienten mit NOD2/CARD15-Defekten reduziert. Dadurch kommt es möglicherweise zu einer erhöhten bakteriellen Dichte in den Krypten, wodurch das mukosale Immunsystem zusätzlich stimuliert wird. (modifiziert nach [152])

Neben immunologischen Prozessen scheinen aber auch metabolische Komponenten an der Pathophysiologie der CED beteiligt zu sein. Im normalen Zellstoffwechsel spielen z.B. Proteinasen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Proteindegradation. Proteolyse ist für normale physiologische Funktionen des Körpers, wie Angiogenese oder Knochenumbau, aber auch für die Aktivierung zahlreicher Propeptide (Hormone, Zytokine) essentiell [153]. Eine unkontrollierte Synthese und/oder Sekretion dieser Enzyme führt zum massiven Proteinabbau, wodurch es zu Gewebeschädigungen und zur Ausbreitung von Entzündungen kommen kann. Bei zahlreichen destruktiven Erkrankungen, wie auch bei MC, wurde eine erhöhte Sekretion proteolytischer Enzyme festgestellt [154-156]. Auch während der Krebsmetastasierung kommt es zur verstärkten Freisetzung von Proteasen [153]. Neben Matrix-Metalloproteinasen und Serinproteinasen sind vor allem Vertreter der Cathepsinfamilie an malignen Erkrankungen der Brust [156], der Prostata [157], der Blase [158], der Lunge [159] und des Gastrointestinaltrakts [160;161] beteiligt. Die proteolytische Aktivität verschiedener Cathepsine spielt ebenso eine wichtige Rolle im Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis und Osteoporose [162;163]. So wiesen Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie MC-Patienten erhöhte Plasmakonzentrationen der Leukozytenelastase [164;165] auf. Ebenso wurde eine erhöhte Expression von matrixdegradierenden Matrix-Metalloproteinasen (MMP), vor allem von MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-13 bei CED nachgewiesen [166-168]. Weiterhin wurde eine verstärkte Kollagenase- sowie Trypsase-Aktivität bei CED festgestellt [169].

In Kombination mit Immunmediatoren könnten somit auch zelluläre Proteinase eine bedeutende Rolle in der Darmentzündung und Schleimhautschädigung bei CED spielen.

1.6 Zelluläre Proteinase

Proteinase sind proteolytische Enzyme, welche die Hydrolyse von Amidbindungen katalysieren. Dieser irreversible Mechanismus dient zahlreichen intrazellulären Prozessen, wie Koagulation, Verdau, Reifung von Zytokinen und Prohormonen, Apoptose oder der Degradation intrazellulärer Proteine. Proteinase „erkennen“ und binden kurze Teilsequenzen ihres Substrats und hydrolysieren relativ spezifisch Bindungen zwischen bestimmten Aminosäureresten. Nach ihrem Angriffspunkt im Substratmolekül unterscheidet man Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinase.

Cathepsine sind lysosomale Hydrolasen, welche Proteine in den Lysosomen degradieren. Sie werden am rauen Endoplasmatischen Retikulum als inaktive Vorstufen synthetisiert und über einen Mannose-6-Phosphat-vermittelten Sortierungsprozess in die Lysosomen transportiert. Die Aktivierung der Cathepsine erfolgt bei saurem pH-Wert

autokatalytisch durch Abspaltung des Signalmoleküls. Die Lysosomendichte und somit die Menge an proteolytischen Enzymen variiert in den verschiedenen Geweben und Zelltypen und ist besonders hoch in Leber, Milz, Niere und Makrophagen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Cathepsine B (CTSB) und L (CTSL) gehören zur Familie der Cystein-Proteinasen, Cathepsin D (CTSD) ist eine Aspartat-Proteinase. Die Bedeutung dieser drei Cathepsine an der Pathogenese zahlreicher degenerativer, maligner und entzündlicher Erkrankungen soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.6.1 Die Cysteinproteinasen Cathepsin B und Cathepsin L

Lange Zeit wurde der terminale Proteinabbau als einzige Aufgabe der Cystein-Proteinasen innerhalb der Zelle postuliert [170]. Erst die Identifizierung weiterer Mitglieder dieser Enzymklasse und Studien an Cathepsin-defizienten Mäusen zeigte die große Bedeutung der Cystein-Proteinasen in zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen. Während CTSB- bzw. CTSL-defiziente Mäuse nur leichte phänotypische Veränderungen zeigen, führte eine simultane Defizienz postnatal innerhalb von 2 bis 4 Wochen aufgrund massiver Atrophien im Gehirn zum Tod der Tiere [171].

Die proteolytischen und degradativen Eigenschaften der lysosomalen Cysteinproteinasen spielen in zahlreichen degenerativen und chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Osteoporose, Krebsmetastasierung, rheumatoider Arthritis und infektiösen Erkrankungen eine bedeutende Rolle [154-156]. CTSL wird beispielsweise von Tumorzellen sezerniert und ermöglicht durch Degradation von Membrankomponenten die Tumordinvasion und -metastasierung [172]. Durch die Fähigkeit zum Abbau von Kollagenase- und Elastase ist CTSL auch in pathologische Vorgänge bei Arteriosklerose und dem Lungenemphysem involviert [173]. CTSL ist weiterhin an der Degradation der invarianten Kette in der MHC-II-vermittelten Antigenpräsentation beteiligt [174].

Zahlreiche Tumorerkrankungen sind mit einer erhöhten CTSB-Expression assoziiert, z.B. Tumore des Gastrointestinaltraktes, des Ösophagus, der Harnblase oder Prostata sowie maligne Melanome [157;158;175]. Seit einigen Jahren wird deshalb CTSB als prognostischer Marker für Prostatakarzinome in der Klinik eingesetzt und der weitere Einsatz für gastrointestinale Tumore und Harnblasenkarzinome diskutiert.

1.6.2 Die Aspartat-Proteinase Cathepsin D

Die Aspartat-Proteinase CTSD erfüllt in der Zelle physiologische, aber auch degenerative Funktionen. Durch die Sekretion des Proteins kann CTSD seine destruktive Wirkung sowohl intrazellulär als auch extrazellulär durch den Verdau extrazellulärer Matrixproteine entfalten [176;177]. Eine erhöhte Expression wurde z.B. in der Wundheilung und Psoriasis beschrieben. CTSD ist ebenfalls in zahlreichen Tumoren (kolorektales Karzinom, Magenkarzinom, Brustkrebs) verstärkt nachweisbar und fungiert als prognostischer Indikator bei Brustkrebs [177;178]. Die degradierenden Eigenschaften dieser Proteinase zeigten sich auch im Tiermodell. CTSD-defiziente Mäuse sterben postnatal an Tag 26 aufgrund massiver intestinaler Nekrose, Thromboembolie und Lymphopenie [179].

In IMAC von MC-Patienten wurde eine Induktion der CTSD Synthese nachgewiesen, während in IMAC gesunder Kontrollen kein CTSD detektiert werden konnte [180].

1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Trotz der mittlerweile über sieben Jahrzehnte zurückliegenden Erstbeschreibung des MC und der weltweiten Forschung an CED stehen Wissenschaftler noch immer vor einer Vielzahl ungeklärter Fragen. Ein Meilenstein der CED-Forschung war die Identifizierung des Suszeptibilitätsgens NOD2/CARD15 und der Polymorphismen SNP8, SNP12 und SNP13, welche in die Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei MC-Patienten involviert sind. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die sensorischen und regulatorischen Funktionen des Proteins wurden und werden kontrovers diskutiert. Auch der Einfluss der bakteriellen und insbesondere der kommensalen Darmflora, in Kooperation mit einem möglicherweise fehlregulierten intestinalen Immunsystem, auf die chronische Entzündung ist bisher nicht eindeutig geklärt. Einstimmig indiziert das Krankheitsbild MC ein multifaktorielles Ereignis, dessen primäre Ursache nicht bekannt ist.

Im Fokus dieser Arbeit sollte die Untersuchung der potentiellen bakteriellen Translokation in das intestinale Gewebe im Krankheitsbild MC stehen. Dabei sollte analysiert werden, ob der NOD2/CARD15-Genotyp einen Einfluss auf die Invasion bakterieller Keime hat und welche Auswirkungen der bakterielle Stimulus auf die Regulation der Entzündung sowie intrazelluläre Prozesse hat.

- (1) Zunächst sollte die bakterielle Translokation aus dem Darmlumen in die intestinale Mukosa im Krankheitsbild MC in Patienten mit und ohne NOD2/CARD15 Mutationen untersucht werden.
- (2) Daraufhin sollte ein potentieller Weg der bakteriellen Invasion durch Überwindung der epithelialen Zell-Zell-Kontakte analysiert werden. Hierfür sollte besonders die möglicherweise veränderte Synthese prominenter Zell-Zell-Kontaktproteine untersucht werden, um Aussagen über die Funktionalität der intestinalen Barriere treffen zu können.
- (3) Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung des Einflusses der bakteriellen Translokation auf die Regulation des bakteriellen Sensorproteins NOD2/CARD15 und die intestinale Entzündung im Krankheitsbild MC sein. Hierfür sollte zunächst die Aktivität des NOD2/CARD15 Promotors in Anwesenheit eines bakteriellen Stimulus (MDP) untersucht werden. Der NOD2/CARD15-vermittelte Signalweg resultiert in der Aktivierung von NF- κ B, wodurch die Synthese

proinflammatorischer Immunmediatoren induziert wird. Es sollte deshalb der Einfluss des NOD2/CARD15 Genotyps auf die NF- κ B Aktivierung im Krankheitsbild MC untersucht werden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesene erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität bei MC mit dem Genotyp der Patienten assoziiert ist [91].

- (4) Ein weiterer Vertreter der NOD-Proteinfamilie ist Nalp3, ein Mitglied des „Inflammasom“-Multiproteinkomplexes. Nalp3 bindet aufgrund struktureller Homologien zu NOD2/CARD15 ebenfalls bakterielle Zellwandbestandteile und fungiert somit ebenfalls als intrazelluläres bakterielles Sensorprotein. Es sollte daher untersucht werden, ob die bakterielle Translokation im Krankheitsbild MC einen Einfluss auf die Regulation von Nalp3 und des Inflammasom-Signalweges hat und welche Zelltypen primär daran beteiligt sind.
- (5) Inwieweit die bakterielle Translokation auf andere entzündungsfördernde und gewebedegradierende Prozesse Einfluss nimmt, ist nicht bekannt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die lysosomale Proteinase CTSD im Krankheitsbild MC induziert wird [180]. Cathepsine spielen neben der finalen Proteindegradation im normalen Zellstoffwechsel eine große Rolle bei zahlreichen destruktiven und malignen Erkrankungen. Es sollte deshalb untersucht werden, ob diese proteolytischen Enzyme am massiven Gewebeabbau in der intestinalen Mukosa von MC-Patienten beteiligt sind und ob die Modulation ihrer Aktivität einen Therapieansatz für CED darstellen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die im Zusammenhang mit anderen pathophysiologischen Vorgängen am besten charakterisierten Cathepsine B, L und D untersucht werden.

Kapitel 2

Material

2.1 Zellkultur

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Adrich Chemie, Steinsheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) 4,5 g/l Glukose	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	Pan Biotech, Aidenbach
FuGene 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAs)	Biochrom, Berlin
Muramylidipeptid	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
RPMI-1640	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Trypsin ohne EDTA	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

2.2 Isolierung humaner *Lamina propria* mononukleärer Zellen (LPMNZ)

DNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
EDTA (Ethylendiamin-Tetraacetat)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ficoll-Paque®	Pharmacia, Freiburg
HBSS	Biochrom, Berlin
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kollagenase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
RPMI-1640 Kulturmedium	Biochrom, Berlin
Trypanblau	Biochrom, Berlin

2.3 *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

anti-human IL-8 monoklonaler Antikörper	Biozol, Eching
anti-IL-8 biotinylierter Antikörper	Biozol, Eching
Schwefelsäure	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
Streptavidin- <i>Horseradish</i> -Peroxidase	Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg
3,3', 5,5'-Tetramethyl-Benzidin Liquid Substrate System (TMB)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.4 Proteinbestimmung

<i>Bicinchoninic Acid Solution</i> (BCA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Cu ²⁺ (<i>copper (II) sulfat pentahydrate solution</i>)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Triton-X	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
----------	-------------------------------

2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Durchflusszytometer Coulter [®] EPICS [®] X - MCL [™]	Coulter, Immunotech, Krefeld
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Polystyrol Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit Isoton [®] II	Coulter, Immunotech, Krefeld

2.6 *in vivo* Experimente

Dextran <i>Sodium</i> Sulfat (DSS)	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
L-trans-Epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH Propylamid (CA-074)	Bachem, Weil am Rhein
Pepstatin A	Chemicon, Hampshire, UK
Z-Phe-Tyr-Aldehyd	Bachem, Weil am Rhein

2.7 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe
<i>Faramount Aqueous Mounting Medium</i>	Dako, Hamburg
Fettstift	Dako, Hamburg
Hyperfilm [™] ECL	Amersham Life Science, Braunschweig
LS Separationssäule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>Mounting Medium</i> mit DAPI	Linaris, Wertheim
Multiwell-Platten (6-; 96 well)	Cell Scraper, Costar, Krackeler Scientific, Albany, NY, USA
0,5 ml PCR Tubes	Biozym, hess. Oldendorf
Petrischalen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,0 ml; 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Superfrost Plus® Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tissue Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar, Cambridge, USA

2.8 Geräte

Analysenwaage, <i>sartorius analytic</i> A120 S	Sartorius, Göttingen
Biofuge15 Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Brutschrank Heraeus 6000	Sepatech, Osterode
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
ELISA <i>Reader</i>	MWG Biotech, Denkendorf
Kryostat CM 3050S	Leica, Bensheim
Luminex® 100™	Upstate, Charlottesville, VA, USA
Megafuge Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Microm HM 400	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Leitz DM RBE	Leica, Bensheim
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Meter	wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	PMF, Köln
Sterilbank LaminAir HSB 2472 S	Sepatech, Osterode
SuperMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Top-Count <i>Microplate Scintillation Counter</i>	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Waage <i>sartorius excellence E1200 S</i>	Sartorius, Göttingen
X-Cell <i>SureLock™</i> Mini-Cell & II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe

2.9 Fertigkombinationen von Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Fertigkombinationen von Biochemikalien („Kits“) sind mit deren Bezugsquellen in folgender Tabelle zusammengefasst. Kits, die Oligonukleotide enthalten, sind mit Buchstaben gekennzeichnet. Die jeweiligen Oligonukleotide sind unter 2.10 zusammengefasst:

Caspase-1 <i>Fluorometric Assay</i>	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Cathepsin D Assay Kit	Sigma, Steinheim
<i>Dynabeads® mRNA DIRECT</i> Kit	Dynal®, Hamburg
<i>Fast-Link™ Ligation Kit</i>	Epicentre®, Madison, WI, USA
<i>Gene Checker™ Kit (A)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>HotStartTaq® Master Mix Kit</i>	Qiagen, Hilden
Human GAPDH Mix (20 x) (B)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Human IL-8 ELISA	Biozol, Eching
Innozyme™ <i>Cathepsin B Activity Kit</i>	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Innozyme™ <i>Cathepsin L Activity Kit</i>	Calbiochem, San Diego, CA, USA
<i>Micro Beads (MACS Beads)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>Reverse Transcription System</i>	Promega, Mannheim
<i>Taqman® Universal Master Mix</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>TOPO™ TA Cloning® Kit (B)</i>	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

2.10 Oligonukleotide

2.10.1 Oligonukleotide für qualitative PCR

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aus Fertigkombinationen von Biochemikalien sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Die jeweiligen Kits sind unter 2.9 aufgeführt:

GAPDH for	5' TTA GCA CCC CTG GCC AAG G 3'
GAPDH rev	5' CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG 3'
5'β Actin for	5' GCT CAC CAT GGA TGA TGA TAT CGC 3'
5'β Actin rev	5' GGA GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC 3'
3'β Actin for	5' GAA GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC 3'
3'β Actin rev	5' CTG GTC TCA AGT CAG TGT ACA GG 3'
6K Clathrin for	5' GAC AGT GCC ATC ATG AAT CC 3'
6K Clathrin rev	5' TTT GTG CTT CTG GAG GAA AGA A 3'
2K Clathrin for	5' GCT CAC ATG GGA ATG TTC AC 3'
2K Clathrin rev	5' ATG TTG TCA AAG TTG TCA TAA G 3'

Selbst konstruierte Primer sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

Cathepsin B for	5' TCG GAT GAG CTG GTC AAC TAT G 3'
Cathepsin B rev	5' TCC AAG CTT CAG CAG GAT AG 3'
Cathepsin L for	5' GAC AGG GAC TGG AAG AGA G 3'
Cathepsin L rev	5' GTT TCC CTT CCC TGT ATT C 3'
Nalp 3 for	5' AGG CGG ATG TGT CTG CTT TC 3'
Nalp 3 rev	5' GAT GCT GGA GCG TTT CAC AC 3'

2.10.2 Oligonukleotide für *Real-Time* PCR

Cathepsin B for	5' TCA ACT ATG TCA ACA AAC GGA ATA CC 3'
Cathepsin B rev	5' CAA GTA GCT CAT GTC CAC GTT GTA 3'
Cathepsin B <i>probe</i>	5'-FAM-TGG CAG GCC GGG CAC AAC TT-TAMRA-3'
Cathepsin L for	5' TAG AGG CAC AGT GGA CCA AGT G 3'
Cathepsin L rev	5' ACT GCT CTC CTC CAT CCT TCT TC 3'
Cathepsin L <i>probe</i>	5'-FAM-AGG CGA TGC ACA ACA GAT TAT ACG GCA-TAMRA-3'
Nalp 3 for	5' TGC CCC GAC CCA AAC C 3'
Nalp 3 rev	5'-CGT CCA TGA GGA AGA GGA TTC T-3'
Nalp 3 <i>probe</i>	5'-FAM-ACC CAT CCA CAA GAT CGT GAG AAA ACC C-TAMRA-3'

2.10.3 Oligonukleotide für Promoterklonierung

Bei den unterstrichenen Sequenzabschnitten handelt es sich um die zur Klonierung benötigten und an die Primer angehängten Restriktionsschnittstellen.

Nod2_pr_for	5' GCA <u>CGC GTT</u> GGG AGT TGC TTA GCG GAG 3'
Nod2_pr_rev	5' GCA <u>AGC TTT</u> CTA CCA ACC CCA CCT TC 3'

2.10.4 Sonden für die Fluoreszente *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden für die Fluoreszente *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

<i>Universal Bacteria Antisense</i> , 16S rRNA (EUB 338) Cy3	5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3'
<i>Universal Bacteria Nonsense</i> 16S rRNA (EUB 338) Cy3	5' CCT CCC ATC CGG TAG AAC 3'

2.11 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Antikörper und Seren sind in folgender Tabelle unter Angabe des Konjugats, des Spenderorganismus, des Klons und des Herstellers zusammengefasst:

mk – monoklonaler Antikörper

pk – polyklonaler Antikörper

Antikörper	Konjugat	Spender	Klon	Hersteller
anti-Actin, mk	ohne	Maus IgG ₁	C4	Chemicon, Hampshire, UK
anti-β-Catenin	ohne	Maus IgG ₂	7D11	Biomol, Hamburg
anti-Cathepsin B, pk	ohne	Kaninchen Ig	-	Serotec, Oxford, UK
anti-Cathepsin L, mk	ohne	Maus IgG ₁	N135	Serotec, Oxford, UK
anti-Claudin-1, pk	ohne	Kaninchen Ig	-	Zymed, South San Francisco, CA, USA
anti-Claudin-1, pk	ohne	Kaninchen Ig	-	Acris, Hiddenhausen
anti-Claudin-2, pk	ohne	Kaninchen Ig	-	Zymed, South San Francisco, CA, USA
anti-Claudin-2, pk	ohne	Kaninchen Ig	-	Acris, Hiddenhausen
anti-Claudin-4, mk	ohne	Maus IgG ₁	3E2C1	Zymed, South San Francisco, CA, USA
anti-Claudin-4, pk	ohne	Kaninchen Ig	-	Acris, Hiddenhausen
anti-CD33, mk	MicroBeads	Maus IgG ₁	P67.6	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD68, mk	FITC	Maus IgG _{1κ}	KP1	Dako, Glostrup, DK
anti-E-Cadherin, pk	ohne	Kaninchen	-	Cell Signaling/NEB, Frankfurt M.
anti EP2, mk	ohne	Kaninchen	-	Cayman, Tallin, Estland
anti- <i>fluoresceine</i> NEF 720, pk	HRP	Schaf	-	PerkinElmer, Boston, MA, USA

Antikörper	Konjugat	Spender	Klon	Hersteller
anti-Gram Negative Endotoxin, mk	ohne	Maus IgG _{2a}	B40/23	Acris, Hiddenhausen
anti- <i>mouse</i> IgG ₁	PE	Ziege	keine Angabe	Caltag, Hamburg
anti-IL-18, pk	ohne	Kaninchen	-	Abcam, Cambridge, UK
anti- <i>mouse</i> IgG	Alexa Fluor [®] 488	Ziege	-	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti- <i>mouse</i> IgG	Alexa Fluor [®] 546	Ziege	-	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti- <i>mouse</i> IgG (H+L), mk	Biotin	Ziege	keine Angabe	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
anti-Nalp3, mk	ohne	Maus IgG ₁	Nalpy3-a	Abcam, Cambridge, UK
anti-NF-kappaB (p65), mk	ohne	Maus IgG ₃	keine Angabe	Chemicon, Hampshire, UK
anti-Occludin, mk	ohne	Maus IgG ₁	19	BD, San Diego, CA, USA
anti-Occludin, mk	FITC	Maus IgG _{1κ}	OC-3F10	Zymed, South San Francisco, CA, USA
anti- <i>rabbit</i> , IgG (H+L)	Biotin	Ziege	keine Angabe	Acris, Hiddenhausen
anti- <i>rabbit</i> IgG	Alexa Fluor [®] 488	Ziege	-	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti- <i>rabbit</i> IgG	Alexa Fluor [®] 546	Ziege	-	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-ZO-1, mk	ohne	Maus IgG ₁	1	BD, San Diego, CA, USA
<i>goat</i> IgG ₁	PE	Ziege	keine Angabe	Caltag, Hamburg
<i>mouse</i> IgG _{1κ} , mk	ohne	Maus	keine Angabe	Sigma, Steinheim
<i>mouse</i> IgG (H+L), pk	FITC	Schaf	-	Acris, Hiddenhausen
<i>mouse</i> IgG _{3κ} , mk	ohne	Maus	keine Angabe	Acris, Hiddenhausen

Antikörper	Konjugat	Spender	Klon	Hersteller
<i>rabbit</i> Immunglobulin Fraction	ohne	Kaninchen	keine Angabe	Dako, Hamburg
Ziegenserum	ohne	Ziege	keine Angabe	Dako, Hamburg
Kaninchen Serum	ohne	Kaninchen	keine Angabe	Dako, Hamburg

2.12 Nährmedien und Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien für die Bakterienkultur sind in folgender Tabelle aufgeführt:

LB₀ (Luria broth)	Bacto Trypton (Difco, Detroit, USA)	10 g
	Hefeextrakt (Difco)	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	mit 1 N NaOH pH 7,2 einstellen	
	für LB ₀ -Platten:	
	Agar (Difco) zugeben, autoklavieren	12 g
Ampicillin		100 µg/ml

2.13 Puffer und Lösungen

Lösungen und Medien für die Makrophagenisolierung und Zellkultur:

PBS (10 x)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	21,6 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	H ₂ O, pH 7,2 einstellen	ad 1 l

MACS Puffer	EDTA 0,5 M; pH 8,0	0,5 ml
	BSA Stufe IV oder V	0,25 g
	PBS	ad 50 ml
	sterilfiltrieren und entgasen	
Makrophagenmedium	RPML-1640 Medium	500 ml
	FKS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
HT-29 Medium	DMEM (1 g/l Glukose)	500 ml
	FKS	50 ml
	NEAs	5 ml
	Natriumpyruvat	5 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml

Lösungen und Zubehör für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung):

TAE (50 x)	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA pH 8,0	50 mM
Ladepuffer	Glycerin	5,47 ml
	Bromphenolblau	25 mg
	Xylencyanol	25 mg
	EDTA (0,5 M)	2 ml
	H ₂ O	ad 10 ml
DNA-Agarosegel	Agarose gelöst in TAE (1 x)	1 – 2% (w/v)
Ethidiumbromid- lösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	0,04%
E-Gel® 0,8% oder 1,2%	Invitrogen, Karlsruhe	

Lösungen und Zubehör für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)
und Western Blot (WB):

NuPAGE® <i>Sample Reducing Agent</i> (10 x)	Invitrogen
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1mm x 10 well	Invitrogen
NuPAGE® LDS <i>Sample Buffer</i> (4 x)	Invitrogen
NuPAGE® MOPS <i>SDS Running Buffer</i> (20 x)	Invitrogen
Novex® 4-12% Tris-Glycin-Gel 1mm x 10 well	Invitrogen
Novex® Tris-Glycin <i>SDS Sample Buffer</i> (2 x)	Invitrogen
Novex® Tris-Glycin <i>SDS Running Buffer</i> (10 x)	Invitrogen
Novex® Tris-Glycin <i>Transfer Buffer</i> (25 x)	Invitrogen
NuPAGE® <i>Transfer Buffer</i> (20 x)	Invitrogen

Sonstige Puffer:

Waschpuffer für WB	5 M NaCl	20 ml
	0,5 M Tris pH 6,8	20 ml
	TWEEN 20	1 ml
	H ₂ O	ad 1 l
Blockierlösung für WB	Waschpuffer	20 ml
	Magermilchpulver	5 g
	BSA	2 g
Prähybridisierungs- lösung / Waschpuffer für FISH	0,9 M NaCl	500 ml
	20 mM Tris-HCl pH 7,4	50 ml
	0,01% SDS	5 ml
Hybridisierungs- lösung für FISH	0,9 M NaCl	500 ml
	20 mM Tris-HCl pH 7,4	50 ml
	0,05% SDS	5 ml
	5 ng/ml Sonde (2.10.4)	5 ml
DAPI	DAPI	2 mg
	SDS	100 mg
	Puffer (0,05 M EDTA; 0,7 M Natrium- Acetat; pH 7,4)	100 ml
Puffer A (MPO)	Hexadecyltrimethylammoniumbromid	0,5 g
	0,05 M Phosphatpuffer	100 ml

Puffer B (MPO)	0,05 M Phosphatpuffer	60 ml
	Dianisidine	0,01 g
	H ₂ O ₂	1 µl
Phosphatpuffer (MPO)	1 M KH ₂ PO ₄ 1 M K ₂ HPO ₄ pH 6,0 einstellen	

2.14 Reagenzien zur Messung der H₂O₂-Produktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien zur Messung der H₂O₂-Produktion durch IMAC sind im Folgenden aufgeführt:

Dimethylformamid (DMF) (Sigma-Aldrich Chemie)	
Dihydrorhodamin 123 (DHR) (BD, Heidelberg)	Stammlösung: 1,1 mM DHR in DMF
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) (Sigma-Aldrich Chemie)	Stammlösung: 1 mM PMA in DMF

2.15 Größenstandards

Die Größen der Nukleinsäurefragmente wurden mit den Größenstandards GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus und GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) bestimmt.

Die Molekulargewichte der Proteine wurden mit dem Proteinstandard SeeBlue® Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe) definiert.

2.16 Vektoren und Organismus

Der in dieser Arbeit verwendete Plasmidvektor pGL3-Basic (4818 bp) wurde von der Firma Promega (Mannheim) bezogen.

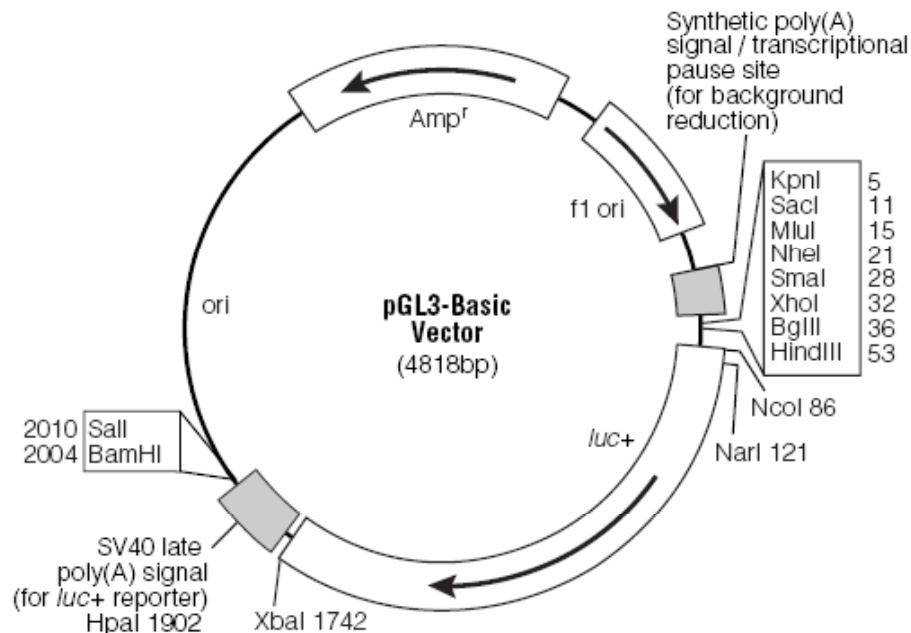


Abb. 2.1: Vektorkarte pGL3-Basic

Vektorkarte des pGL3-Basic Vektors (Promega, Mannheim). *luc+* (Firefly Luciferase Gen), *Amp^r* (β -Lactamase Gen), *f1 ori* (origin of replication), *ori* (origin of replication in *E. coli*). Die Pfeile innerhalb des *luc+* und des *Amp^r* Gens zeigen die Transkriptionsrichtung an. Der Pfeil in *f1 ori* beschreibt die Richtung der DNA Einzelstrangsynthese.

Der für die Stimulationsversuche verwendete Plasmidvektor pcDNA3.1 inklusive der modifizierten Vektoren pcDNA3.1_NOD2/CARD15 sowie pcDNA3.1_SNP13 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. S. Schreiber (Universitätsklinikum Kiel) zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Zellen (*TOP 10*) stammten aus dem TOPO[®] XL-PCR Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) und hatten folgenden Genotyp:

F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Θ80/lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen

In dieser Arbeit wurden differenzierungsspezifische und entzündungsinduzierte Proteine intestinaler Makrophagen identifiziert und funktionell charakterisiert. Voraussetzung für die Durchführung der phänotypischen und funktionellen Untersuchungen war die Isolierung der dazu erforderlichen reinen Zellpopulationen von primären humanen Makrophagen der *Lamina propria* aus Darmresektaten (3.1.1.1).

3.1.1.1 Isolierung humaner *Lamina propria* mononukleärer Zellen aus Resektaten

Humane *Lamina propria* mononukleäre Zellen (LPMNZ) wurden aus chirurgischen Darmresektaten nach einem modifizierten Protokoll von Bull [181] gewonnen. Anschließend wurden aus den LPMNZ mittels magnetischer Zellsortierung (3.1.1.2) Makrophagen isoliert. Die Isolierung der LPMNZ beinhaltete das biochemische Ablösen der Epithelzellen vom Resektat, den enzymatischen Aufschluss der *Lamina propria* und das physikalische Abtrennen der nicht mononukleären Zellen.

Die 4 - 16 cm² großen Darmresektate wurden mit 10 ml PBS von Stuhlresten befreit. Zur Abtrennung von Schleim und Muzinen wurde die *Lamina propria* in 1mM Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) in 10 ml PBS für 15 min bei 37 °C geschüttelt (Abb. 3.1). Die Rückstände wurden mechanisch entfernt und die Inkubation wiederholt. Zur Abtrennung von Epithelzellen und Krypten wurde die *Lamina propria* in 2 mM EDTA in 10 ml

Hank's buffered salt solution (HBSS, Biochrom, Berlin) stark gevortext. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt.

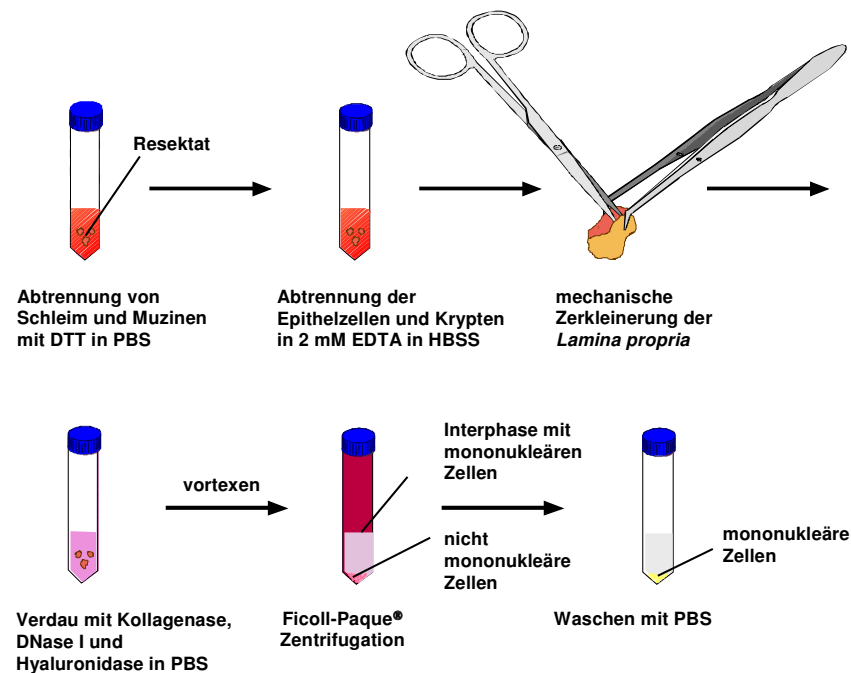


Abb. 3.1: Isolierung humaner Lamina propria mononukleärer Zellen (LPMNZ)

Darstellung der Isolierung humaner LPMNZ aus Darmresektaten. Nach der Abtrennung von Schleim, Epithelzellen und Krypten wurde die Lamina propria mechanisch zerkleinert und verdaut. Mononukleäre Zellen wurden über Ficoll-Paque® abgetrennt und mit PBS gewaschen.

Zum enzymatischen Aufschluss wurde die verbleibende *Lamina propria*, die nun keine Epithelzellen und Krypten mehr enthielt, mechanisch zerkleinert und mit 1 mg/ml Kollagenase Typ I (= 336 U/ml, Sigma-Aldrich), 0,3 mg/ml Desoxyribonuklease (DNase I, Boehringer, Mannheim) und 0,2 mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) in geeigneter Menge PBS für 1 h bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Nach ausgiebigem Vortexen wurden herausgelöste Zellen durch ein Sieb (70 µm) abgetrennt und in PBS gewaschen.

Mononukleäre Zellen (Makrophagen, Lymphozyten) wurden über Ficoll-Paque® (Pharmacia, Freiburg) Zentrifugation von nicht mononukleären Zellen (Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) abgetrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch in 15 ml Makrophagenmedium (2.13) aufgenommen, über 15 ml Ficoll geschichtet und 20 min bei 700 g und 4 °C zentrifugiert. Die mononukleären Zellen der Interphase wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe magnetischer Zellsortierung (3.1.1.2) Makrophagen isoliert.

3.1.1.2 Isolierung intestinaler Makrophagen mittels magnetischer Zellsortierung

Die Isolierung intestinaler Makrophagen aus LPMNZ erfolgte mit Hilfe immunomagnetischer MicroBeads (Miltenyi Biotec), die an anti-CD33 Antikörpern gekoppelt sind.

Die LPMNZ wurden zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen in 200 µl MACS Puffer (2.13) aufgenommen und mit 400 ng/ml Maus IgG₁ Antikörper (Sigma) 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift wurden die Zellen für weitere 15 min mit den anti-CD33 gekoppelten MicroBeads bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend erneut gewaschen und in 1 ml MACS Puffer aufgenommen. Für die folgende Isolierung wurde eine LS Separationssäule (Miltenyi Biotec) mit MACS Puffer gespült, mit einer 24 gauge Kanüle versehen, in das magnetische Feld des SuperMACS Magneten (Miltenyi Biotec) gebracht und mit den Zellen beladen (Abb. 3.2). Nach einem Waschschrift mit 1 ml MACS-Puffer wurde die Separationssäule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit einer Spritze eluiert. Zur Steigerung der Reinheit wurde das Eluat erneut im Magnetfeld auf eine Separationssäule aufgetragen und gewaschen. Die Elution der reinen Makrophagen erfolgte schließlich außerhalb des Magnetfeldes mit 4 ml MACS Puffer.

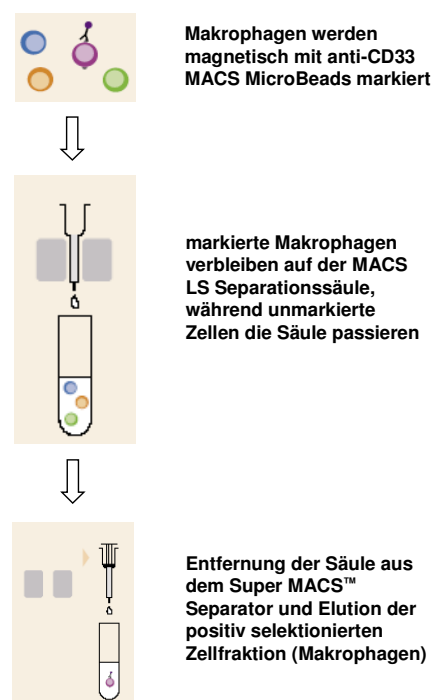


Abb. 3.2: Magnetische Zellsortierung

Darstellung der magnetischen Zellsortierung mit Hilfe von MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Mit anti-CD33 Antikörpern markierte LPMNZ werden auf eine LS Separationssäule geladen und in das Feld des Super MACS™ Separators gebracht. Markierte Zellen (Makrophagen) werden angereichert und eluiert.

3.1.1.3 Isolierung von Monozyten aus Blut

Monozyten wurden von Mitarbeitern der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Monozyten beinhaltete die Leukapherese [182], die Dichtegradientenzentrifugation [183] und die Gegenstromzentrifugation [184].

3.1.1.4 Herstellung von multizellulären Sphäroiden (MZS)

MZS wurden nach dem Verfahren der *liquid overlay* Kultur hergestellt [185]. Zunächst wurden in die benötigten Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte jeweils 50 µl 1%ige Agarose pipettiert. Nach dem Aushärten der Agarose wurden je 4×10^3 HT-29 Zellen in 200 µl Medium in die beschichteten Vertiefungen eingebracht. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10% CO₂ für sieben Tage inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich aus den Zellen dreidimensionale kugelige Sphäroide aus, zu denen nun Blutmonozyten zugegeben wurden.

Nach zweimaligem Waschen mit Medium (ohne FKS) wurden je 100 µl Medium und 4×10^5 frisch elutrierte Monozyten in 100 µl Medium zu jedem Sphäroid pipettiert und diese für 24 h, drei und sieben Tage bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert. Nach der Ernte wurden die Sphäroide in *TissueTek* eingebettet und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Zelllinien

HEK293T

HEK293 ist eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer humanen embryonalen Nierenzelle (*Human Embryonic Kidney*) mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Hierbei wurden 4,5 kb des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzelle eingebracht. Eine Variante der HEK293 Zellen sind die HEK293T-Zellen, die zusätzlich das SV40 *large T-Antigen* besitzen, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem SV40 *origin of replication* ermöglicht.

Die Zelllinie wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen mit DMEM (*high Glucose*) Medium bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden zugegeben, welche nach 3 min Einwirkzeit wieder

abgesaugt wurde. Die Zellen wurden vom Boden abgeklopft und abgespült, in 10 ml DMEM Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

HT-29

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 stammt initial aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit HT-29 Medium (2.13) bei 37 °C und 10% CO₂. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 0,5% Trypsin in PBS zugegeben, das nach 10 minütiger Einwirkzeit wieder abgesaugt wurde. Die Zellen wurden vom Boden abgeklopft und abgespült, in 10 ml Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.2 RNA-Isolierung

3.2.1 polyA mRNA-Isolierung

Die Isolierung von polyA mRNA erfolgte mit dem Dynabeads[®] mRNA DIRECT Kit (Dyna[®], Hamburg). Aus magnetisch sortierten Zellen (Makrophagen, 3.1.1.2) wurde mit Dynabeads[®] (magnetische Beads an einem (dT)₂₅ Oligonukleotid) polyA mRNA isoliert (Abb. 3.3).

Magnetsortierte Makrophagen (3.1.1.2) wurden zunächst mit 1 ml Lyse-/Binde-Puffer lysiert. Um die Viskosität des Lysats zu reduzieren, wurden die Zellen durch eine 21 gauge Kanüle gedrückt. 250 µl Dynabeads Oligo (dT)₂₅ wurden mit Lyse-/Binde-Puffer gewaschen und mit dem Zelllysats vereint. Die Hybridisierung der Dynabeads Oligo (dT)₂₅ an den polyA Schwanz der mRNA erfolgte unter moderatem Schütteln für 3 bis 5 min bei RT. Zur Abtrennung der mRNA wurde das Lysat für 2 min im MPC[®] (*magnetic particle concentrator*) inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die mRNA zweimal mit 1 ml Waschpuffer mit LiDS und einmal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Zum Abschmelzen der Dynabeads Oligo (dT)₂₅ wurde die mRNA in 10 µl Elutionslösung aufgenommen, für 2 min bei 65 °C inkubiert und in den MPC[®] überführt. Der Überstand mit der eluierten mRNA wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

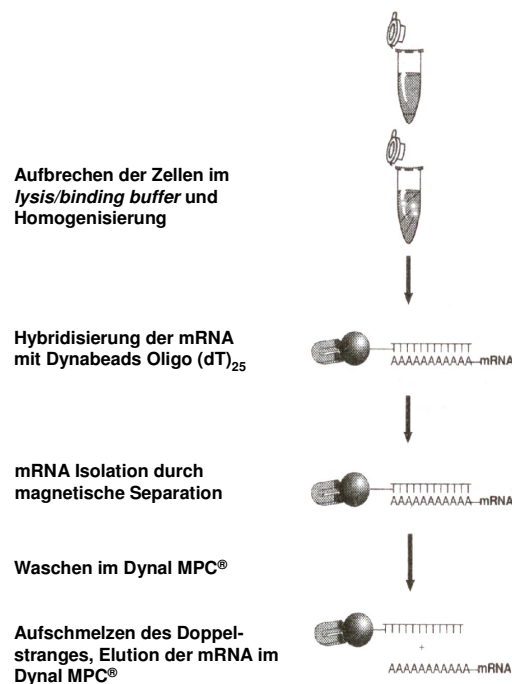


Abb. 3.3: polyA mRNA-Isolierung

Darstellung der polyA mRNA-Isolierung mit Hilfe von Dynabeads® (Dyna®) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll.

3.2.2 Gesamt-RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysate erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Spin-Protokoll.

Zunächst wurden die Zellen ($< 5 \times 10^6$) in je 350 µl RLT-Puffer (mit β -Mercaptoethanol) aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Zelllysate konnte so bis zur eigentlichen RNA-Isolierung bei -80°C gelagert werden.

Um die RNA zu isolieren, wurde das Lysat aufgetaut, zur Homogenisierung mehrmals durch eine Spritzenkanüle aufgezogen und mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt. Das Lysat wurde nun auf eine RNeasy Mini Säule übertragen und bei 8000 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl Puffer RW1 und ein zweites Mal mit 500 µl RPE-Puffer durch jeweils 15 s Zentrifugation bei 8000 g gewaschen. Nachdem nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben wurden, erfolgte eine 2 minütige Zentrifugation bei 8000 g, um die Membran zu trocknen. Die RNA wurde mit 30 µl RNase freiem Wasser bei 8000 g Zentrifugation in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) eluiert.

3.3 Gelelektrophorese

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden kommerziell erhältliche Agarosegele der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers mit dem entsprechenden Laufmodul (E-Gel™ Power Base, Invitrogen) verwendet. Die Detektion der DNA Fragmente erfolgte durch Betrachtung des Gels unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm.

3.3.2 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach dem *Spin* Protokoll aus dem Gel eluiert.

Zur Isolierung wurde der die gewünschte Bande enthaltene Bereich mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Das Gelstück wurde gewogen, mit 3 Volumen Buffer QG versetzt und zum Schmelzen für 10 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und die Probe auf eine QIAquick Säule überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt und zwei weiteren Waschschritten mit 0,5 ml Puffer QG und Puffer PE wurde die DNA mit 30 µl H₂O eluiert.

3.3.3 Diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden 4-12% Bis-Tris-Gele und 4-12% Tris-Glycin-Gele der Firma Invitrogen verwendet.

Die aufzutragenden Proben (das Probenvolumen betrug 40 µl) wurden bei Verwendung von 4-12% Bis-Tris-Gelen mit 6x Probenpuffer (Invitrogen) bzw. bei Verwendung von 4-12% Tris-Glycin-Gelen mit 2x Lämmli-Proben-Puffer (Invitrogen) gemischt und 10 min bei 94 °C aufgekocht. Nach anschließendem Abkühlen wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für etwa 1 h (X-Cell *Sure Lock*™ Mini Cell, Invitrogen).

3.4 DNA-Klonierung

Mit Methoden der Molekularbiologie wurde ein DNA-Fragment in einen Plasmid-Vektor eingebracht. Zur Vervielfältigung wurden Bakterien (*TOP10*; 2.15) mit dem Plasmid transformiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus den Bakterienkulturen isoliert (3.5). Um das Luziferase Reporter Plasmid, welcher das gewünschte NOD2/CARD15 Promotorkonstrukt enthielt, zu klonieren, musste zunächst die Promotorsequenz aus humaner DNA mit Hilfe der unter 2.10.3 aufgeführten Primer amplifiziert werden. Die Primer wurden mit den für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen (ACG CGT für *MluI*, AAC GTT für *HindIII*) versehen. Folgende Reaktionsbedingungen wurden zur Amplifikation verwendet:

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Primer for (5 µM)	3 µl	2 min	94 °C
Primer rev (5 µM)	3 µl	14 s	94 °C
10 x Puffer für KOD Hot Start DNA Pol	5 µl	30 s	58 °C
dNTPs (Endkonzentration 0,2 mM)	5 µl	2 min	72 °C
MgSO ₄ (Endkonzentration 1 mM)	2 µl	} 34 x	
DNA (50 ng)	1 µl		
KOD Polymerase (1 U/µl, Novagen)	1 µl		
H ₂ O	30 µl	4 min	72 °C
		∞	4 °C

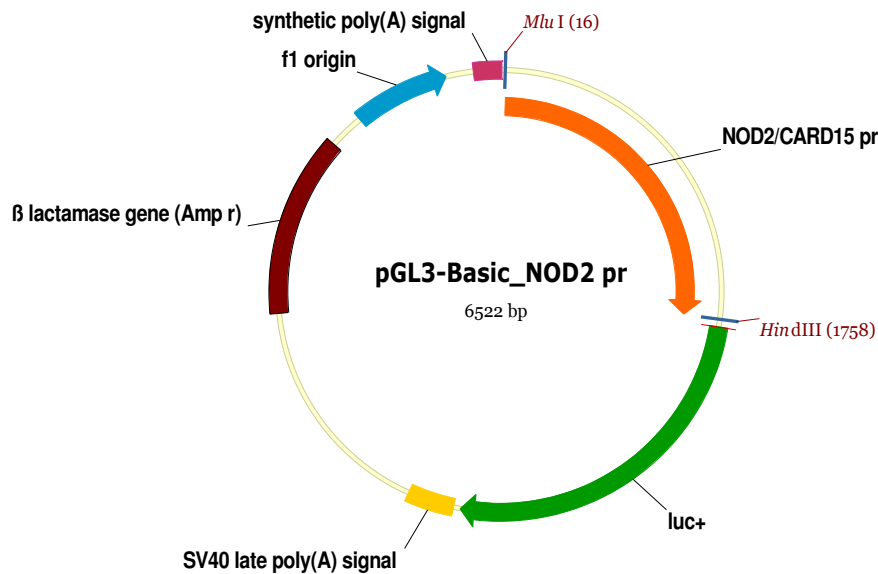
Ein Aliquot des erhaltenen Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Produkts wurde zur Kontrolle des Amplifikationserfolges auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein präparatives 1%iges Agarosegel aufgetragen und die DNA aus dem Gel eluiert (3.3.2).

Um das NOD2/CARD15 Promotorfragment in den Zielvektor klonieren zu können wurden sowohl der Vektor (pGL3-Basic) als auch das Insert (NOD2/CARD15 Promotorfragment (pr)) mit den Restriktionsendonukleasen *MluI* und *HindIII* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und dem entsprechenden Puffer R (MBI Fermentas) 3 h bei 37 °C verdaut. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste durch Behandlung mit *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (MBI Fermentas) dephosphoryliert. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Dephosphorylierung durch 15minütige Inkubation bei 65 °C abgestoppt.

SAP-Behandlung	
DNA	1 µg
10 x Puffer für SAP	5 µl
SAP (2 U/µg)	1 µl
H ₂ O	14 µl

Die Ligation des Zielvektors mit dem Insert erfolgte mit Hilfe des Fast-Link™ Ligation Kits (Epicentre®, Madison, WI, USA) nach der Anleitung des Herstellers. Anschließend wurde der Ligationsansatz für 2 x 20 min in Wasser dialysiert und elektrokompetente *TOP10* Bakterien wurden transformiert.

Die kompetenten *TOP10* Zellen (2.15) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt. Die Transformation erfolgte in speziellen Küvetten bei 2,5 kV, 25 µF und 200-500 Ω. Die transformierten Bakterien wurden sofort für 2 min auf Eis überführt und anschließend in 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37 °C geschüttelt. 10 µl und 80 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB_{amp} Platten ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die resistenten (transformierten) Klone in je 5 ml LB_{amp}-Medium angeimpft und für 14-16 h bei 37 °C geschüttelt. Die modifizierte Vektor-DNA wurde anschließend aus der Bakterienkultur isoliert (3.5) und durch Sequenzierung (3.8) analysiert.

A**B**

```

1501 ggtctgagct tctggaggtt tgaagctgcc atgaactgaa taggaagtta cttacggaag
1561 agtcaagag tttggttttg tgcttgtgga gtttgagctg cccattaggc atcaatgatg
1621 agtaagcagt tgggaaaagt taagggcgga ggttggagtt gaaaaataaaa ctttgggcat
1681 catcaccata taactggtat ttaaagccac aagagcaggt gggctcatct agggatggag
1741 tgatatggag aagagaaggg gtctaaccat tgagtgtctg ggccccagtt gtttaggaacc
1801 agccaagaag acagaaagag tgaatatcag agagttgggg tgctctggag gaaatgaaga
1861 aaatgcccc aagaggaagg agggaacaaa tatgaccaat gcccctggca gagcaagcag
1921 gctgagggct gaggattgag caatgggagg tcaactggtg cagtttcact ggagctggat
1981 ggggaactag agggaatggg aggggatggg aggaactggg gacagcagta caggcaacag
2041 acaagggggc ctgctgtaaa gggagcagat aaatgggatt ggagccaaat gaagaagggg
2101 agtgtcaaga gagtgcctta cttttacaat ggagaattag agtgcatgtg gcaactggtg
2161 ggggatttga tctcttaggg agagaacagt gttagggagg gagaatgcag gatagctggg
2221 ggaggggtgg ggccttgccc ccagcagaga ctacaggcac ttgggaagtt gagcttcctt
2281 gggcttcccc tctctctctg tctgcaaggg gtcagtgggc tgagatttca gcaactaagc
2341 aaagcatttg ctcttgccc cagagaaacc gggctggctg tgggtctcagg aaggaggag
2401 gtgtccaggc tcaggcctgg gcctggggtt cagggagggc ccacgtgggt cgccccttga
2461 ccctctcttt cagcaaggaa gtgactcctt ctctacatgg gcctcaccct ggggaggaca
2521 atggtgtctt tgaagtgtga gtaactgaag tagagatcaa aaggcaatgc agatagactg
2581 acagatttct cctgaagagg ggaagcccga ccaggttaata aaggagtaag aggaaggatg
2641 ttaaggacaa ttttaggaaa cagataatga gtgaatatat tttctctctc tttcccaatt
2701 taaactgaag caggagaaac tgaagctaga cataatgatt aacttcccaa gctggtgagc
2761 ttctgagctt ggttagtgag aacagcacta aggccagggt ctctctccca gatgtttaag
2821 atgagacagg acaatgcctg ctacagagca gggcctggct gaattggccc tcaggattct
2881 ctctgctctg aggtttctgg aagaaggcca gggcagaggt gtggtgatgt agctgctggg
2941 aggacagagc tccgagtcac gtggcctggg cgggcctccc ctctctggtg tccacagaag
3001 cccaacgtca ctactggggg tgtgtatggc tcacacgtag gccaggctgc ctaggctttg
3061 gtgtgcaagg gaggggcccc tacttacttg tggcctgtcc cctcgtgaat gtgtctcatg
3121 tccccagtga gatttttctg tgagggtcat ggtctccagg atgcacaga ctttctgcca
3181 gaattggga atttctcga aaggtggggg ttgttagagg caactctggc ctc cttt
3241 tcctttggga atttccctc aaggtggggg ttgttagacag atc EXON 1

```

Abb. 3.4: Vektorkarte des modifizierten pGL3-Basic Luciferase-Reporter Vektors

(A) modifizierte Vektorkarte des pGL3-Basic Luciferase Reporter Vektors (2.14), mit dem in die multiple cloning site über *MluI*/*HindIII* klonierten NOD2/CARD15 Promotorkonstrukt (NOD2/CARD15 pr). (B) Sequenz des inserierten NOD2/CARD15 pr. Die Pfeile zeigen die Klonierungsprimer (2.10.3), der grün markierte Bereich zeigt die Bindestelle für NF- κ B.

3.5 Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien (3.4) wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) isoliert. Die Bakterien (5 ml ÜN-Kultur) wurden in 250 µl Puffer P1 aufgenommen und mit 250 µl Puffer P2 lysiert. Nach Zugabe von 350 µl Neutralisierungspuffer N3 wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert, die Plasmid-DNA auf das Filtersäulchen übertragen und zentrifugiert. Die an der Matrix verbleibende Plasmid-DNA wurde zweimal mit Puffer PE gewaschen, getrocknet und mit 50 µl H₂O eluiert. Die Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle sequenziert (3.8).

3.6 Reverse Transkription - PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis spezifischer mRNA in intestinalen Makrophagen wurde nach der mRNA-Isolierung aus den Zellen (3.2.1) eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde die mRNA mit dem *Reverse Transcription System* von Promega zunächst in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurden 9,5 µl der erhaltenen mRNA revers transkribiert.

PCR-Ansatz	
RNA	9,5 µl
MgCl ₂	4 µl
10 x Puffer	2 µl
dNTPs	2 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Oligo(dTs)	1 µl

Die mRNA wurde zunächst separat für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nachdem die anderen Komponenten zugegeben wurden, erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 42 °C, gefolgt von einer 5 minütigen Inkubation bei 95 °C.

Die erhaltene cDNA wurde auf ihre Integrität mit Hilfe des *Gene Checker™* Kits (Invitrogen) untersucht. Es wurden dabei fünf Komponenten von drei Haushaltsgenen herangezogen: β-Actin 5', β-Actin 3', Clathrin 2K, Clathrin 6K und GAPDH.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
HotStartTaq® Master Mix Kit (Qiagen)	10 µl	15 min	95 °C
Primer for (5 µM)	2 µl	30 s 30 s 1 min	95 °C 55 °C 72 °C
Primer rev (5µM)	2 µl		
cDNA	1 µl		
H ₂ O	5 µl	10 min	72 °C
		∞	4 °C

Der gesamte PCR-Ansatz wurde zur Kontrolle auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht ausgewertet. Die Größen der einzelnen Haushaltsgene betrugen:

5' β-Actin	1000 bp
3' β-Actin	720 bp
Clathrin 2K	550 bp
Clathrin 6K	570 bp
GAPDH	540 bp

Zum Nachweis der cDNA von CTSB und CTSL wurden folgende PCRs durchgeführt:

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
HotStartTaq® Master Mix Kit (Qiagen)	10 µl	15 min	94 °C
Primer for (5 µM)	2 µl	30 s 30 s 30 s	94 °C 54 °C 72 °C
Primer rev (5 µM)	2 µl		
cDNA	1 µl		
H ₂ O	5 µl	10 min	72 °C
		∞	4 °C

Zum Nachweis der cDNA von Nalp3 wurde folgende PCR durchgeführt:

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
HotStartTaq® Master Mix Kit (Qiagen)	10 µl	15 min	94 °C
Primer for (5 µM)	2 µl	30 s 30 s 1 min	94 °C
Primer rev (5 µM)	2 µl		55 °C
cDNA	1 µl		72 °C
H ₂ O	5 µl	10 min	72 °C
		∞	4 °C

Die PCR-Ansätze wurden zur Kontrolle auf ein 1,2%iges Agarose-Gel aufgetragen und unter UV-Licht ausgewertet. Die Größen der amplifizierten DNA-Stücke betrugen:

CTSB	399 bp
CTSL	390 bp
Nalp3	815 bp

3.7 Real-Time PCR (Taqman®)

3.7.1 Prinzip

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente (CTSB, CTSL und Nalp3) wurden mittels spezifischer Primer (2.10.2) amplifiziert. Innerhalb der Primer lag der Bindebereich einer genspezifischen Sonde, die an ihrem 5' Ende kovalent an einen Reporter-Farbstoff gebunden war: Für CTSB, CTSL und Nalp3 war das 6-FAM, für das Haushaltsgen Gen GAPDH handelte es sich um VIC. Am 3' Ende der Sonde war der Quencher-Farbstoff TAMRA kovalent gebunden. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer Express 1.5 Software (PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) definiert und durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Primer für GAPDH sowie der Taqman-Mastermix wurden von der Firma PE Applied Biosystems bezogen.

Eine Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt:

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Taqman-Mastermix	10 µl	2 min	50 °C
Primer for (18 µM)	1 µl	10 min	95 °C
Primer rev (18 µM)	1 µl		
Sonde (5 µM)	1 µl	15 s	95 °C
cDNA (50 ng)	x µl	1 min	52 °C
GAPDH-Mastermix (20 x)	1 µl	} 44 x	
H ₂ O	x µl		

Die Ansätze wurden als Tripletbestimmungen in einer 384-well Mikrotiterplatte (Abgene, Epsom, UK) mit dem ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System* (PE-Applied Biosystems) gemessen.

Das Prinzip des Taqman[®] ist Folgendes (Abb. 3.4): Die beiden Primer und die dazwischenliegende Sonde binden spezifisch an DNA. Die Fluoreszenz des am 5' Ende der Sonde kovalent gebundenen Reporter-Farbstoffes wird durch die räumliche Nähe zum 3' kovalent gebundenen Quencher unterdrückt. Durch die 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde abgebaut und dadurch der Quencher räumlich vom Reporter getrennt, wodurch die Unterdrückung der Fluoreszenz aufgehoben ist. Diese Zunahme des freien Farbstoffes wird gemessen. Mittels spezieller Software kann so auf die relative Menge der in der Probe vorhandenen cDNA zurückgerechnet werden.

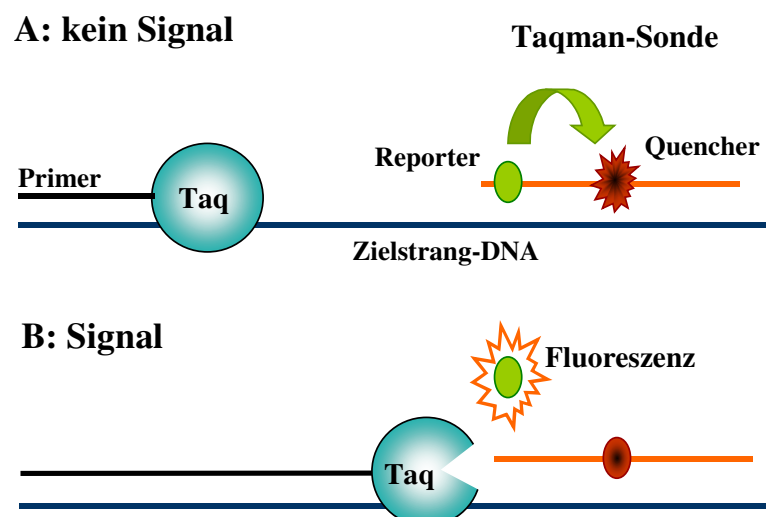


Abb. 3.4: Das Taqman[®]-Prinzip

Durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird der Quencher räumlich vom Farbstoff getrennt, die Fluoreszenz des Reporters wird messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an.

3.7.2 Datenanalyse

Die während der 45 Zyklen frei werdende Menge des Reporter-Farbstoffes wurde mittels der *Sequence Detector Software* SDS 2.2 (PE Applied Biosystems) gemessen. In der exponentiellen Phase der Kurve wurde ein Detektionsschwellenwert für die Fluoreszenz ermittelt und daraus die Zykluszahl (ct) errechnet. Die ct-Werte des Haushaltsgens Gens GAPDH wurden von den ct-Werten des zu untersuchenden Gens subtrahiert und gemittelt:

$$\text{dCT} = \text{ct (Gen)} - \text{ct (GAPDH)}$$

Der Mittelwert der Kontrollprobe(n) wurde als 1 definiert. Auf diesen Wert wurden alle zu untersuchenden Proben relativiert. Durch Potenzierung (Potenz [2;-relativer Wert]) konnte so die Startkopienzahl des Gens in Bezug auf GAPDH verschiedener Patienten direkt miteinander verglichen werden.

3.8 Sequenzierung

Modifizierte Vektoren und amplifizierte DNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung analysiert. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart AG (Regensburg) ausgeführt.

Die erhaltene Basenfolge wurde mit den Sequenzen bekannter Klone (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>, *Nucleotide Sequence Bank* des *Entrez Browsers* des *National Institute of Health* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) verglichen.

3.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine mehrparametrische Analyse von Zellen. Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren oder Proteine (membranständig oder intrazellulär) fluoreszenzmarkiert wurden, können physikalische Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Dabei können sehr große Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit (bis zu 1000 Zellen/s) analysiert werden.

Beim verwendeten Durchflusszytometer Coulter® EPICS® XL-MCL™ (Coulter, Immunotech, Krefeld) werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt. In einem

Flüssigkeitsstrom werden die einzelnen Zellen durch eine Messküvette geschleust, auf die ein Laserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) trifft. Gestreutes Licht und Fluoreszenz werden zu *Photomultipliern* (PMT) geleitet und detektiert. Abb. 3.5 zeigt den schematischen Aufbau des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter® EPICS® XL-MCL™.

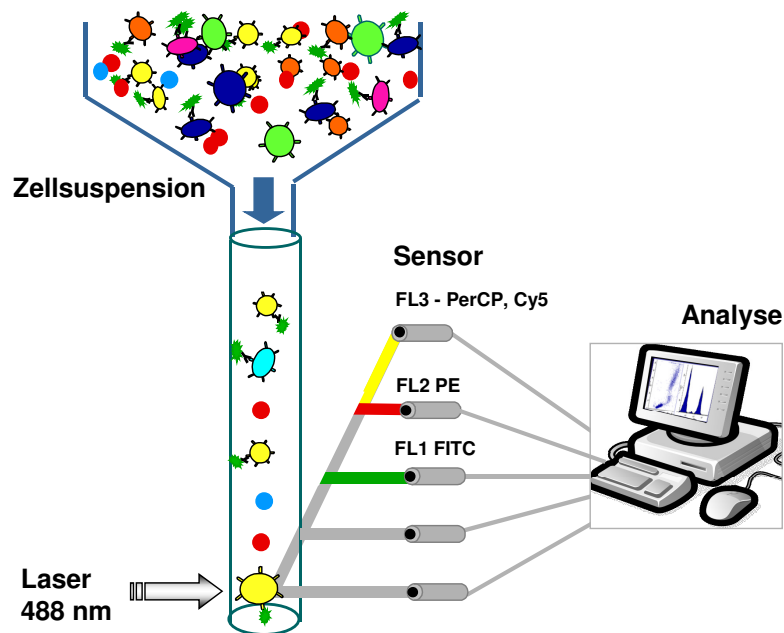


Abb. 3.5: Durchflusszytometer Coulter® EPICS®XL-MCL™

Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter® EPICS®XL-MCL™ in Anlehnung an das Herstellerprotokoll (Immunotech, Krefeld).

Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software *Win.MDI-2.6* (J. Trotter) durchgeführt.

In dieser Arbeit erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der magnetisch isolierten Makrophagen, um deren Reinheit zu bestimmen. Zunächst erfolgte ein Blockierschritt mit Ziegenserum (1:500 verdünnt) für 30 min auf Eis. Die Makrophagen wurden anschließend auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Markierung der Zellen erfolgte durch 15 minütige Inkubation auf Eis mit einem Antikörper, der gegen den CD33-MicroBead Antikörper gerichtet war (Ziege anti-Maus IgG₁-PE, Caltag). Die Inkubation von Makrophagen mit dem Isotyp-Antikörper Ziege IgG₁-PE (Caltag) diente dem Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS resuspendiert und gemessen.

3.10 Quantitative Proteinanalyse

3.10.1 BCA-Test

Der BCA (*bicinchoninic acid*) -Test ist eine Methode zur photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. In wässriger alkalischer Lösung wird Cu^{2+} durch Protein zu Cu^{1+} reduziert, welches einen farbigen Komplex mit jeweils zwei Molekülen BCA (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) bildet.

Hierfür wurden 10 μl Gesamtproteinlösung mit 200 μl BCA : Cu^{2+} (50 : 1) Mischung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend mit einem Absorptionsspektrometer (*ELISA-Reader*, Emax *precision microplate reader*, Molecular Devices Corp.) bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen.

Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch Messung einer Konzentrationsreihe einer BSA-Standardlösung erstellt. Durch Auftragung der Absorption gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe erhielt man eine Eichgerade, aus welcher der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden konnte.

3.10.2 Zytokin-ELISA

Zur Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden Zytokin-ELISAs durchgeführt. Die verwendeten Mikrotiterplatten wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem jeweiligen primären Antikörper beschichtet. Zunächst wurden in die benötigten Vertiefungen einer beschichteten 96-well Mikrotiterplatte 50 μl der Probe in Duplikaten vorgelegt. Die Platte wurde für 2 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl der biotinylierten Antikörper Reagenz pro Vertiefung erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h bei RT. Die Platte wurde anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zu jeder Probe wurden 100 μl Streptavidin-HRP-Lösung pipettiert und die Platte wurde für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 μl der TMB-Substrat-Lösung zugegeben und die Platte für weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 μl 0,5 M HCl abgestoppt. Entstandene Farbkomplexe wurden mit einem Absorptionsspektrometer (ELISA-Reader, Emax) bei 450 nm vermessen. Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software *Softmax for Windows* (Version 2.35) durchgeführt.

3.10.3 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen (3.3.3) wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran transferiert. Hierzu wurde die Gelkassette nach der Elektrophorese aus der Gelkammer entfernt und geöffnet. Das Sammelgel wurde entfernt und das Trenngel in 1 x Transferpuffer mit 10% Methanol gelegt. Zwei Filterpapiere (*Whatman*) und eine Nitrocellulosemembran (Invitrogen) wurden ebenfalls in 1 x Transferpuffer mit 10% Methanol eingeweicht. Der Zusatz von Methanol diente hierbei der Erhöhung der Bindungseffizienz der Proteine an die Nitrocellulosemembran.

Der eigentliche Transfer wurde in dem X-Cell *SureLock II™* Blot Modul (Invitrogen) durchgeführt. Auf die Anode der *Blotting*-Apparatur wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme und auf diese wiederum ein getränktes Filterpapier gelegt. Danach folgten Nitrocellulosemembran, Gel, wiederum ein Filterpapier und zwei getränkte Schwämme. Über das so entstandene *Sandwich* wurde die Kathode der *Blotting*-Apparatur angebracht.

Nach Beenden des *Blottings* wurde die Membran aus dem *Sandwich* entfernt und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen ÜN bei 4 °C oder für 1 h bei RT in 5% Milchpulver mit 3% BSA (in Waschpuffer) inkubiert.

Der primäre Antikörper (2.11) zur Detektion der verschiedenen Zielproteine wurde in folgenden Konzentrationen/Verdünnungen (verdünnt in Blockierlösung) eingesetzt:

Primär-Antikörper	Konzentration / Verdünnung
mouse anti-Actin	1:3000
mouse anti-β-Catenin	5 µg/ml
rabbit anti-Claudin-1	2 µg/ml
rabbit anti-Claudin-2	2 µg/ml
mouse anti-Claudin-4	2 µg/ml
rabbit anti-E-Cadherin	1:1000
rabbit anti-IL-8	1:500
mouse anti-NF-κB	10 µg/ml
mouse anti-Occludin	1:250
mouse anti-ZO-1	1:250

Die Inkubation erfolgte unter leichtem Schwenken ÜN bei 4 °C oder 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen (2.13) wurde der entsprechende HRP-gekoppelte Sekundär-Antikörper (2.13) zugegeben und 1 h auf der Membran unter leichtem Schwenken inkubiert.

Die Konzentrationen der Sekundär-Antikörper (verdünnt in Blockierlösung) waren Folgende:

Sekundär-Antikörper	Verdünnung
goat anti-rabbit IgG-HRP	1:8000
goat anti-mouse IgG-HRP	1:3000

Nach 3 Waschschritten erfolgte die Detektion des Zielproteins durch chemilumineszente Proteindetektion (3.10.5).

Um nachzuweisen, dass die unterschiedliche Intensität der Banden nicht aus einer ungleichmäßigen Proteinbeladung resultierte, wurde die Nitrocellulosemembran bei jedem Western Blot zusätzlich auf das Haushaltsgen β -Actin untersucht. Der β -Actin Antikörper wurde 1:5000 in Blockierlösung (5% Milchpulver mit 3% BSA in Waschpuffer) verdünnt und 1 h bei RT auf der Nitrocellulosemembran inkubiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

3.10.5 Proteindetektion durch Chemilumineszenz

Zur chemilumineszenten Proteindetektion wurde das ECL *Plus Western blotting detection system* (Amersham Life Science, Braunschweig) verwendet.

Zunächst wurden Substanz A (Ethanol) und Substanz B (Dioxan) des ECL *Plus Western blotting detection system* im Verhältnis 40:1 in einem Endvolumen von 4 ml pro Membran gemischt. Nach Abtropfen des überschüssigen Waschpuffers wurde die Nitrocellulosemembran 5 min im ECL-Detektionsgemisch inkubiert und dabei leicht bewegt. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend aus der ECL Lösung entfernt und die überschüssige Flüssigkeit auf einem Papiertuch abgestreift. Die Nitrocellulosemembran wurde nun in die Röntgenkassette zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Im Dunkelraum wurde bei Rotlicht ein Hyperfilm[™] (Amersham Life Science) aufgelegt, wobei sich die Expositionsdauer nach der Signalintensität richtete. Der Film wurde schließlich im Entwicklungsautomaten entwickelt.

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins konnte die Nitrocellulosemembran für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden. Hierfür wurde der an die Membran gebundene Antikörper, der gegen das erste Zielprotein gerichtet war, entfernt (*Stripping*). Die Membran wurde hierzu 5 –10 min in einer milden *Stripping*-Lösung des *Western Blot Recycling Kits* (Chemicon) inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz in Waschpuffer geschwenkt und in 5% Milchpulver mit 3% BSA (in Waschpuffer) blockiert. Anschließend

konnte wie oben beschrieben ein zweites Protein auf der Membran durch Antikörperinkubationen nachgewiesen werden.

3.11 Immunhistochemische und immunfluoreszente Färbungen

Zum Nachweis zahlreicher Oberflächenmarker und intrazellulärer Proteine wurden Dünnschnitte intestinaler Mukosa von Patienten mit und ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen angefertigt und immunhistochemisch bzw. immunfluoreszent gefärbt.

3.11.1 Immunhistochemische Einzelfärbungen

Das Immunoperoxidase-System ABC-Elite der Firma Vector (Burlingame, USA) wurde als Standardmethode für die Immunhistochemie auf Darmgewebe verwendet.

Für den immunhistochemischen Nachweis gewebespezifischer Antigene wurden 5 µm dicke Schnitte der in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten gesamten Darmschleimhaut im Microtom (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) angefertigt und auf Superfrost Plus® Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) überführt. Im Anschluss wurden die Objektträger zum Abschmelzen 1 h bei 70 °C im Brutschrank getrocknet. Nach Entfernung des restlichen Paraffins durch 2 x 5 minütige Inkubation der Schnitte in Xylol folgte die Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (99%, 95%, 70% Ethanol und PBS pH 7,4; jeweils 2 min).

Zur Demaskierung wurden die Schnitte anschließend für 30 min in *target retrieval solution* (pH 6,0; Dako, Hamburg) bei 95 °C in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Aktivität endogener Peroxidasen der Zellen im Gewebeschnitt wurde durch 30 minütige Inkubation der Schnitte in 0,3% H₂O₂ gehemmt. Nach 3 Waschschritten in 1 x PBS, der Blockierung unspezifischer Bindestellen durch 30 minütige Inkubation in 1% BSA/PBS und erneutem Waschen in 1 x PBS erfolgte die eigentliche Färbung.

Zur Identifizierung hinsichtlich des gewünschten Zielproteins positiver Zellen in humaner intestinaler Mukosa wurden die Gewebeschnitte mit einem spezifischen Primär-Antikörper 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungen der Antikörper sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt und erfolgten in 1% BSA/PBS. Jeder Schnitt wurde mit 100 µl Antikörperlösung überdeckt.

Isotypkontrollen, welche jeweils in der selben Endkonzentration eingesetzt wurden und aus dem selben Organismus stammten wie der gewebespezifische Primär-Antikörper, dienten dem Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen. Nach dreimaligem 10 minütigem

Waschen in 1 x PBS wurden die Gewebeschnitte für 30 min in der feuchten Kammer mit dem jeweiligen biotinylierten Sekundär-Antikörper, der gegen den gewebespezifischen Primär-Antikörper gerichtet war, inkubiert.

Nach drei weiteren 10 minütigen Waschschritten in 1 x PBS wurden die Gewebeschnitte mit je 100 µl der vorbereiteten Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Vectastain ABC Elite Standard System (Vector Laboratories)) für weitere 30 min inkubiert. Anschließend folgten wiederum drei Waschschriffe in 1 x PBS. Die eigentliche Färbereaktion erfolgte durch Inkubation der Gewebeschnitte mit je 100 µl Peroxidase-Substratlösung (Vector® NovaRed™ (Linaris)) unter visueller (mikroskopischer) Kontrolle. Die Färbereaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität positiv gefärbter Zellen durch Überführung der Gewebeschnitte in 1 x PBS abgestoppt. Zur Konservierung wurden die gefärbten Gewebeschnitte anschließend mit *Faramount Aqueous Mounting Medium* (Dako) mit einem Deckglas eingedeckt.

3.11.2 Immunhistochemische und immunfluoreszente Doppelfärbungen

Um den Zelltyp zu identifizieren, welcher das entsprechende Zielprotein trägt, wurden immunhistochemische und immunfluoreszente Doppelfärbungen auf das zu untersuchende Protein und ein charakteristisches Zelltyp-spezifisches Markerprotein durchgeführt. Als charakteristischer Marker für humane intestinale Makrophagen diente hierbei CD68, Epithelzellen wurden durch Färbung des Oberflächenproteins EP2 lokalisiert.

Nicht fluoreszente Doppelfärbung

Die Färbung des zu untersuchenden Zielproteins erfolgte analog der in 3.11.1 beschriebenen Einzelfärbung. Im Anschluss an die Färbereaktion wurden die Schnitte zur Blockierung verbleibender Peroxidasen erneut für 30 min in 0,3% H₂O₂/PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x PBS wurden die Schnitte mit dem makrophagenspezifischen Primär-Antikörper Maus anti-human CD68/FITC (Endkonzentration 7 µg/ml, KP1, DAKO) 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Als Isotypkontrolle diente ein Maus-IgG_{1κ} Antikörper, welcher in der selben Konzentration eingesetzt wurde. Nach 3 Waschschriffen in 1 x PBS erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Antifluorescein-HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper *sheep anti-mouse* (1:25, NEF710, NEN®, Boston, MA, USA) für 30 min in der feuchten Kammer. Dieser Sekundär-Antikörper erkennt spezifisch das FITC des Primär-Antikörpers. Unspezifische Färbungen wurden wiederum durch Inkubation mit dem Isotyp-Antikörper Maus IgG₁ ausgeschlossen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Schnitte für

8 min in 0,01% Benzidin Dihydrochlorid (BDHC, Sigma GmbH, Steinheim) mit 0,03% Natriumprusside (Sigma GmbH, Steinheim) vorinkubiert. Danach wurden die Schnitte in das Reaktionsmedium (0,01% Benzidin Dihydrochlorid, 0,03% Natriumprusside, 0,005% H_2O_2) überführt und die Bildung des blauen, granulären Reaktionsprodukts durch visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop beobachtet und durch Überführung der Schnitte in Wasser abgestoppt.

Zur semiquantitativen Analyse roter, blauer und doppelt gefärbter Zellen wurden jeweils 4 Gesichtsfelder im Mikroskop bei 200-facher bis 400-facher Vergrößerung evaluiert.

Fluoreszente Doppelfärbung

Immunfluoreszente Färbungen wurden zur Detektion β -Catenin-, CTSB-, E-Cadherin, Nalp3-, Occludin- und ZO-1-positiver Zellen in humaner intestinaler Mukosa durchgeführt.

Nach Inkubation des Gewebes mit dem spezifischen Primär-Antikörper bzw. dem entsprechenden Isotyp-Antikörper (3.11.1) wurden die Schnitte dreimal jeweils 10 min in 1 x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen in nachfolgender Tabelle aufgeführten Fluorochrom-konjugierten Sekundär-Antikörper für 30 min in der feuchten Kammer. Für die Zelltyp-spezifische Färbung wurden die Schnitte ein zweites Mal zur Blockierung verbleibender Peroxidasen für 30 min in 0,3% H_2O_2 /PBS inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1 x PBS wurden die Schnitte entweder zur Identifizierung von Makrophagen mit dem spezifischen *mouse anti-human* CD68 Primär-Antikörper oder zur Detektion von Epithelzellen mit dem spezifischen *rabbit anti-human* EP2 Primär-Antikörper für 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Nach drei Waschschritten erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (siehe nachfolgende Tabelle). Nach erneutem dreimaligen Waschen in 1 x PBS wurden die Nuklei durch Versiegelung der Objektträger mit dem DAPI-haltigen Eindeckmedium (Vectashield®, H-1200, Vector Laboratories) gefärbt. Immunfluoreszent einzeln und doppelt gefärbte Zellen wurden mikroskopisch evaluiert.

Primär-Antikörper	Konz. [µg/ml] bzw. Verd.	Sekundär-Antikörper	Konz. [µg/ml] bzw. Verd.
anti-β-Catenin	5	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti- CD68_FITC	1	für IF: anti-FITC HRP Konjugat NEF720	1:100
anti-Claudin-1	2	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti-Claudin-2	2	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti-Claudin-4	2	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti-CTSB	5	Alexa Fluor® 488 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti-CTSL	7	Biotin_anti- <i>mouse</i> IgG	2,4
anti-Endotoxin	1:100	Biotin_anti- <i>mouse</i> IgG	2,4
anti-EP2	3,3	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti-Nalp3	10	Biotin_anti- <i>mouse</i> IgG	2,4
anti-Nalp3	10	für IF: Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>mouse</i> IgG bzw. Alexa Fluor® 488 <i>goat</i> - anti <i>mouse</i> IgG	7
anti-NF-κB	5	Biotin_ <i>goat</i> -anti <i>mouse</i> IgG,	2,4
anti-Occludin	2	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7
anti-ZO-1	1	Alexa Fluor® 546 <i>goat</i> - anti <i>rabbit</i> IgG	7

3.11.3 HE-Färbung

Zur histologischen und pathologischen Beurteilung des in dieser Arbeit verwendeten Gewebes wurden 5 µm dicke Schnitte zunächst in einer analog der immunhistochemischen Färbung vorausgehenden Xylol-Ethanolreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in Hämatoxylin-Lösung (Merck, Darmstadt) inkubiert, jeweils 3 min in warmem und kaltem Wasser gebläut, 1 min in Eosin (Sigma-Aldrich) inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Danach wurden die Schnitte mit Entellan® (Merck) eingedeckt und einem Pathologen zur Beurteilung übergeben.

3.12 Fluoreszente *In Situ* Hybridisierung

Zur Untersuchung der Bindungseffizienz der spezifischen 16S rRNA Sonden (GeneDetect, Bradenton, FL, USA) wurde die Fluoreszente *In Situ* Hybridisierung (FISH) zunächst auf Bakteriensuspensionen etabliert. Hierfür wurden E. Coli ÜN-Kulturen mit dem Zytospin auf Objektträger gespottet. Nach 60 min Fixierung in 4% Paraformaldehyd wurden die Bakterien in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 70%, 50% EtOH) rehydriert. Anschließend wurde die auf 46 °C vorgewärmte Prähybridisierungslösung (2.13) auf die fixierten Bakterien pipettiert und für 30 min bei konstanten 46 °C inkubiert. Die Objektträger wurden nun für 3 h in einer „feuchten Kammer“ bei einer konstanten (!) Temperatur von 46 °C mit der die Sonde enthaltenen Hybridisierungslösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger für 15 min in auf 48 °C vorgewärmtem Waschpuffer (2.13) gewaschen (bei 48 °C). Nach einem kurzen Waschschrift in H₂O wurden die Objektträger luftgetrocknet, die Bakterien mit DAPI gegengefärbt und mit *Fluorescent Mounting Medium* (Dako) eingedeckt.

Die mikroskopische Lokalisation der gefärbten Bakterien erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen) durch Betrachtung eines definierten Stapels an Schnittebenen.

Die Lokalisation intraepithelialer und -mukosaler Bakterien erfolgte analog auf Paraffinschnitten intestinaler Mukosa von Kontroll- und CED-Patienten, wobei die Schnitte nach der Rehydrierung zusätzlich für 30 min bei 50 °C getrocknet wurden.

3.13 Transiente Transfektion und Stimulierung von HEK293T Zellen

Alle in diese Arbeit eingeschlossenen Transfektionsexperimente wurden mit der Liposomenmethode durchgeführt.

In jede Vertiefung einer 6-well Mikrotiterplatte wurden 1×10^5 HEK293T-Zellen in 2 ml DMEM *high Glucose* (mit 10% FKS, 1% Natriumpyruvat, 1% NEAs) pipettiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert, so dass sie 24 h später eine Konfluenz von 60% bis 80% erreichten.

In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 97 µl serumfreies Medium vorgelegt und vorsichtig mit 3 µl *FuGene 6* Transfektionsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde 1 µg DNA entsprechend den Herstellerangaben zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte eine weitere 15 min Inkubation bei RT. Anschließend wurde die *FuGene 6*/DNA Lösung tropfenweise auf die ausgesäten Zellen verteilt.

Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Zellen eines Wells analog mit einem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) kodierenden Vektor (pEGFP, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) transfiziert.

Die Stimulierung der HEK293T-Zellen mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil Muramyl-dipeptid (MDP) (Invivogen, Toulouse, F) erfolgte am nächsten Tag für weitere 24 h mit 0, 100, 500, 1000 bzw. 2000 ng/ml MDP. Die Zellüberstände und Zelllysate wurden anschließend für weitere Analysen verwendet.

3.14 Luziferase Assay

Der Einfluss der Stimulierung von HEK293T-Zellen mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil MDP auf die Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors wurde mit Hilfe des Luziferase Reporter Vektors pGL3-Basic (Promega, Mannheim) untersucht (2.14), in den der funktionell essentielle Teil des NOD2/CARD15 Promotors (NOD2/CARD15 pr) kloniert wurde. Dieser Reporter Vektor stellt eine Basis für die quantitative Analyse von Faktoren dar, welche potentiell die Expression verschiedener Säugergene regulieren.

In die benötigten Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte wurden 30 000 HEK293T-Zellen in 100 µl DMEM *high Glucose* (mit 10% FKS, 1% Natriumpyruvat, 1% NEAs) pipettiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert, so dass sie 24 h später eine Konfluenz von 60% bis 80% erreichten. Die Transfektion mit dem pGL3-Basic_NOD2/CARD15 pr Vektor erfolgte laut Herstellerprotokoll für das 96-well Format. Die Stimulierung der Zellen mit MDP wurde analog wie unter 3.13 beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte unter Verwendung des SteadyLite-HTS-Systems (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

3.15 Bestimmung der Cathepsin-Aktivität im murinen Kolongewebe

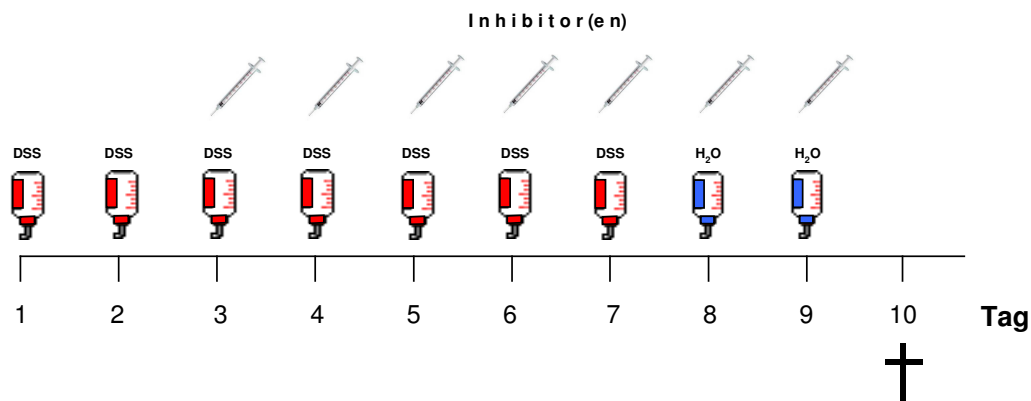
Die basale Aktivität der Cathepsine B, D und L wurde in Gesamtproteinlysaten murinen Kolongewebes aus gesunden, unbehandelten Balb/c-Mäusen bestimmt. Hierfür wurden die unter 2.9 aufgeführten Aktivitäts-Kits nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Das Prinzip dieser fluorometrischen Aktivitätsbestimmung liegt in der Messung der Spaltung eines spezifischen, fluorogenen Peptidsubstrates durch das zu untersuchende Enzym in An- und Abwesenheit eines spezifischen Inhibitors. Die Menge des frei werdenden

Spaltproduktes, welche direkt mit der Enzymaktivität korreliert, wird durch Quantifizierung der Fluoreszenz (in *relative fluorescence units*, RFU) bestimmt.

3.16 Hemmung von CTSB, CTSD und CTSL *in vivo*

Um den Einfluss der Cathepsine B, D und L auf die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen *in vivo* zu untersuchen, wurden spezifische Inhibitoren im akuten Dextran Sodium Sulfat (DSS)-Colitis-Modell der Maus eingesetzt. Folgender Versuchsplan wurde verwendet:



3.16.1 Tiermodell

Für die Tierversuche wurden 4-6 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) mit einem Ausgangsgewicht zwischen 20 und 25 g verwendet. Die Tiere hatten exklusive des Induktionszeitraumes der experimentellen Colitis Futter und Wasser *ad libidum*. Die Studien wurden durch die lokale Ethikkommission genehmigt.

Zur Induktion einer akuten DSS-Colitis wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5% DSS im Trinkwasser verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt normales Trinkwasser.

3.16.2 Cathepsin-Hemmung *in vivo*

Die Inhibitoren wurden in sterilem PBS mit 5% DMSO aufgelöst und verdünnt und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

Die gemeinsame Blockierung von CTSB und CTSL erfolgte durch gleichzeitige tägliche intraperitoneale Applikation von 5 mg/kg Körpergewicht L-trans-Epoxy succinyl-Ile-Pro-OH Propylamid (CA-074, Bachem, Weil am Rhein; CTSB Inhibitor) und 5 mg/kg Körpergewicht Z-Phe-Tyr-Aldehyd (Bachem) in einem Injektionsvolumen von 200 µl beginnend an Tag 3 nach Colitis-Induktion über einen Zeitraum von 7 Tagen.

Die Einzelhemmung von CTSB und CTSL erfolgte analog durch Einzelapplikation der Inhibitoren in getrennten Gruppen.

Die Blockierung von CTSD erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg und 100 mg/kg Körpergewicht Pepstatin A (Chemicon) analog zu o.g. Applikationsschema. Den Kontrollgruppen wurde jeweils PBS mit 5% DMSO verabreicht. Jede Gruppe bestand aus 5 Mäusen. Die Mäuse wurden täglich gewogen und auf Vitalität und Stuhl beurteilt.

An Tag 10 wurden die Tiere getötet, der Dickdarm entnommen und für histologische und funktionelle Untersuchungen präpariert.

3.16.3 Histologischer Score

Zur Beurteilung des histologischen Scores als Maß für den Entzündungsgrad wurde 1 cm des distalen Drittels des Kolons jeder Maus entfernt und verblindet bewertet [186]. Jeder histologische Score repräsentiert den Mittelwert zweier Gewebeschnitte und setzt sich wie folgt zusammen:

- Epithel: (E) 0: normale Morphologie, 1: Verlust einzelner Becherzellen, 2: Verlust von Becherzellen in großen Arealen, 3: Verlust von Krypten, 4: Verlust von Krypten in großen Arealen
- Infiltration: (I) 0: kein Infiltrat, 1: geringe Infiltration um die Kryptenbasis, 2: Infiltrat reicht bis an die *L. muscularis mucosae*, 3: extensive Infiltration bis zur *L. muscularis mucosae* und Verdickung der Mukosa mit zahlreichen Ödemen, 4: Infiltration der Submukosa

Der Gesamtscore ergibt sich aus der Summe des Epithel- und des Infiltrationsscores.

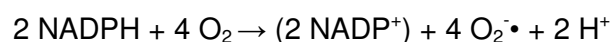
3.16.4 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

1 cm stuhlfreies Dickdarmgewebe wurde in 1 ml Myeloperoxidase (MPO)-Puffer A bis zur Bestimmung der MPO-Aktivität bei -20°C aufbewahrt.

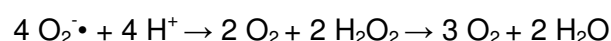
Nach dem Auftauen der Proben wurden diese durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und 3 Einfrier-/Auftauzyklen (flüssiger Stickstoff/ 40°C Wärmeblock) unterzogen. Anschließend wurden die beschallten Proben 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für die MPO-Bestimmung verwendet. Je $20\text{ }\mu\text{l}$ Probe wurde in Duplikaten in je eine Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und mit je $280\text{ }\mu\text{l}$ MPO-Puffer B versetzt. Nach einer 20 min Inkubation bei RT wurden die Extinktionen bei 460 nm gemessen. Die MPO-Aktivität der einzelnen Proben wurde durch Ermittlung des Quotienten aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen und dem Gesamtproteingehalt $[\text{mg/ml}]$ der Probe berechnet.

3.17 Messung der ROS-Produktion durch IMAC mit Dihydro-rhodamin 123

Neutrophile Granulozyten und andere phagozytierende Zellen können im Rahmen der Abwehr bakterieller Keime hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren. Die Synthese und Freisetzung von ROS wird als „Oxidativer Burst“ bezeichnet. Für die Produktion von Superoxidanionen ist eine membranständige Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase verantwortlich [187], welche folgende energiefreisetzende Redoxreaktion katalysiert:



Das Superoxidanion $\text{O}_2^{\cdot-}$ ist instabil. Aus ihm entsteht in einer durch Superoxid-Dismutase katalysierten Reaktion H_2O_2 . Dieses H_2O_2 kann entweder spontan oder katalytisch in H_2O und O_2 umgesetzt werden oder als Oxidans in Peroxidase-abhängigen Reaktionen dienen [188]:



Die Messung der ROS-Produktion wurde verwendet, um die Aktivität der NADPH-Oxidase zu bestimmen. Der Test weist intrazelluläre ROS durch Oxidation des nicht fluoreszenten Indikators Dihydrorhodamin 123 (BD, Heidelberg) zu grün fluoreszierendem

Rhodamin 123 nach. Die ROS-Menge in einer Zelle ist ein Maß für die Aktivität der NADPH-Oxidase.

Der Test beinhaltet die Färbung von IMAC aus der LPMNZ-Population (3.1.1.1), die Stimulierung der Zellen mit Phorbol-12-Myristat 13-Acetat (PMA, Sigma) und die Färbung mit Dihydrorhodamin 123. In unstimulierten IMAC ist die NADPH-Oxidase inaktiv. Die Stimulierung mit PMA bewirkt die Translokation zytosolischer Faktoren des NADPH-Oxidase-Komplexes zur Zellmembran und Aktivierung des Enzymkomplexes. Zur Messung der Grünfluoreszenz wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie (3.9) eingesetzt.

Für den Test wurden 2×10^5 LPMNZ (3.1.1.1) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die LPMNZ wurden in 50 µl FKS-haltigem (10%) Medium aufgenommen und mit 2 µl AB Serum 15 min bei 4°C inkubiert. Zur Markierung der Makrophagen in der LPMNZ-Population wurden die Zellen einmal gewaschen und anschließend mit PC5 konjugiertem anti-CD33 Antikörper (Coulter, Immunotech, Krefeld) erneut für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden nochmals gewaschen und in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes HBSS überführt. Der Ansatz wurde mit 10 µl Dihydrorhodamin 123 (Stammlösung 1,1 mM) und optional mit 10 µl PMA (Stammlösung 1 mM) vermischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben auf Eis überführt und umgehend in der durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt.

3.18 Statistische Auswertung

Alle Messwerte sind als Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung oder *standard error of the mean*) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SigmaPlot *Student t*-Test und der univariaten Varianzanalyse mit Hilfe des SPSS Programms für Windows 12.0. Unterschiede wurden als signifikant definiert, wenn $p < 0,05$.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Isolierung humaner intestinaler Makrophagen

Im Intestinum ausdifferenzierte Makrophagen besitzen einen spezifischen Phänotyp, der in dieser Form bisher nur in der Leber und der Lunge beschrieben wurde [189;190]. Die typischen Oberflächenantigene der Monozyten werden auf IMAC nicht gefunden (1.5.1). Studien zur Funktion und zum Phänotyp der IMAC wurden in unserer Arbeitsgruppe zwar durchgeführt [87;91;180], trotzdem konnten nicht alle wichtigen Zusammenhänge eindeutig geklärt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zelluläre und immunologische Vorgänge in IMAC im Krankheitsbild CED zu untersuchen. Die selektive Isolierung von IMAC über CD33 als geeigneten Oberflächenmarker wurde in der Arbeitsgruppe bereits vor einiger Zeit etabliert [86]. Dennoch sollte der Isolationsprozess nachvollzogen und die Reinheit der isolierten Makrophagen durchflusszytometrisch kontrolliert werden, da für die Expressionsanalysen in dieser Arbeit mRNA aus reinen Makrophagenpopulationen benötigt wurden.

Nach zwei Isolationsschritten zeigte die Fluoreszenzemission von PE-markierten CD33-positiven Zellen eine Anreicherung von Makrophagen auf 95% der intakten Zellen (Abb. 4.1 A). Eine unspezifische Färbung wurde durch die Isotypkontrolle ausgeschlossen (Abb. 4.1 B).

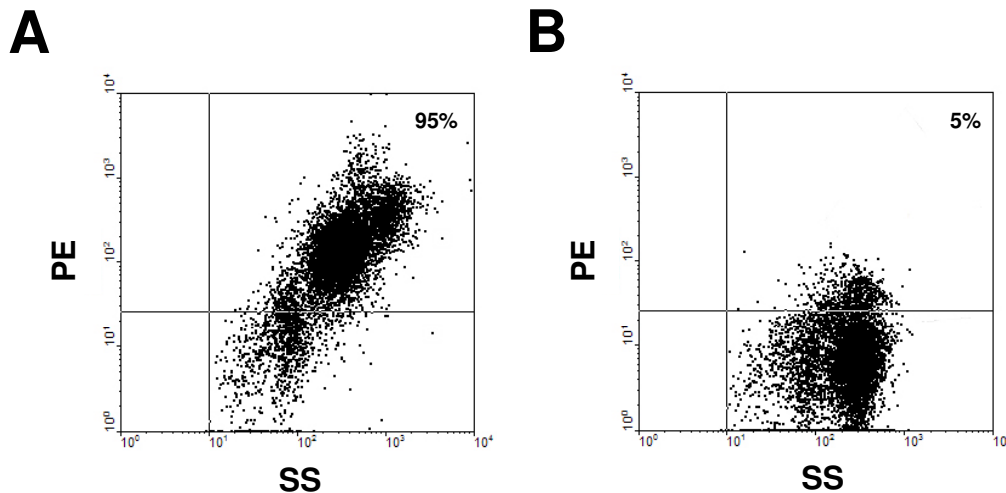


Abb. 4.1: Isolierung humaner intestinaler Makrophagen

Aufreinigung intestinaler Makrophagen durch anti-CD33 MicroBeads. **(A)** Seitwärtsstreulicht (SS)- und R-Phycoerythrin (PE)-Charakteristika der CD33 positiven Zellen. Nach zwei Isolationsschritten betrug die Reinheit 95%. **(B)** Die Isotypkontrolle zeigte keine unspezifische Färbung.

4.2 Bakterielle Translokation und Wege der Überwindung der epithelialen Barriere im Krankheitsbild Morbus Crohn

4.2.1 Nachweis und Lokalisation bakterieller Translokation im intestinalen Gewebe

MC und CU als chronisch immunvermittelte Erkrankungen des Intestinaltrakts stellen ein komplexes Krankheitsbild dar, dessen Ätiologie noch immer nicht geklärt ist. Neben polygenetischen Ursachen (u.a. NOD2/CARD15 Polymorphismen) und Umweltfaktoren (Rauchen, Ernährung) scheint die intestinale Mikroflora eine essentielle Rolle in der Pathogenese der CED zu spielen [191;192]. Es ist weiterhin unklar, ob endogene intestinale Bakterien und/oder spezifische bakterielle Pathogene direkt oder indirekt in die Initiation oder Perpetuation der CED involviert sind. Ein möglicher Weg der direkten bakterienvermittelten Entzündungsreaktion bei CED könnte die Überwindung der mukosalen Barriere durch aktive Translokation von Bakterien in die *Lamina Propria* sein, wodurch es zur ungehinderten Aufnahme von Antigenen und proinflammatorischen Molekülen wie luminalen Bakterien und ihren Produkten kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zunächst untersucht werden, ob es im Intestinaltrakt von MC-Patienten zu einer gesteigerten bakteriellen Translokation kommt.

4.2.1.1 Der intestinale Mukus von MC-Patienten zeigt eine starke bakterielle Besiedelung

Zunächst sollte mittels Fluoreszenter *In Situ* Hybridisierung (FISH) die intestinale Mikroflora im Mukus und ggf. translozierte Bakterien im epithelialen Darmgewebe von MC-Patienten und Kontrollpatienten lokalisiert und quantifiziert werden. Hierfür wurde eine universelle Fluorochrom-gekoppelte DNA-Sonde (EUB 338-Cy3) verwendet, welche mit einer konservierten Region der 16S rRNA aller Bakterienspezies hybridisiert. Zur Lokalisation und Spezifitätskontrolle wurden die Zellkerne der Darmzellen mit DAPI gegengefärbt (Abb. 4.2).

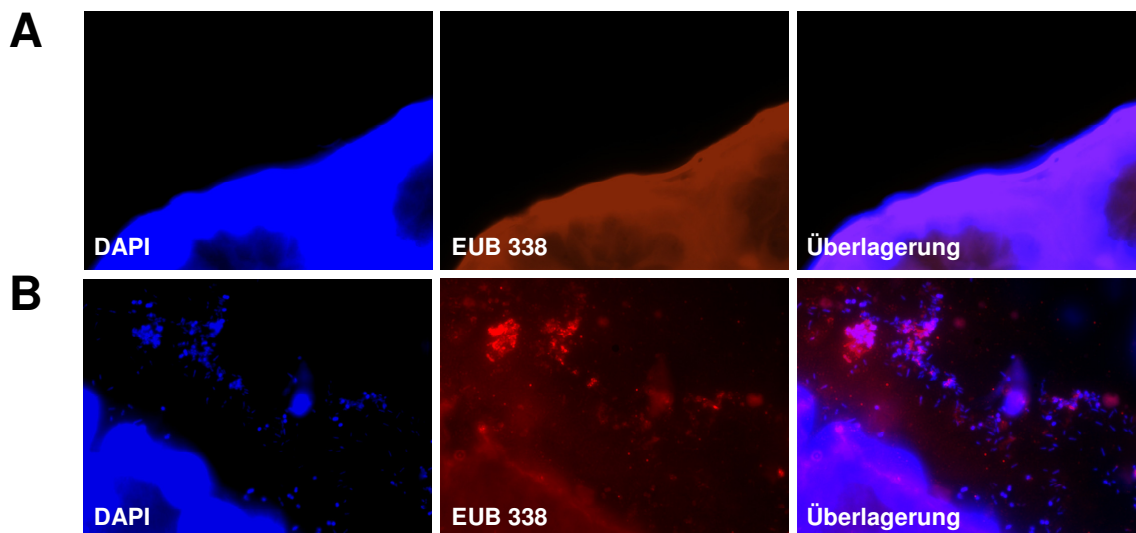


Abb. 4.2: Bakterielle Besiedelung des intestinalen Mukus

Detektion von Bakterien im Mukus der intestinalen Mukosa eines Kontrollpatienten (A) und eines MC-Patienten (B) durch FISH unter Verwendung der universellen antisense EUB 338-Sonde. Der Mukus des entzündeten Darmgewebes des MC-Patienten zeigte eine starke bakterielle Besiedelung (B), im Kontrolldarm waren keine Bakterien detektierbar (A). Repräsentative Paraffinschnitte von jeweils 3 Patienten. Vergrößerung 630 x.

Der die Darmwand eines MC-Patienten auskleidende Mukus zeigte eine starke bakterielle Besiedelung mit zahlreichen Akkumulationen und bis eng an die Krypten heranreichenden Bakterienherden (Abb. 4.2 B, EUB 338). Doppelt gefärbte Zellen bewiesen, dass es sich tatsächlich um Bakterien handelte (Abb. 4.2 B, Überlagerung). Im Mukus von Kontrollpatienten konnten keine Bakterien detektiert werden (Abb. 4.2 A, EUB 338). Intramukosal und intraepithelial konnten mit dieser Methode weder im Darmgewebe von MC-Patienten noch von Kontrollpatienten translozierte Bakterien nachgewiesen werden. Auch Variationen sowohl in der Methodik als auch in der Aufbereitung des Darmgewebes führten

zu keiner Steigerung der Sensitivität und positivem Nachweis bakterieller Translokation. Falsch-positive Signale wurden durch analoge Hybridisierung mit der *nonsense* EUB 338-Sonde ausgeschlossen, die zu keiner positiven Färbung führte (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.2 MC-Patienten zeigen im Gegensatz zu Kontrollpatienten eine starke NOD2/CARD15-Genotyp-spezifische Akkumulation bakteriellen Endotoxins

Durch FISH konnten zwar adhärente Bakterien im Darm von MC-Patienten nachgewiesen werden, jedoch keine transepitheliale Invasion (4.2.1.1). Um trotzdem Aufschluss über eine mögliche Einwanderung von Bakterien aus dem Darmlumen in das submukosale Gewebe im Krankheitsbild MC zu erhalten, wurde immunhistochemisch bakterielles Endotoxin im intestinalen Gewebe von MC- und Kontrollpatienten lokalisiert. Endotoxine stammen aus der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, der Bakterienspezies, die den Grossteil der fäkalen Mikroflora bestimmen. Aufgrund der durch die NOD2/CARD15 Mutationen vermittelten Fehlregulation der Synthese antimikrobieller α -Defensine (1.4) und dem potentiellen Verlust der bakteriellen Sensorfunktion (1.5.2.1.3) sollte der Grad der Endotoxin-Akkumulation mit dem jeweiligen Genotyp des Patienten korreliert werden.

Auf Paraffinschnitten intestinalen Gewebes wurde bakterielles Endotoxin zunächst mit einem spezifischen Antikörper gegen Endotoxine einer großen Bandbreite gramnegativer Bakterien detektiert. Aufgrund der starken Färbung großflächiger Areale konnte keine Auszählung positiv gefärbter Zellen durchgeführt werden. Deshalb erfolgte die semiquantitative Auswertung rein visuell durch mikroskopische Betrachtung des ganzen Schnittes und Aufnahme entsprechender Ausschnitte.

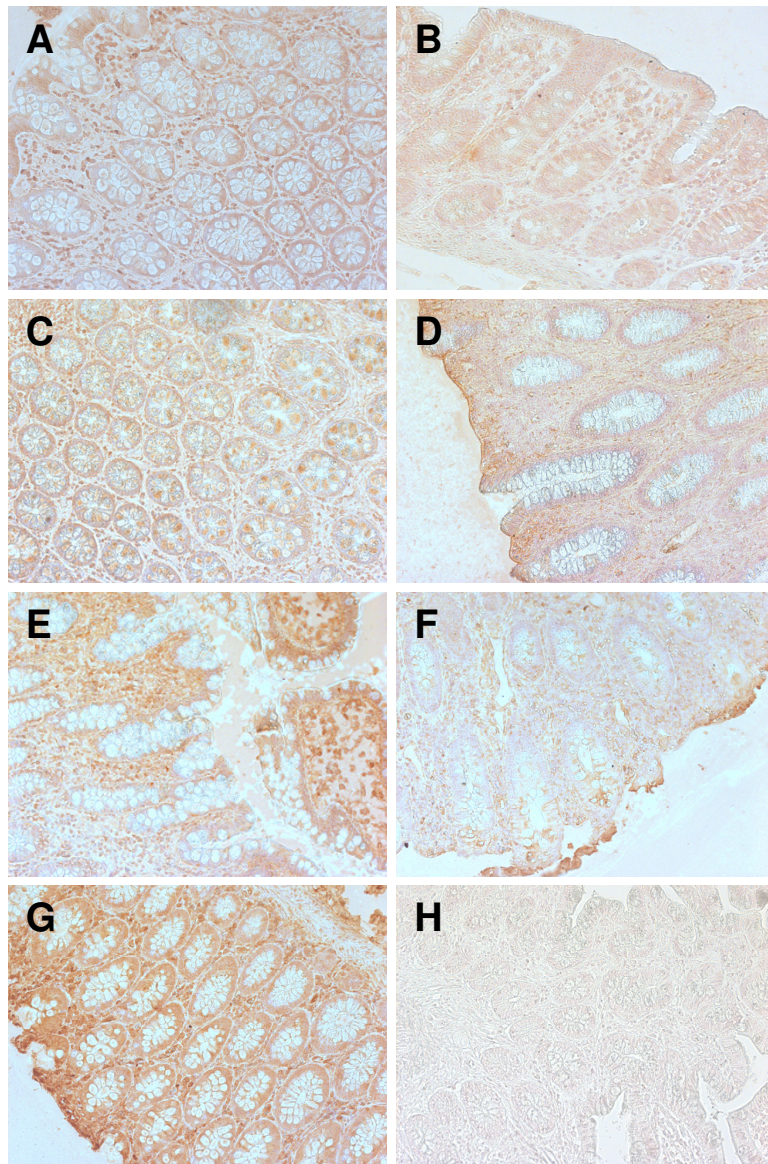


Abb. 4.3: Immunhistochemischer Nachweis bakteriellen Endotoxins in intestinale Gewebe

Immunhistochemische Detektion bakteriellen Endotoxins in humaner intestinaler Mukosa von Kontrollpatienten und MC-Patienten. (A) Kontrollpatient ohne Polymorphismus, (B) Kontrollpatient SNP8, (C) Kontrollpatient SNP13, (D) MC-Patient ohne Polymorphismus, (E) MC-Patient SNP8, (F) MC-Patient SNP12, (G) MC-Patient SNP13, (H) Isotypkontrolle. Die angegebenen SNPs lagen jeweils heterozygot vor und beziehen sich auf das NOD2/CARD15 Gen. Paraffinschnitte. Vergrößerung 200 x. Diese Abbildung ist repräsentativ für insgesamt 12 Kontrollpatienten und 18 MC-Patienten.

Im intestinalen Gewebe von Kontrollpatienten, die entweder das NOD2/CARD15 Wildtyp-Gen trugen (Abb. 4.3 A) oder eine mutierte Variante (Abb. 4.3 B,C) konnte keine spezifische Endotoxin-Färbung detektiert werden. Patienten mit MC zeigten eine deutliche Anreicherung bakteriellen Endotoxins. Die Verteilung positiv gefärbter Zellen entsprach der Translokationsroute – stark gefärbte Areale wurden vorwiegend am Mukosasaum als primären Eintrittsort invasiver Bakterien lokalisiert (Abb. 4.3 D,F) sowie in Arealen massiver

Gewebeschädigung (Abb. 4.3 E) und nahmen in Richtung der submukosalen Bereiche ab. In Abb. 4.3 F war erneut die starke bakterielle Besiedelung des Mukus im Darmgewebe von MC-Patienten durch intensive Färbung dieses Bereichs ersichtlich. Hinsichtlich des NOD2/CARD15 Genotyps waren in der Gruppe der MC-Patienten deutliche Unterschiede erkennbar: Patienten mit dem Wildtyp-Gen zeigten nur eine mäßige Endotoxin-Anreicherung in den Randarealen der Mukosa (Abb. 4.3 D), bei Patienten mit heterozygot vorliegendem SNP8 im NOD2/CARD15 Gen wurden starke Endotoxin-Akkumulationen detektiert, die sich basolateral bis weit unter die Kryptenbasis erstreckten (Abb. 4.3 E). MC-Patienten mit heterozygotem SNP12 zeigten ein ähnliches Endotoxin-Niveau wie Patienten mit der Wildtyp Form des NOD2/CARD15 Gens mit vorwiegender Lokalisation im mukosalen Randbereich (Abb. 4.3 F). Bei Patienten mit heterozygotem SNP13 im NOD2/CARD15 Gen wurde ebenfalls eine starke Endotoxin-Anreicherung beobachtet, die sich ähnlich dem Verteilungsmuster bei Patienten mit SNP8 vom Randbereich bis in Areale um die Krypten erstreckte (Abb. 4.3 G). Unspezifische Färbeergebnisse wurden durch die Isotypfärbung ausgeschlossen (Abb. 4.3 H).

Die Daten zeigen, dass es im Krankheitsbild MC zu einer starken bakteriellen Besiedelung des intestinalen Mukus und Translokation der adhäsiven Bakterien oder von Bakterienbestandteilen in das mukosale und submukosale Gewebe kommt. Die Invasionsstärke scheint durch den NOD2/CARD15 Genotyp des Patienten beeinflusst zu werden – Patienten mit heterozygot vorliegendem SNP8 bzw. SNP13 im NOD2/CARD15 Gen zeigten eine stärkere Anreicherung bakteriellen Endotoxins als Träger des NOD2/CARD15 Wildtyp Gens bzw. der SNP12 Variante. In Kontrollpatienten konnten weder eine bakterielle Besiedelung des Mukus noch bakterielles Endotoxin intramukosal nachgewiesen werden.

4.2.2 Paraepitheliale Überwindung der physikalischen Barriere durch Modifikationen der Zell-Zell-Kontakte

Die starke bakterielle Besiedelung des Mukus und die Invasion einzelner Bakterien bis zur luminalen Seite der Mukosa im Darm von MC-Patienten ließ vermuten, dass der primäre Eintritt der Bakterien durch Überwindung der Zell-Zell-Kontakte erfolgt. Um zu überprüfen, ob die Zell-Zell-Kontakte im Darmepithel von MC-Patienten verändert sind, wurde zunächst elektronenmikroskopisch die Morphologie der *Tight Junctions* begutachtet und anschließend durch immunfluoreszente Färbung die Proteinsynthese einiger funktionell

essentieller *Tight Junction* Proteine (Claudin-1, Claudin-2, Claudin-4, Occludin und ZO-1) sowie der *Adherens Junction* Proteine β -Catenin und E-Cadherin untersucht.

4.2.2.1 Epitheliale Zell-Zell-Kontakte sind im Krankheitsbild MC morphologisch unverändert

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des epithelialen Interzellularraums zeigte keine morphologischen Veränderungen des Schlussleistenkomplexes bestehend aus *Zonula occludens*, *Zonula adhaerens* und *Macula adhaerens*. Auch der Mikrovillisaum auf der apikalen Seite des Epithels zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten (Abb. 4.4).

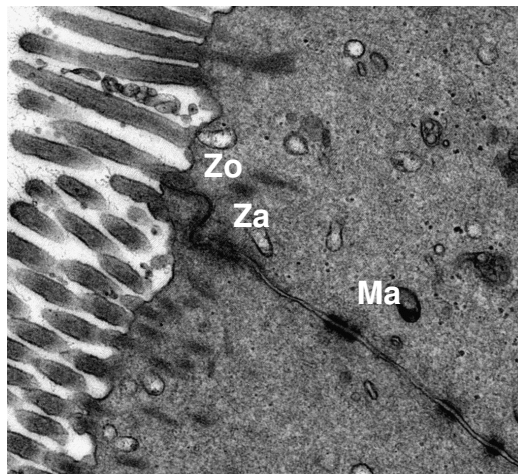


Abb. 4.4: Morphologie der epithelialen Zell-Zell-Kontakte im Krankheitsbild MC

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Zell-Kontakte zwischen zwei Epithelzellen im Darmgewebe eines MC-Patienten. Zo: *Zonula occludens* (*Tight Junction*), Za: *Zonula adhaerens* (*Adherens Junction*), Ma: *Macula adhaerens* (*Desmosomen*). Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit der elektronenmikroskopischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg (Prof. Schröder) erstellt. Vergrößerung 20.000 x.

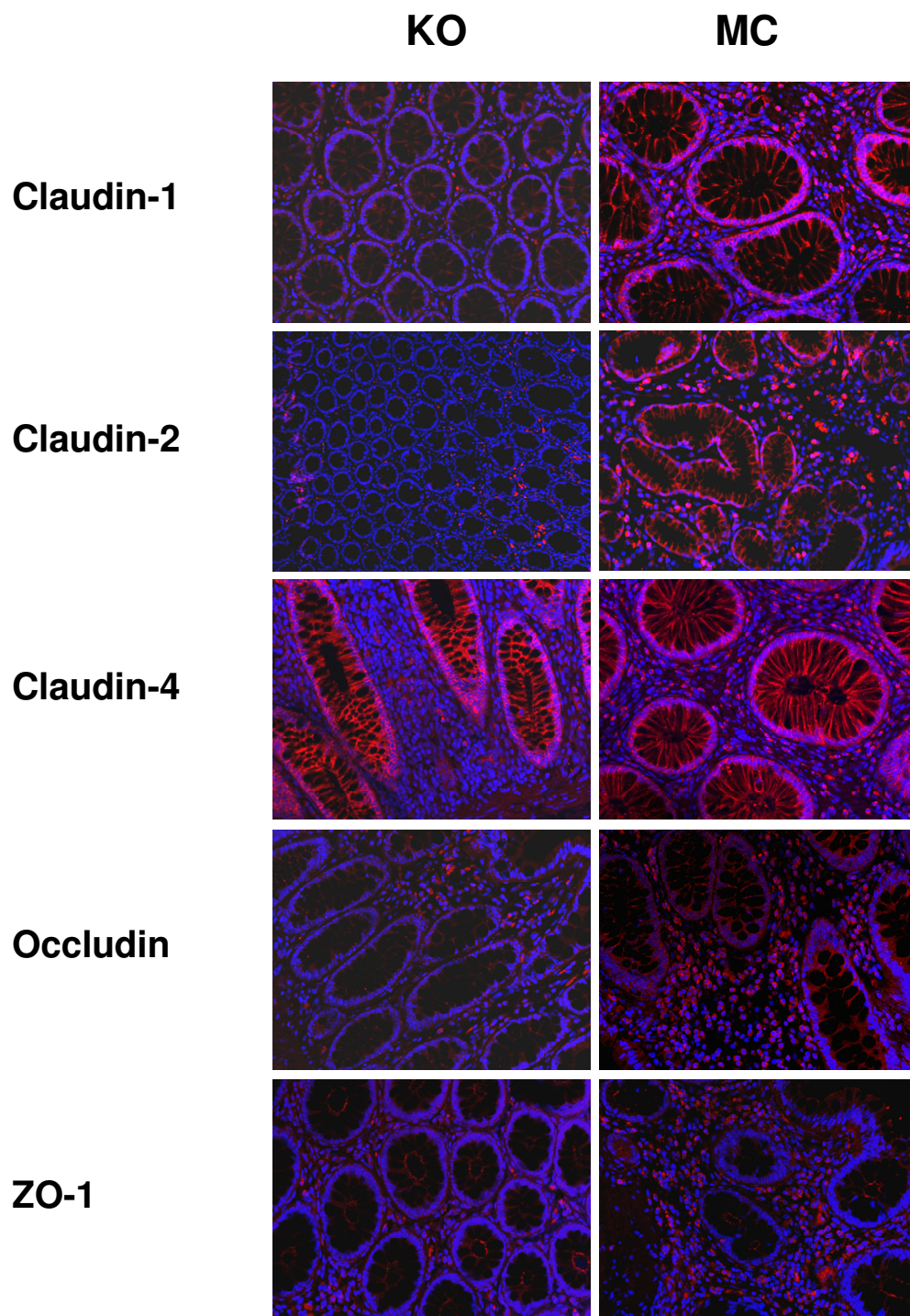
4.2.2.2 Die Menge funktionell essentieller Zell-Zell-Kontaktproteine ist im Darmepithel von MC-Patienten verändert

Die Funktionalität der interzellulären Kontakte wird durch ein komplexes Zusammenwirken zahlreicher integraler Membranproteine bestimmt, die abdichtende Funktionen (Claudin-1, Claudin-4), porenbildende Funktionen (Claudin-2), adhäsive Funktionen (ZO-1), verbindende Funktionen (β -Catenin, E-Cadherin) oder noch unbekannte Funktionen (Occludin) besitzen. Eine intakte Morphologie der Zell-Zell-Kontakte bedeutet

deshalb nicht unbedingt eine funktionierende epitheliale Barriere. Um potentielle Mengenunterschiede dieser Proteine im Krankheitsbild MC zu untersuchen, wurden immunfluoreszente Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Zielproteine durchgeführt und die Ergebnisse durch Western Blot-Analysen bestätigt.

Die immunfluoreszente Lokalisation der *Tight Junction* (TJ) Proteine Claudin-1, -2 und -4 sowie Occludin und ZO-1 zeigte deutliche Unterschiede im intestinalen Gewebe von MC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Im entzündungsassoziierten Darmgewebe wurden mehr Claudin-1 und -2, sowie Occludin und ZO-1 gefunden (Abb. 4.5 A, MC) als im nicht entzündeten Kontrolldarm (Abb. 4.5 A, KO). Die Akkumulation von Claudin-1 und Claudin-2 konnte vorwiegend im Kryptenepithel und im die Krypten umgebenden Gewebe lokalisiert werden, ZO-1 und Occludin waren im gesamten entzündeten Mukosagewebe angereichert. Claudin-4 wurde im intestinalen Gewebe von MC-Patienten und Kontrollpatienten in gleichem Maße nachgewiesen (Abb. 4.5 A).

Die immunfluoreszente Detektion der *Adherens Junction* (AJ) Proteine β -Catenin und E-Cadherin zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede im Krankheitsbild MC im Vergleich zum gesunden Darm. Beide Proteine waren im intestinalen Gewebe von MC-Patienten im Vergleich zu Kontrollen stark vermindert nachweisbar (Abb. 4.5 B). Die Akkumulation der AJ Proteine war im gesunden Darm ebenfalls vorwiegend auf das Kryptenepithel beschränkt. Unspezifische Färbereaktionen wurden durch Isotypkontrollen ausgeschlossen (Abb. 4.5 C, exemplarisch für jeweils einen Isotyp-Antikörper aus der Maus bzw. dem Kaninchen gezeigt).

A

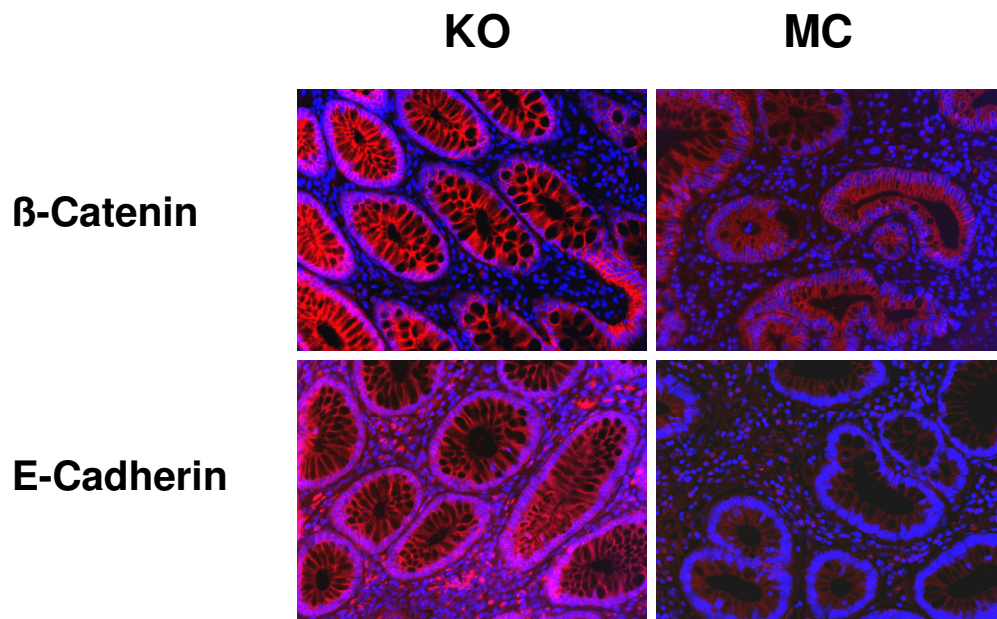
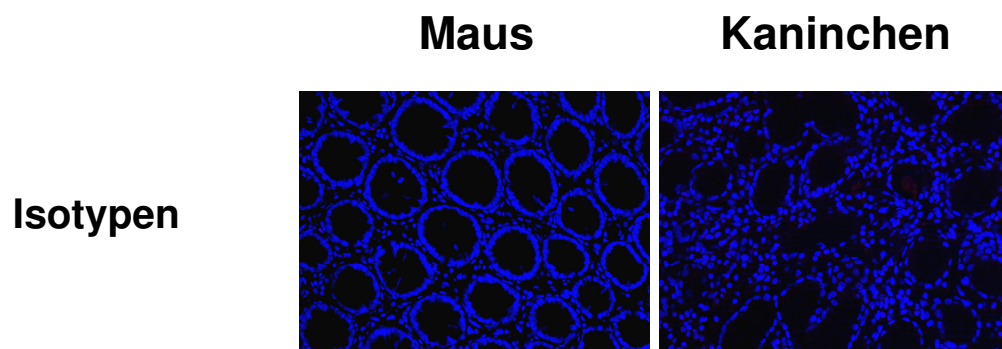
B**C**

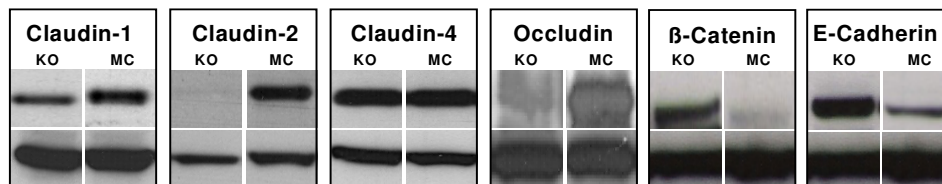
Abb. 4.5: Immunfluoreszente Lokalisation der Zell-Zell-Kontaktproteine im intestinalen Gewebe

Immunfluoreszente Detektion der **(A)** TJ-Proteine Claudin-1, -2, -4, Occludin und ZO-1 sowie der **(B)** AJ-Proteine β -Catenin und E-Cadherin im intestinalen Gewebe von Kontrollpatienten (KO) und MC-Patienten (MC). **(C)** Isotypkontrollen. Vergrößerung 200 x. Paraffinschnitte. Diese Abbildung ist repräsentativ für 12 Kontrollpatienten und 12 MC-Patienten.

Um die immunhistochemisch nachgewiesenen Unterschiede der Zell-Zell-Kontaktproteine semiquantitativ zu belegen, wurden Western Blot-Analysen mit Zelllysaten von intestinalem „Gesamtgewebe“ (Gesamtproteinlysate) und isolierten Epithelzellen (IEZ-Proteinlysate) von MC-Patienten und Kontrollen durchgeführt (siehe 3.10.4). In den entzündungsassoziierten Proben (MC) wurden sowohl in IEZ-Lysaten als auch in den

Gesamtzelllysaten die TJ-Proteine Claudin-1, -2, Occludin und ZO-1 vermehrt im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Entzündung (KO) nachgewiesen. Claudin-4 war unverändert (Abb. 4.6). ZO-1 konnte in IEZ-Lysaten mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden, deshalb ist hier nur dessen Detektion in Gesamtzelllysate gezeigt. Da TJs und AJs vor allem im Epithel eine hochselektive Barrierefunktion erfüllen, hätte ZO-1 als Bindeglied zwischen dem Actin-Zytoskelett und anderen TJ-Proteinen auch in IEZ nachweisbar sein müssen. Möglicherweise wurden aber durch die Isolierung der IEZ, welche ein mechanisches Ablösen (mehrmaliges kräftiges Schütteln) der Epithelzellkrypten von der darunter liegenden extrazellulären Matrix beinhaltet, neben Zell-Matrix-Kontakten auch ZO-1-vermittelte Zell-Zell-Kontakte zerstört. ZO-1 könnte so durch das weitere Reinigungsprozedere der IEZ-Isolierung herausgewaschen worden sein. Die AJ-Proteine β -Catenin und E-Cadherin waren in den Proben von MC-Patienten im Vergleich zu den Proben von KO-Patienten sowohl in IEZ-Lysaten als auch in Gesamtzelllysaten reduziert (Abb. 4.6). Die gleichmäßige Beladung der einzelnen Gelspuren wurde durch Detektion des Haushaltsproteins β -Actin überprüft (Abb. 4.6, jeweils untere Spuren).

IEZ-Proteinlysate



Gesamtproteinlysate

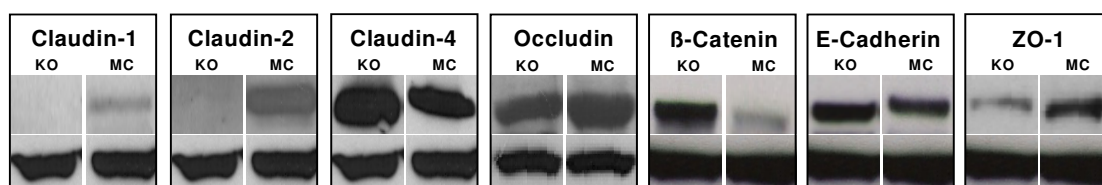


Abb. 4.6: Proteinchemischer Nachweis der Zell-Zell-Kontaktproteine

Nachweis von Zell-Zell-Kontaktproteinen in Zelllysaten aus intestinale Gesamtgewebe (Gesamtprotein) und isolierten intestinalen Epithelzellen (IEZ) von Kontrollpatienten und MC-Patienten. Die obere Bande zeigt das jeweils angegebene Protein, die untere Bande zeigt die Ladungskontrolle β -Actin. In den entzündungsassoziierten Proben (MC) konnten sowohl in den IEZ, als auch in den Gesamtzelllysaten vermehrt die TJ-Proteine Claudin-1, -2, Occludin und ZO-1 im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Entzündung (KO) nachgewiesen werden. Claudin-4 zeigte zwischen KO und MC sowohl in IEZ als auch in den Gesamtzelllysaten keine Unterschiede. Die AJ-Proteine β -Catenin und E-Cadherin waren in den Lysaten von MC-Patienten im Vergleich zu den KO-Patienten vermindert. ZO-1 konnte in den IEZ-Lysaten durch Western Blot nicht nachgewiesen werden. Diese Abbildung ist repräsentativ für 3 KO- und 3 MC-Patienten.

Wie in Tabelle 4.1 zusammengefasst, zeigten die Analysen zum Nachweis der Zell-Zell-Kontaktproteine Unterschiede im Krankheitsbild MC. Die TJ-Proteine waren exklusive Claudin-4 in den entzündungsassoziierten Zelllysaten verstärkt nachweisbar, die AJ-Proteine wurden dagegen reduziert gefunden.

	IHC	Western Blot	
<i>Protein</i>	Gesamtgewebe KO vs. MC	IEZ KO vs. MC	Gesamtprotein KO vs. MC
Claudin-1	erhöht	erhöht	erhöht
Claudin-2	erhöht	erhöht	erhöht
Claudin-4	unverändert	unverändert	unverändert
Occludin	erhöht	erhöht	erhöht
ZO-1	erhöht	-	erhöht
β-Catenin	reduziert	reduziert	reduziert
E-Cadherin	reduziert	reduziert	leicht reduziert

Tab. 4.1: Nachweis der Zell-Zell-Kontaktproteine im Krankheitsbild MC

Nachweis der Zell-Zell-Kontaktproteine Claudin-1, -2, -4, Occludin, ZO-1, β -Catenin und E-Cadherin im Darm von Kontrollpatienten (KO) im Vergleich zu MC-Patienten (MC).

IHC – immunhistochemischer Proteinnachweis in intestinalem Gesamtgewebe, Western Blot – Proteinnachweis in isolierten intestinalen Epithelzellen (IEZ) und Gesamtgewebe (Gesamtprotein). ZO-1 Protein konnte in IEZ-Lysaten durch Western Blot nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte ergab keine Veränderungen in deren Morphologie, jedoch deutliche Unterschiede im Gehalt ihrer funktionellen Proteine, die vor allem in die Abdichtung und den Zusammenhalt der epithelialen Barriere involviert sind. Eine gestörte Funktionalität der Zell-Zell-Kontakte könnte also die parazelluläre Invasion luminaler Bakterien ermöglichen.

4.3 Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation des intrazellulären MDP-Sensorproteins NOD2/CARD15 und die intestinale Entzündung im Krankheitsbild Morbus Crohn

Die Erkennung und Abwehr eingedrungener Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem spielt für das Überleben vielzelliger Organismen eine entscheidende Rolle. Neben extrazellulären PRRs verfügen Zellen auch über intrazelluläre Sensorproteine zur Erkennung mikrobieller Pathogene. Mit der Identifizierung der NOD-Proteinfamilie (1.5.2) wurden diese zytosolischen Rezeptoren erstmals beschrieben. Aufgrund ihrer spezifischen Struktur erkennen und binden diese Proteine bakterielle Zellwandbestandteile (LPS, MDP, PDG) und führen zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege (1.5.2.1.2).

Im folgenden Teil der Arbeit sollte deshalb der Einfluss der bakteriellen Translokation auf die Regulation des MDP-Sensorproteins NOD2/CARD15 und die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges *in vitro* und in humanem Gewebematerial im Krankheitsbild MC untersucht werden.

4.3.1 MDP induziert die Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors *in vitro*

Die Bindung der bakteriellen Zellwandkomponente MDP an die LRR-Domäne von NOD2/CARD15 induziert über die Aktivierung des NF- κ B Signalweges eine Vielzahl proinflammatorischer Gene, die eine Rolle bei der Modulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielen. Daten zur Untersuchung der NOD2/CARD15-vermittelten Aktivierung von NF- κ B zeigten, dass (i) bereits eine starke transiente Überexpression von NOD2/CARD15 ohne bakteriellen Stimulus zur NF- κ B-Aktivierung führt und dass (ii) in Zellen, die aufgrund moderater NOD2/CARD15 Expression keine NF- κ B-Aktivierung aufwiesen, durch einen bakteriellen Stimulus NF- κ B Aktivität induziert werden konnte [99;132;138].

Es sollte deshalb zunächst untersucht werden, ob bakterielle Translokation (simuliert durch MDP Stimulierung) zur Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors führt. Hierfür wurde der funktionell essentielle Teil des NOD2/CARD15 Promotors (NOD2/CARD15 pr) in das Reporterplasmid pGL3-Basic kloniert (3.4). Anschließend wurden HEK293T Zellen mit dem Reportervektor transient transfiziert. Nach Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen MDP wurde die relative Synthese des Reporters *firefly* Luziferase fluorometrisch bestimmt.

Zellen, die mit dem pGL3-Basic_NOD2/CARD15 pr Reporterplasmid transfiziert wurden, zeigten eine signifikante dosisabhängige Aktivierung des dem Promotor nachgeschalteten *firefly* Luziferase-Gens als Antwort auf MDP-Stimulierung. Die höchste Luziferaseaktivität (4774 ± 320 RLU) wurde bei einer Stimulierungsdosis von 500 ng/ml MDP erreicht (Abb. 4.7). Zellen, die mit dem leeren pGL3 Kontrollvektor (pGL3-Basic) transfiziert wurden, zeigten, ebenso wie nicht transfizierte Zellen (nicht transfiziert), unabhängig von der MDP-Dosis keine Induktion der Luziferaseaktivität (Abb. 4.7).

Die Daten zeigen, dass die bakterielle Zellwandkomponente MDP *in vitro* zur Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors führt.

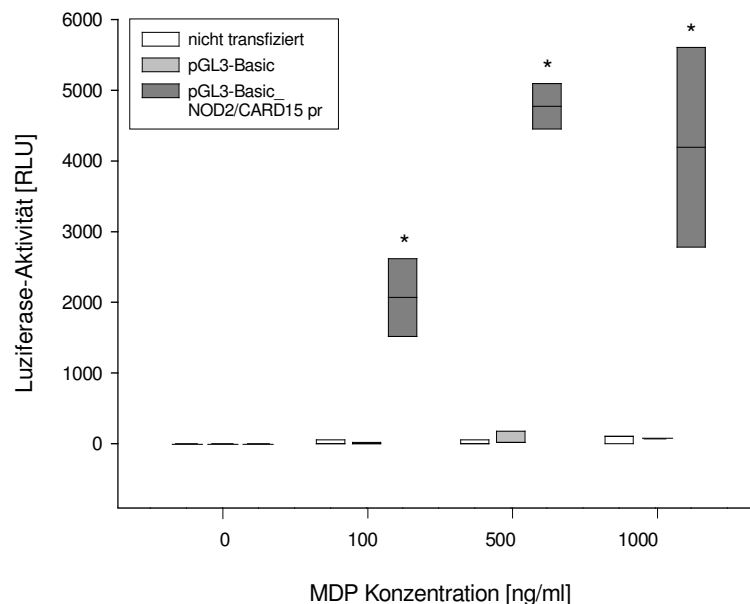


Abb. 4.7: Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors *in vitro*

Fluorometrische Bestimmung der Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors mittels Luziferase-Reporter-Assay. HEK293T Zellen wurden transient mit dem pGL3-Basic_NOD2/CARD15 pr Reporterplasmid transfiziert und mit ansteigenden Konzentrationen MDP stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen bzw. mit dem leeren Kontrollvektor pGL3-Basic transfizierte Zellen. Der NOD2/CARD15 Promotor wurde durch den bakteriellen Stimulus MDP induziert und führte zur Aktivierung des nachgeschalteten *firefly* Luziferase-Gens. RLU– real light units. * $p < 0,007$ (Student t-Test). $n=3$.

4.3.2 MDP induziert die NOD2/CARD15 Genotyp-spezifische Aktivierung des NF- κ B Signalweges *in vitro*

Wie initial beschrieben (1.5.2.1.3) besteht für Patienten mit Mutationen im NOD2/CARD15 Gen ein erhöhtes Risiko, an MC zu erkranken. Es ist weiterhin bekannt,

dass die Reaktion auf bakterielle Komponenten in den MC assoziierten NOD2/CARD15 Varianten SNP8, SNP12 und SNP13 gestört ist [99;100;138].

Aufgrund kontroverser Daten hinsichtlich des Einflusses der NOD2/CARD15 Polymorphismen auf die Funktionalität des Proteins [99;135;193;194] sollte zunächst untersucht werden, inwieweit ein veränderter NOD2/CARD15-Signalweg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B im oben beschriebenen *in vitro*-Modell beeinflusst. HEK293T Zellen exprimieren kein NOD2/CARD15 und besitzen somit keinen intrazellulären Sensor für MDP [195]. Die Zellen wurden daher transient mit den Expressionsvektoren (i) pcDNA3.1 (Kontrollvektor), (ii) pcDNA3.1_NOD2/CARD15 (Vektor mit dem Wildtyp (WT) NOD2/CARD15 Gen) bzw. (iii) pcDNA3.1_SNP13 (Vektor mit der SNP13 Mutation im NOD2/CARD15 Gen) transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen MDP stimuliert. Als Maß der NF- κ B-Aktivierung wurde die IL-8-Konzentration in den Zellüberständen nach 24 h bestimmt. Die optimale DNA-Menge für die Transfektion, die Konzentrationen des Stimulanz sowie die Stimulierungsdauer wurden in der Arbeitsgruppe von Christoph Zeitler im Rahmen seiner Dissertation bestimmt [196].

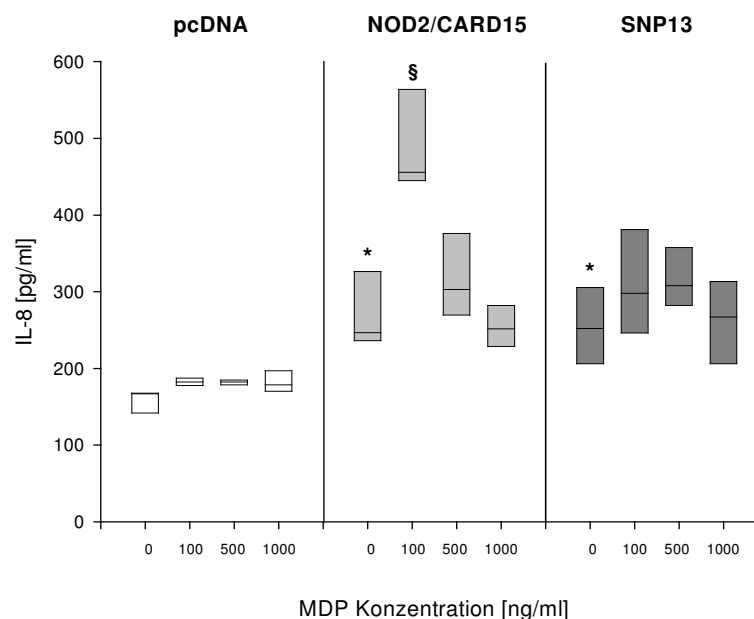


Abb. 4.8: IL-8 Synthese MDP-stimulierter HEK293T-Zellen

IL-8-Produktion MDP-stimulierter HEK293T Zellen, die mit pcDNA3.1 (Kontrollvektor), pcDNA3.1_NOD2/CARD15 (WT Gen) bzw. pcDNA3.1_SNP13 (mutiertes Gen) transfiziert wurden. Die Überexpression beider Genvarianten resultierte in einer gesteigerten IL-8-Synthese. Die Expression des WT Gens führte zu einer signifikanten Induktion der IL-8-Sekretion durch Stimulierung mit 100 ng/ml MDP. In Zellen, die die mutierte Form exprimierten, konnte dagegen keine Induktion der IL-8-Sekretion beobachtet werden. Signifikanzen: basale Sekretion bezogen auf * pcDNA3.1 unstimuliert ($p < 0,05$) bzw. [§] pcDNA3.1_NOD2/CARD15 unstimuliert ($p < 0,005$); (Student t-Test). Diese Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden zeigten durch MDP Stimulierung keine Veränderung zur basalen IL-8-Sekretionsrate (Abb. 4.8, pcDNA3.1). In Zellen, die mit dem NOD2/CARD15 WT Expressionsplasmid transfiziert wurden, konnte durch die alleinige Überexpression des Gens bereits eine signifikant gesteigerte IL-8-Sekretion festgestellt werden (Abb. 4.8, NOD2/CARD15, * $p < 0,05$). Durch Stimulierung der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen MDP konnte bei einer Dosis von 100 ng/ml MDP eine signifikante Induktion der IL-8-Synthese nachgewiesen werden, die einer 1,7-fach erhöhten Sekretionsrate gegenüber den unstimulierten Zellen entsprach ($p < 0,005$). Höhere Konzentrationen des Stimulanz führten zu einer annähernd der basalen Sekretionsrate entsprechenden IL-8-Produktion. Ebenso wie in Zellen, die die WT Variante des NOD2/CARD15 Gens exprimierten, konnte in Zellen, die mit der SNP13-Variante des NOD2/CARD15 Gens transfiziert wurden, durch alleinige Überexpression des Gens eine erhöhte IL-8-Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 4.8, SNP13, * $p < 0,05$). Im Gegensatz zum WT konnte jedoch die Sekretion des Zytokins nicht durch Stimulierung mit MDP gesteigert werden.

Die Daten zeigen, dass die Überexpression von NOD2/CARD15 bereits ohne bakteriellen Stimulus *in vitro* zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges führt. Durch mäßige bakterielle Stimulierung kommt es in Zellen, die das NOD2/CARD15 WT-Gen exprimieren, zu einer Induktion der NF- κ B-Aktivierung; die Expression der trunkierten Proteinvariante (SNP13) führt hingegen zum Verlust der Induzierbarkeit.

4.3.3 Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten kommt es zur NOD2/CARD15 Genotyp-assoziierten Aktivierung von NF- κ B

Um zu untersuchen, inwieweit der NOD2/CARD15 Genotyp des Patienten im Krankheitsbild MC einen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hat, sollte nun dessen Induktion in humanem intestinalen Gewebe von MC-Patienten und Kontrollpatienten betrachtet werden. Im Fokus standen dabei die drei mit dem Krankheitsbild assoziierten Polymorphismen SNP8, SNP12 und SNP13 des NOD2/CARD15 Gens. Alle untersuchten Patienten der Mutationsgruppe (MUT) waren Träger einer heterozygoten Mutation.

Die aktive Form des NF- κ B Proteins wurde (i) durch Western Blot-Analyse in Gesamtzelllysaten intestinalen Gewebes und (ii) immunhistochemisch in Paraffinschnitten intestinalen Gewebes mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch die aktivierte Untereinheit p65 des NF- κ B Proteins bindet, nachgewiesen.

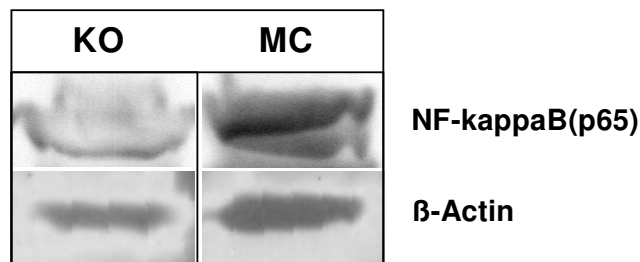


Abb. 4.9: Proteinchemischer Nachweis von NF- κ B(p65) in intestinalem Gewebe

Nachweis von aktiviertem NF- κ B(p65) in Zelllysaten intestinalen Gewebes eines Kontrollpatienten (KO) und eines MC-Patienten (MC). β -Actin = Ladungskontrolle. Im Zelllysate des MC-Patienten konnte deutlich mehr aktives NF- κ B Protein nachgewiesen werden als im Kontrolllysate. Diese Abbildung ist repräsentativ für 5 KO- und 5 MC-Patienten.

Durch Western Blot-Analysen konnte in Zelllysaten, die aus entzündeten Gewebearealen von MC-Patienten gewonnen wurden, eine deutlich höhere NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden als in den Kontrolllysaten (Abb. 4.9). Densitometrische Analysen der Bandenintensitäten (Differenz aus NF- κ B(p65) und β -Actin) bestätigten den Unterschied mit 341,4 NET DLU (*average net density light units/mm²*) für die NF- κ B(p65)-Bande des MC-Patienten vs. –45,8 NET DLU für die des Kontrolllysats.

Die Kontrollen zeigten erwartungsgemäß ebenfalls eine geringfügige NF- κ B-Aktivierung, da diese Proben von Patienten mit intestinalen Tumorerkrankungen gewonnen wurden.

Die immunhistochemische Untersuchung der NF- κ B-Aktivierung wurde wiederum Genotyp-spezifisch durchgeführt. Der Nachweis von aktiviertem NF- κ B in intestinalem Gewebe von Kontrollpatienten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Trägern des NOD2/CARD15 WT Gens mit $2,2 \pm 4,9$ positiv gefärbten Zellen/3 Gesichtsfelder (GF) und Trägern der mutierten Varianten des NOD2/CARD15 Gens mit $3,6 \pm 6,3$ positiv gefärbten Zellen/3 GF (Abb. 4.10 A, KO WT und KO MUT). Im Gewebe von MC-Patienten war die Anzahl der p65-positiv gefärbten Zellen mit $4,9 \pm 5,5$ vergleichbar mit den KO-Gruppen (Abb. 4.10 A, MC WT). MC-Patienten mit NOD2/CARD15 Mutationen zeigten dagegen mit $40,1 \pm 42,6$ NF- κ B(p65)-positiven Zellen/3 GF eine signifikante Induktion der NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zu MC-Patienten mit WT NOD2/CARD15 (Abb. 4.10 A, MC MUT, $p < 0,05$).

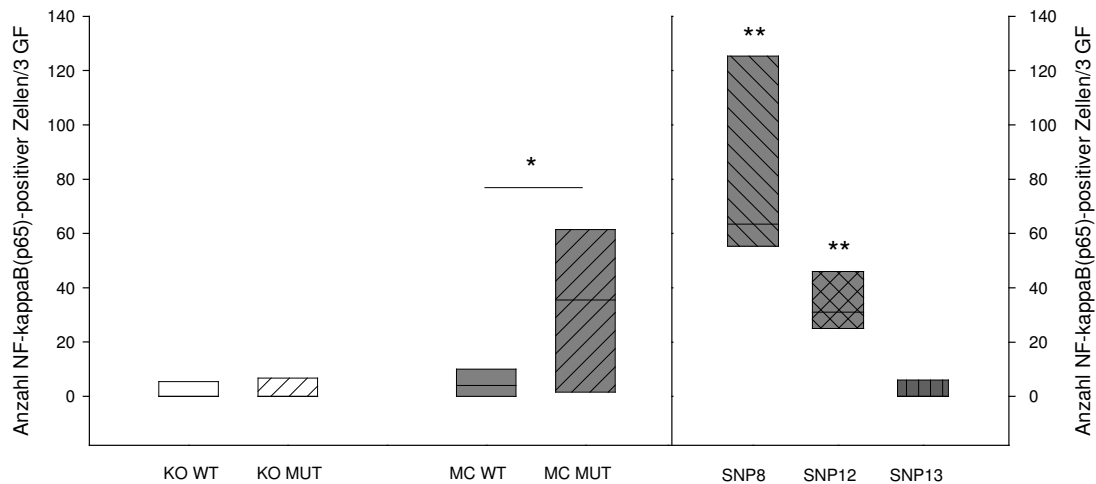
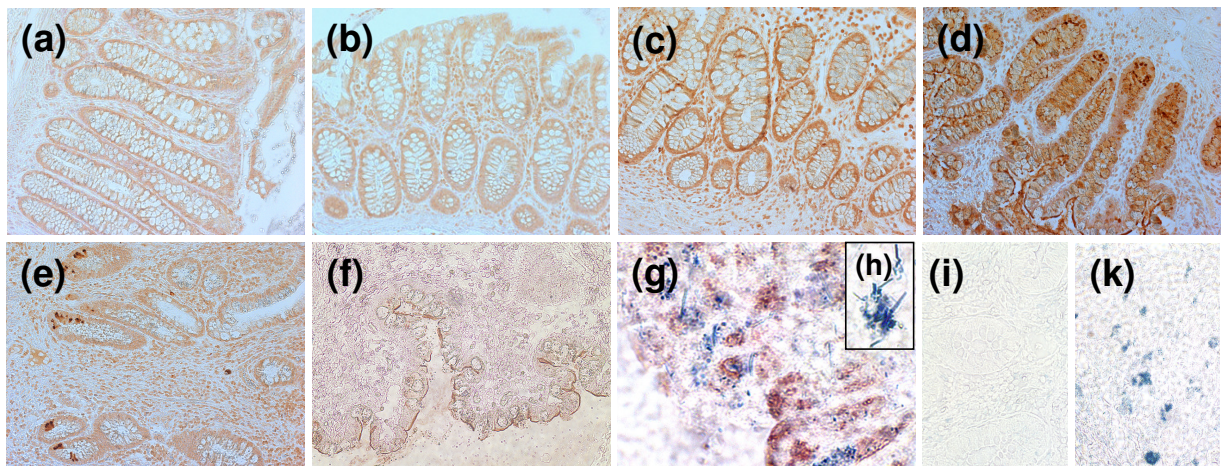
A**B**

Abb. 4.10: NOD2/CARD15 Genotyp-assoziierte Untersuchung der NF-κB-Aktivierung in intestinalem Gewebe

(A) Immunhistochemischer Nachweis und semiquantitative Erfassung NF-κB(p65) positiver Zellen in intestinalem Gewebe von KO- und MC-Patienten mit NOD2/CARD15 WT bzw. NOD2/CARD15 MUT Genotyp. NF-κB(p65) positive Zellen/3 GF wurden ausgezählt. **(B)** Repräsentative Gewebeausschnitte: **(a)** KO NOD2/CARD15 WT, **(b)** KO NOD2/CARD15 SNP8, **(c)** MC NOD2/CARD15 WT, **(d)** MC NOD2/CARD15 SNP8, **(e)** MC NOD2/CARD15 SNP12, **(f)** MC NOD2/CARD15 SNP13, **(g)** Doppelfärbung NF-κB(p65) (rot) und IMAC (CD68, blau), **(h)** einzelner IMAC, **(i)** Isotypkontrolle Einzelfärbungen mit Substitution des Primärantikörpers, **(k)** Isotypkontrolle Doppelfärbungen mit Substitution des Primärantikörpers. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Vergrößerung: (a-g, i, k) 200 x; (h) 1000 x. Diese Abbildung ist repräsentativ für ≥ 3 Patienten pro Kollektiv.

Die Auftrennung des Kollektivs der MC-Patienten mit Mutationen im NOD2/CARD15 Gen nach ihrer SNP-Variation zeigte, dass bei Patienten mit SNP8 ($81,4 \pm 38,3$ positiv gefärbte Zellen/3 GF) bzw. SNP12 ($34,0 \pm 10,8$ positiv gefärbte Zellen/3 GF) eine signifikant höhere NF- κ B-Aktivierung stattfindet als bei MC-Patienten ohne Polymorphismus (Abb. 4.10 A, $p < 0,05$). Im Gewebe von MC-Patienten mit SNP13 konnte mit $2,0 \pm 3,5$ positiv gefärbten Zellen/3 GF eine mit dem WT vergleichbare NF- κ B-Aktivierung beobachtet werden (Abb. 4.10 A).

Abbildung 4.10 B zeigt repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Lokalisation und semiquantitativen Erfassung (4.10 A) NF- κ B(p65)-positiver Zellen in intestinale Gewebe von Kontroll- und MC-Patienten mit NOD2/CARD15 WT und NOD2/CARD15 MUT Genotyp. Im Kollektiv der Kontrollpatienten mit NOD2/CARD15 Mutationen konnten unabhängig vom Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen keine NF- κ B(p65)-positiven Zellen nachgewiesen werden, es ist deshalb nur exemplarisch das Gewebe eines Patienten mit SNP8 gezeigt (Abb. 4.10 B (b)). Doppelfärbungen mit dem spezifischen NF- κ B(p65)-Antikörper und einem gegen den Makrophagenmarker CD68 gerichteten Antikörper zeigten eine Ko-Lokalisation der NF- κ B(p65)-positiven Zellen (rot) mit Makrophagen (blau) im intestinalen Gewebe (Abb. 4.10 B (g)). Unspezifische Färbereaktionen wurden durch Isotypkontrollen ausgeschlossen (4.10 B (i, k)).

4.3.4 Die Aktivität der NADPH-Oxidase ist in IMAC bei MC erhöht

Aufgrund der gezeigten differentiellen NOD2/CARD15 Genotyp-assoziierten Entzündungsantwort (4.3.3) sollte der Oxidative Burst wiederum mit dem NOD2/CARD15 Genotyp der Patientenkollektive korreliert werden.

ROS werden in Zellen durch metabolische Prozesse gebildet und induzieren vielfältige oxidative Schäden an verschiedenen Zellstrukturen, die in hohen pathologischen Konzentrationen das antioxidative Schutzsystem der Zelle überfordern. ROS wirken zudem bakterizid und spielen auch bei Entzündungsreaktionen eine Rolle, da z.B. aktivierte Leukozyten im sog. „Oxidativen Burst“ verschiedene ROS ($\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , HOCl , $\text{NO}\cdot$) produzieren. Bei Patienten mit CED wurde eine erhöhte ROS-Produktion nachgewiesen, die mit infiltrierenden Entzündungszellen (Makrophagen, Neutrophilen) assoziiert wird und auch für die mukosalen Gewebeschädigungen verantwortlich ist [187;197-199].

Es sollte deshalb die ROS-Produktion durch Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität in LPMNZ von MC-Patienten und Kontrollpatienten untersucht werden. Die NADPH-Oxidase-Aktivität wurde mittels FACS-Analyse durch Messung der Oxidation von Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123 bestimmt (3.17).

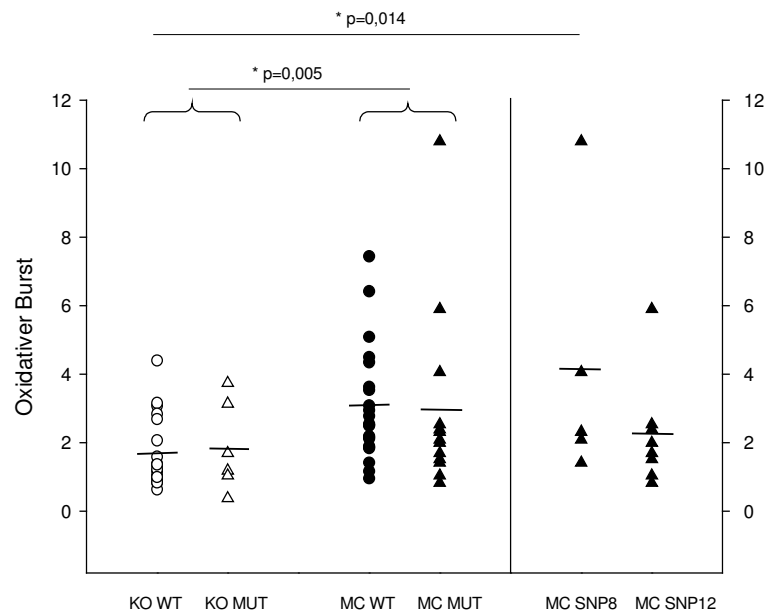


Abb. 4.11: NADPH-Oxidase Aktivität (Oxidativer Burst) in IMAC

Oxidativer Burst in IMAC aus der Mukosa von Kontrollpatienten (KO) und MC-Patienten (MC). Die Ordinate indiziert den Stimulierungsquotienten aus der Rhodamin 123-Fluoreszenz von Phorbol 12-Myristat 13-Acetat-stimulierten IMAC und unstimulierten IMAC. Die horizontalen Linien bezeichnen den jeweiligen Mittelwert der Patientenkollektive. WT - NOD2/CARD15 Wildtyp, MUT - NOD2/CARD15 Polymorphismus (SNP8, 12 oder 13). MC SNP8 und MC SNP12 zeigen das Gesamtkollektiv MC MUT aufgeschlüsselt nach den jeweiligen SNPs. In IMAC aus der Mukosa von MC-Patienten konnte ein signifikant erhöhter Oxidativer Burst im Vergleich zu nicht entzündungsassoziierten IMAC nachgewiesen werden ($p=0,005$). Bei Patienten mit SNP8 im NOD2/CARD15 Gen zeigte sich eine zusätzliche signifikante Erhöhung der ROS-Synthese ($p=0,014$).

IMAC aus der Mukosa von MC-Patienten zeigten mit einem Oxidativen Burst von $3,0 \pm 2,0$ eine signifikant erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite im Vergleich zu Kontrollpatienten mit einem durchschnittlichen Oxidativen Burst von $1,7 \pm 1,0$ (Abb. 4.11, $p=0,005$). Der NOD2/CARD15 Genotyp der Patientenkollektive (KO WT vs. KO MUT bzw. MC WT vs. MC MUT) zeigte keine Assoziation mit der Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite, lediglich im Kollektiv von Patienten mit MC und NOD2/CARD15 SNP8 Polymorphismus konnte eine signifikante Steigerung des Oxidativen Burst im Vergleich zu KO WT, aber nicht zu MC WT, nachgewiesen werden (Abb. 4.11, MC SNP8, $p=0,014$).

Zusammenfassend zeigen diese Daten im Krankheitsbild MC eine gesteigerte NF- κ B-Aktivierung, die mit dem NOD2/CARD15 Genotyp der Patienten assoziiert ist. Desweiteren konnte eine Induktion der ROS-Synthese durch eine gesteigerte NADPH-Oxidase Aktivität (Oxidativer Burst) nachgewiesen werden, die nicht mit den NOD2/CARD15 Polymorphismen zu korrelieren scheint.

4.4 Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation von Nalp3 und die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms

Die strukturelle Homologie von NOD2/CARD15 mit Nalp3, einem weiteren Vertreter der CATERPILLER Genfamilie, sowie dessen Beteiligung an der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Erkrankungen (1.5.2.2) führte zu der Frage, ob Nalp3 auch eine Rolle in der intestinalen Entzündung bei MC spielen könnte. Ebenso wie TLRs enthält Nalp3, die Schlüsselkomponente des Nalp3-Inflammasoms, LRRs. LRRs dienen der Erkennung bakterieller Komponenten. Die Bildung und Aktivierung des Inflammasoms, einer zytosolischen Multiprotein-Plattform, ist ein essentieller Prozess in der angeborenen Immunabwehr. Die Aktivierung des Inflammasom-Komplexes führt über die Aktivierung von Vorläufern proinflammatorischer Caspasen zur Spaltung von pro-IL-18 in IL-18, dessen Sekretion in einer potenten Immunantwort endet.

Im folgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden (i) inwieweit im Krankheitsbild MC Nalp3 und die nachgeschaltete Kaskade über das Inflammasom reguliert sind und (ii) welche Rolle IMAC und IEZ bei der Induktion der Immunantwort im intestinalen Gewebe spielen.

4.4.1 Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten kommt es zur Induktion von Nalp3

IEZ stellen lokal die erste Abwehr gegen eine große Zahl potentiell gefährlicher, luminaler Bakterien dar. Die epithelialen und bakteriellen Wechselwirkungen sind unter normalen Bedingungen tolerogen, bei CED-Patienten ist diese Toleranzvermittlung jedoch gestört, wodurch es zu einer chronischen Entzündung des Darms kommt, welche durch die Invasion von Bakterien in das mukosale und submukosale Gewebe zusätzlich verstärkt wird ([148;200], 4.2). Aufgrund der gestörten Toleranzvermittlung bei MC wurde eine mögliche differentielle Regulation des MDP Sensorproteins Nalp3 an der primären Invasionszone luminaler Bakterien vermutet.

4.4.1.1 Nalp3 ist im intestinalen Gewebe bei MC erhöht

Zunächst sollte immunhistochemisch untersucht werden, ob das intrazelluläre Sensorprotein Nalp3 im Darm von MC-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten differentiell vorhanden ist.

Im histologisch nicht entzündeten intestinalen Gewebe von Kontrollpatienten konnte nur sehr wenig bis gar kein Nalp3 Protein detektiert werden (Abb. 4.12 A), wohingegen das intestinale Gewebe von MC-Patienten deutlich Nalp3 mit vorwiegend (sub)epithelialer und kryptennaher Lokalisation und Akkumulation zeigte (Abb. 4.12 B und C). Durch Substitution des primären Nalp3 Antikörpers durch einen entsprechenden Isotyp konnte keine spezifische Färbung detektiert werden (Abb. 4.12 D).

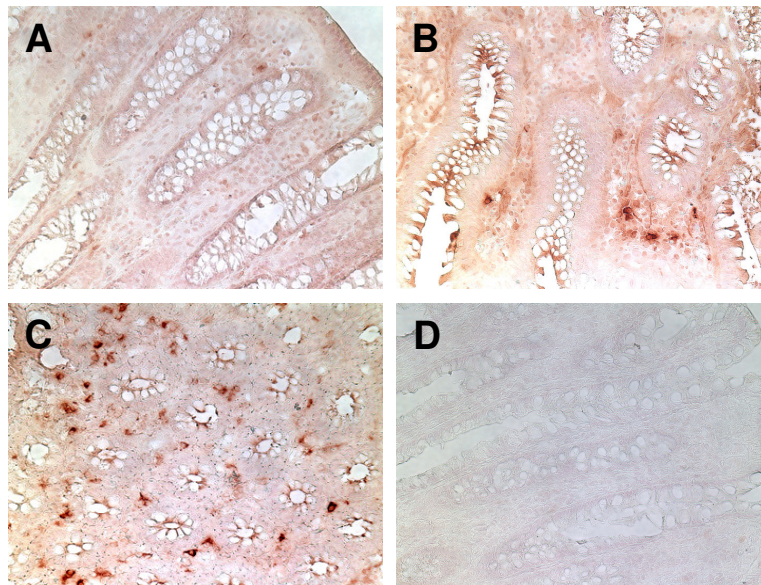


Abb. 4.12: Nalp3 im intestinalen Gewebe

Immunhistochemische Lokalisation von Nalp3 in intestinalem Gewebe eines (A) Kontrollpatienten und (B, C) eines MC-Patienten. (D) Isotypkontrolle. Vergrößerung 200 x. Diese Färbungen sind repräsentativ für 3 KO- und 3 MC-Patienten.

4.4.1.2 IEZ im gesunden Darm sind Nalp3-negativ

Die Lokalisation zahlreicher Nalp3-positiv gefärbter Zellen ließ vermuten, dass es sich hierbei unter anderem auch um IEZ handeln könnte. Zur Identifizierung Nalp3-synthetisierender IEZ wurden immunfluoreszente Doppelfärbungen durchgeführt; als Epithelzellmarker diente das Oberflächenprotein EP2. Die immunfluoreszente Lokalisation zeigte wiederum mehr Nalp3 im Gewebe von MC-Patienten (Abb. 4.13, grün). Durch Detektion von IEZ in einem zweiten Färbeschritt und anschließender Überlagerung der mikroskopischen Einzelaufnahmen konnten im Gewebe von KO-Patienten keine doppelt gefärbten Zellen lokalisiert werden (Abb. 4.13, KO). Im entzündeten Darm von MC-Patienten dagegen wurden zahlreiche Nalp3-positive IEZ nachgewiesen (Abb. 4.13, MC). Die Spezifität der Färbungen wurde durch drei Isotypkontrollen mit Substitution des primären Nalp3-

Antikörpers, des anti-EP2 Antikörpers oder beider Antikörper durch entsprechende Isotypantikörper sichergestellt (Daten nicht gezeigt).

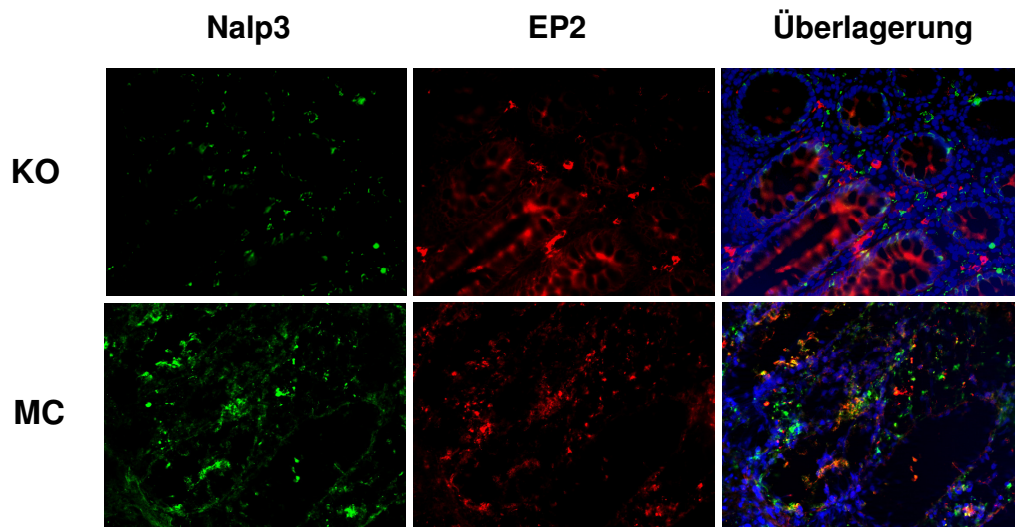


Abb. 4.13: Identifizierung Nalp3-positiver IEZ

Immunfluoreszenz Detektion von Nalp3 (grün) im intestinalen Gewebe eines Kontrollpatienten (KO) und eines MC-Patienten (MC). In einem zweiten Färbeschritt wurden über EP2 IEZ lokalisiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Ko-Lokalisation von Nalp3 und EP2 (orange, Überlagerung) zeigte an, dass es sich hierbei um Nalp3-positive IEZ handelte. Vergrößerung 200 x. Diese Färbungen sind repräsentativ für 8 KO- Patienten und 6 MC-Patienten.

Um zu untersuchen, ob es neben dem differentiellen Nalp3-Nachweis im Krankheitsbild MC auch zu Veränderungen der Nalp3 Genexpression kommt, wurden PCR-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden IEZ aus Resektaten von MC-Patienten und Kontrollpatienten gewonnen, die RNA isoliert und revers transkribiert. Die cDNA wurde anschließend für qualitative Expressionsanalysen verwendet.

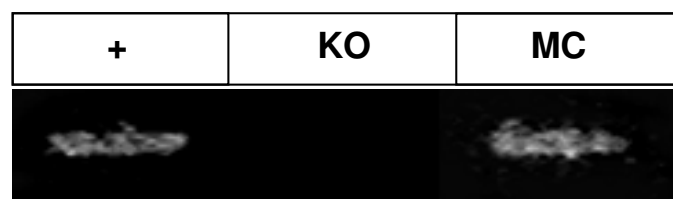


Abb. 4.14: Nachweis von Nalp3-mRNA in IEZ

Nachweis von Nalp3-mRNA in IEZ eines Kontrollpatienten (KO) und eines MC-Patienten (MC). Als Positivkontrolle (+) diente Monozyten cDNA. In IEZ aus nicht entzündeter Mukosa (KO) konnte keine Nalp3 mRNA nachgewiesen werden, die entzündungsassoziierten IEZ (MC) wiesen deutlich Nalp3 mRNA auf. Dieses Experiment ist repräsentativ für 6 KO-Patienten und 7 MC-Patienten.

In IEZ aus der Mukosa von Kontrollpatienten (KO) konnte keine Nalp3-mRNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten entzündungsassoziierte IEZ aus dem Darm von MC-Patienten (MC) einen hohen Nalp3-mRNA Gehalt, welcher der Positivkontrolle entsprach (Abb. 4.14).

Diese Untersuchungen zeigen, dass in IEZ und im epithelialen Darmgewebe von MC-Patienten verstärkt Nalp3-mRNA und -Protein nachgewiesen werden können, welche im gesunden Darm vollständig fehlen.

4.4.1.3 In entzündungsassoziierten IMAC sind sowohl Nalp3-mRNA als auch Nalp3-Protein verstärkt nachweisbar

Makrophagen als mikrobizide und entzündungsregulierende Zellen sind für die zellvermittelte Immunität von zentraler Bedeutung. Aufgrund der moderaten Nalp3-Präsenz in KO und dem Fehlen in IEZ sowie der subepithelialen Lokalisation sollte nun untersucht werden, ob es sich bei den Nalp3-Produzenten um IMAC handelte. Zunächst wurden mittels immunfluoreszenter Doppelfärbungen unter Verwendung des charakteristischen Makrophagenmarkers CD68 Nalp3-positive IMAC in der Mukosa von MC-Patienten und Kontrollen identifiziert.

In der entzündeten Mukosa von MC-Patienten konnten deutliche Mengen an Nalp3 nachgewiesen werden (Abb. 4.15, MC), während die Nalp3-Level im KO-Gewebe reduziert waren (Abb. 4.15, KO). Durch immunfluoreszente Doppelfärbungen wurden sowohl im Gewebe von MC-Patienten als auch im Kontrollgewebe IMAC als Nalp3 produzierende Zellen identifiziert (Abb. 4.15, Überlagerung). Doppelt positiv gefärbte Zellen waren vorwiegend um die Krypten lokalisiert und überwogen im entzündeten Gewebe deutlich.

Durch PCR-Analysen wurde untersucht, ob es bei MC auch zu Veränderungen im Nalp3-mRNA-Gehalt kommt. Hierfür wurden IMAC aus Resektaten von MC-Patienten und Kontrollpatienten gewonnen, die mRNA isoliert und revers transkribiert. Die cDNA wurde anschließend für quantitative Expressionsanalysen verwendet (3.7). IMAC aus entzündeter Mukosa von MC-Patienten zeigten eine signifikant erhöhte Nalp3 mRNA-Menge im Vergleich zu nicht entzündungsassoziierten IMAC (Abb. 4.16, $p=0,04$).

Analog zu den Daten aus entzündungsassoziierten IEZ zeigen diese Ergebnisse einen im Vergleich zur Kontrolle verstärkten Nachweis von Nalp3-mRNA und -Protein in IMAC im entzündeten intestinalen Gewebe bei MC.

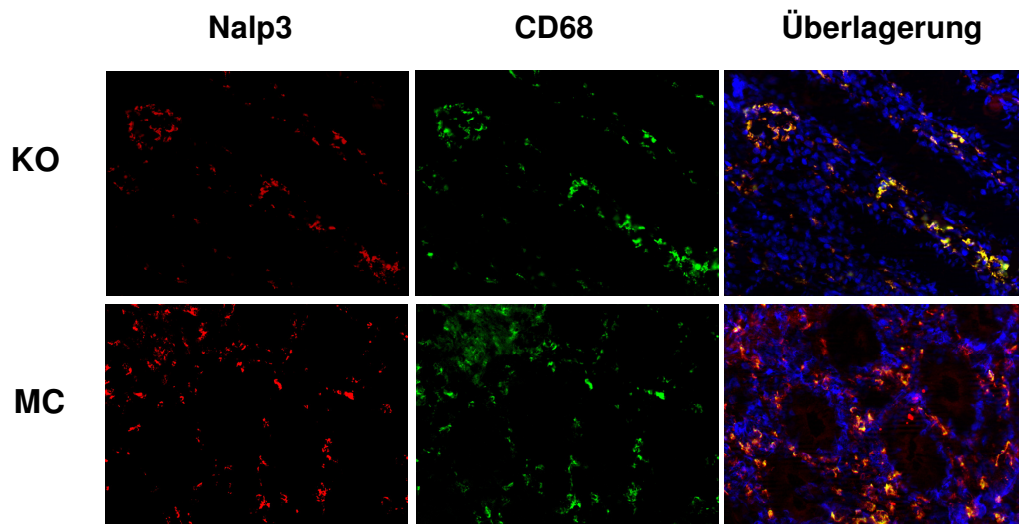


Abb. 4.15: Identifizierung Nalp3 positiver IMAC

Immunfluoreszente Detektion von Nalp3 (rot) im intestinalen Gewebe eines Kontrollpatienten (KO) und eines MC-Patienten (MC). In einem zweiten Färbeschritt wurden über CD68 IMAC lokalisiert (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Ko-Lokalisation von Nalp3 und CD68 (orange, Überlagerung) zeigte an, dass es sich hierbei um Nalp3 positive IMAC handelte. Vergrößerung 200 x. Diese Färbungen sind repräsentativ für 7 KO-Patienten und 7 MC-Patienten.

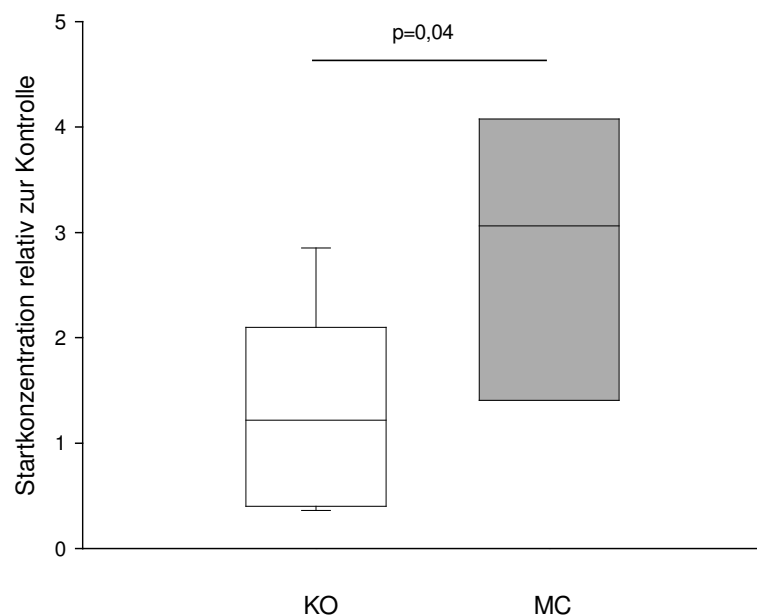


Abb. 4.16: Nalp3 mRNA-Nachweis in IMAC

Quantitative Analyse (Taqman®) der Nalp3 mRNA in IMAC aus der Mukosa von Kontrollpatienten (KO) und MC-Patienten (MC). Jede Box setzt sich aus den Mittelwerten der dreifachen mRNA Quantifizierung jedes Patienten zusammen. Entzündungsassoziierte IMAC zeigten signifikant erhöhte mRNA-Level verglichen mit IMAC aus nicht entzündeter Mukosa ($p=0,04$). Diese Abbildung beinhaltet 10 KO- und 4 MC-Patienten.

4.4.2 Im entzündungsassoziierten intestinalen Gewebe kommt es zur Aktivierung des Nalp3 Inflammasoms

Wie initial beschrieben (4.4) gehört Nalp3 zu den Schlüsselmolekülen des Nalp3-Inflammasoms. Aufgrund der bekannten Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms durch MDP und der gezeigten Regulation von Nalp3 bei MC sollte untersucht werden, ob Nalp3 einen Einfluss auf die Initiation der Inflammasom-vermittelten Entzündungsantwort hat. Hierfür wurde zunächst die Aktivität von Caspase-1 in Zelllysaten intestinaler Mukosa von MC-Patienten und KO-Patienten bestimmt. Nach Zugabe eines spezifischen Fluorochrom-konjugierten Substrats zum Zelllysat kommt es bei enzymatischer Aktivität zur Spaltung des Substrats mit Freisetzung des fluoreszenten Reportermoleküls, dessen Emission fluorometrisch detektiert werden kann. Die Fluoreszenzintensität ist somit direkt proportional zur enzymatischen Aktivität der Caspase-1.

In der entzündeten Mukosa von MC-Patienten wurde mit 10654 ± 3840 RFU eine 4-fach höhere Caspase-1 Aktivität nachgewiesen als im Kontrollgewebe mit 2586 ± 2395 RFU (Abb. 4.17, $p < 0,01$).

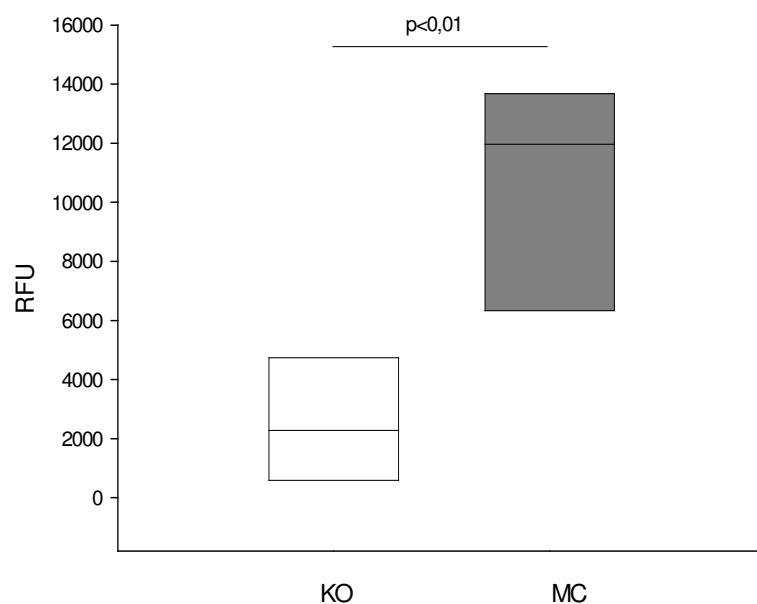
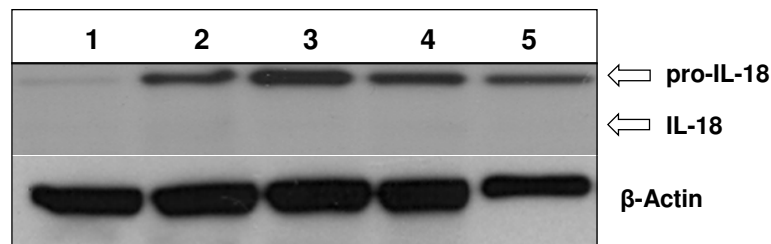


Abb. 4.17: Caspase-1-Aktivität in der intestinalen Mukosa

Caspase-1-Aktivität in der intestinalen Mukosa von Kontrollpatienten (KO) und MC-Patienten (MC). In entzündungsassoziiierter Mukosa von MC-Patienten konnte eine signifikant höhere Caspase-1-Aktivität nachgewiesen werden als im mukosalen Kontrollgewebe (KO) ($p < 0,01$). RFU – Relative Fluorescence Units. Diese Abbildung beinhaltet 5 KO und 3 MC Patienten.

Aktive Caspase-1 überführt pro-IL-18 durch Abspaltung des Propeptids in seine reife Form, welche daraufhin sezerniert wird. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die differentielle Caspase-1-Aktivität die Prozessierung von IL-18 beeinflusst. Hierfür wurden Zelllysate intestinaler Mukosa von Kontrollpatienten und MC-Patienten mittels Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch sowohl pro-IL-18 als auch reifes IL-18 detektiert, untersucht.

KO



MC

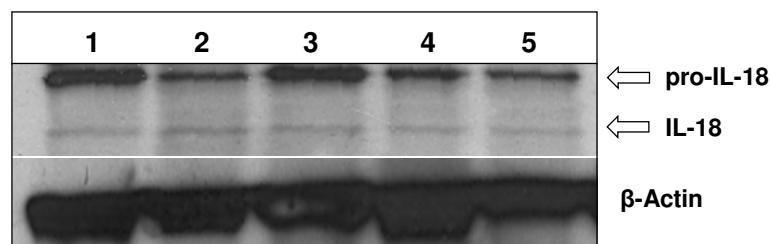


Abb. 4.18: Proteinchemischer Nachweis von pro-IL-18 und IL-18

Detektion von pro-IL-18 und IL-18 in Zelllysaten intestinalen Gewebes von 5 Kontrollpatienten (KO, 1-5) und 5 MC-Patienten (MC, 1-5). Pro-IL-18 wurde sowohl in Kontrolllysaten als auch in Zelllysaten von MC-Patienten nachgewiesen. Reifes IL-18 konnte nur in den entzündungsassoziierten Proben (MC) detektiert werden. β-Actin = Ladungskontrolle.

In den Zelllysaten von Kontrollpatienten (KO) und von MC-Patienten (MC) wurde die IL-18 Proform detektiert (Abb. 4.18). Reifes IL-18 und somit IL-18 Prozessierung konnte ausschließlich in den entzündungsassoziierten Proben der MC-Patienten nachgewiesen werden (Abb. 4.18, MC). Die Kontrolllysate zeigten keine IL-18 spezifische Bande (Abb. 4.18, KO).

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass es im Krankheitsbild MC zur Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms kommt, die eine Aktivierung von Caspase-1 sowie Prozessierung von IL-18 zur Folge hat.

4.4.3 Nalp3 im dreidimensionalen multizellulären Sphäroidmodell

Um den differentiellen Nachweis von Nalp3 in IMAC von MC-Patienten zu bestätigen, sollte Nalp3 in multizellulären Sphäroiden (MZS) untersucht werden. Dieses Modell imitiert die Differenzierung humaner Blutmonozyten in die reaktive Makrophagenpopulation, welche in der Mukosa von MC-Patienten gefunden wurde [201]. MZS wurden wie in 3.1.1.4 beschrieben generiert und nach 1, 3 und 7 Tagen Ko-Kultur mit Blutmonozyten auf Nalp3 Protein untersucht. Hierfür wurden 3 µm dicke Schnitte der MZS verwendet.

Die immunhistochemische Analyse der *Ad5_monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1)-transfizierten HT-29 MZS, die 1 Tag co-kultiviert wurden, wiesen nur einzelne Nalp3 positive Zellen in der äußeren Peripherie des MZS auf (Abb. 4.19 A). Nach 3 Tagen Ko-Kultur konnten Nalp3 positive Zellen entsprechend der Migrationsrichtung einwandernder Blutmonozyten/Makrophagen detektiert werden (Abb. 4.19 B). An Tag 7 wurde im gesamten MZS Nalp3 lokalisiert (Abb. 4.19 C). In den mit dem Kontrollvektor Ad5 transfizierten MZS konnte unabhängig von der Inkubationszeit mit Blutmonozyten kein Nalp3 nachgewiesen werden (Abb. 4.19 D, exemplarisch ist hier d3 gezeigt). Durch Isotypkontrollen wurden unspezifische Färbungen ausgeschlossen (Abb. 4.19 E, F).

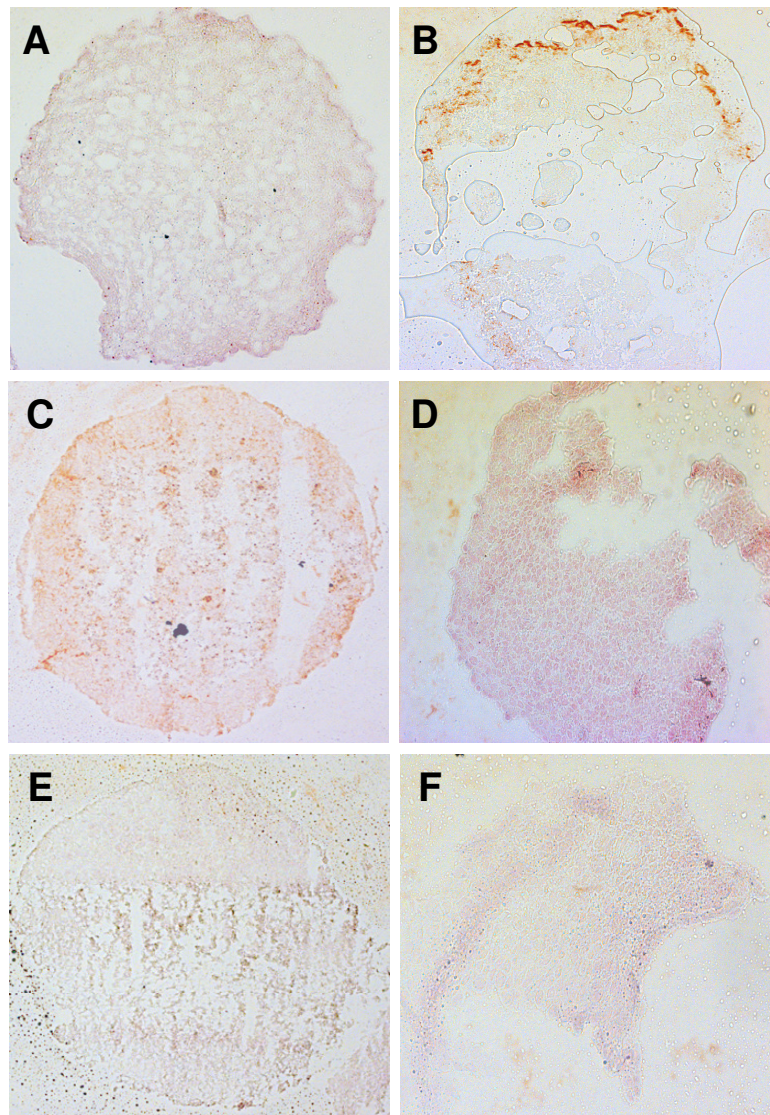


Abb. 4.19: Nachweis von Nalp3 im dreidimensionalen MZS Modell

Immunhistochemische Detektion von Nalp3 in HT-29 Sphäroiden nach 1d, 3d und 7d Ko-Kultur mit Blutmonozyten. **(A)** nach 1d waren nur wenige bis gar keine Nalp3-positiven Zellen detektierbar, **(B)** nach 3d waren Nalp3 positive Zellen entlang der Migrationsroute einwandernder Monozyten/Makrophagen nachweisbar, **(C)** nach 7d wurden große Mengen an Nalp3 im gesamten Sphäroid detektiert, **(D)** Negativkontrolle (Ad5 (leerer Vektor)), **(E)** Isotypkontrolle Ad5_MCP1 transfizierte HT-29 Zellen, **(F)** Isotypkontrolle Ad5 transfizierte HT-29 Zellen. Vergrößerungen 100 x (A, B, C, E); 200 x (D, F). Diese Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Im Hinblick auf die immunhistochemischen Analysen im humanen intestinalen Gewebe (4.4.1; Abb. 4.12 und 4.13) und um zu beweisen, dass diese migrierenden, Nalp3-positiven Zellen IMAC sind, wurden immunfluoreszente Doppelfärbungen durchgeführt. In den Ad5_MCP1 transfizierten HT-29 MZS wurden nach 1, 3 und 7 Tagen Ko-Kultur mit Blutmonozyten Nalp3-Protein und in einem zweiten Färbeschritt IMAC über ihren Oberflächenmarker CD68 immunfluoreszent markiert.

Nach 1 Tag Ko-Kultur mit Blutmonozyten wurde nur eine geringe Nalp3-Färbung in den MZS beobachtet (Abb. 4.20 oben, rot), eingewanderte Monozyten/Makrophagen konnten nicht lokalisiert werden (Abb. 4.20 oben, grün). Nach zwei weiteren Tagen Ko-Kultur stieg die Zahl Nalp3-positiver Zellen in der Peripherie der MZS an (Abb. 4.20, Mitte, rot). Durch Überlagerung der mikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen migrierenden Zellen um Monozyten oder differenzierte Makrophagen handelte, die der beschriebenen Migrationsroute folgten [201] (Abb. 4.20 Mitte, Überlagerung). Nach 7 Tagen Ko-Kultur zeigte sich eine massive Invasion Nalp3-produzierender IMAC im gesamten MZS (Abb. 4.20 unten).

Diese Daten zeigen, dass es im MZS-Modell zu einem differenzierungsspezifischen Anstieg der Nalp3-Menge kommt.

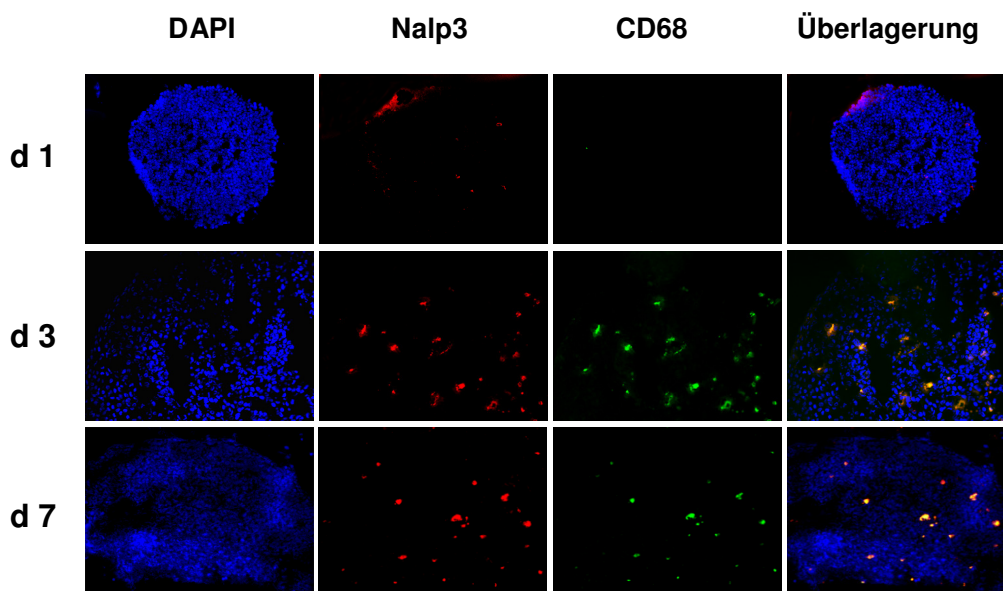


Abb. 4.20: Identifizierung Nalp3 positiver Zellen im MZS Modell

Immunfluoreszenz Detektion Nalp3 (rot)-positiver IMAC (CD68, grün) in Ad5_MCP1 transfizierten HT-29 MZS nach 1d (oben), 3d (Mitte) und 7d (unten) Ko-Kultur mit Blutmonozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Vergrößerungen 100 x (d1) und 200 x (d3; d7). Diese Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zusammenfassend zeigt dieser Teil der Arbeit, dass es im Krankheitsbild MC zur Adhärenz und Translokation von luminalen Bakterien in das intestinale Gewebe sowie zur Modifikation der epithelialen Zell-Zell Kontakte kommt. Durch intrazelluläre bakterielle Stimulierung kommt es im Krankheitsbild MC durch die Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors, die Aktivierung von NF- κ B und des Nalp3-Inflammasoms zu multiplen NOD2/CARD15- Genotyp-

spezifischen Entzündungsreaktionen, die sich in einer gesteigerten Synthese proinflammatorischer Zytokine widerspiegeln.

4.5 Die lysosomalen Proteinasen Cathepsin B, Cathepsin D und Cathepsin L in der Pathogenese der CED

Inwieweit die bakterielle Translokation auf andere entzündungsfördernde und gewebedegradierende Prozesse Einfluss nimmt, ist nicht bekannt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte durch die Technik der Subtraktiven Hybridisierung u.a. die lysosomale Proteinase Cathepsin D als differentiell exprimiertes Gen in der entzündungsassoziierten IMAC-Population bei CED identifiziert werden [180]. Cathepsine spielen neben der finalen Proteindegradation im normalen Zellstoffwechsel eine immer größere Rolle in zahlreichen destruktiven und malignen Erkrankungen, wie Osteoporose, Krebsmetastasierung oder rheumatoider Arthritis [154-156]. Es sollte deshalb untersucht werden, ob diese proteolytischen Enzyme am massiven Gewebeabbau in der intestinalen Mukosa von MC-Patienten beteiligt sein könnten und ob die Modulation ihrer Aktivität einen Therapieansatz für CED darstellen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die im Zusammenhang mit anderen pathophysiologischen Vorgängen am besten charakterisierten Cathepsine B, L und D untersucht.

4.5.1 Die bakterielle Zellwandkomponente MDP induziert CTSB und CTSL *in vitro*

Um zu untersuchen, ob die Expression der Cathepsine B und L durch die gesteigerte bakterielle Translokation in die intestinale Mukosa bei CED beeinflusst werden kann, wurden *in vitro* Stimulierungsversuche mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil MDP durchgeführt und der CTSB und CTSL RNA-Gehalt quantitativ analysiert.

Wie initial beschrieben exprimieren HEK293T-Zellen kein NOD2/CARD15 und besitzen somit keinen intrazellulären Sensor für MDP [195]. Sie wurden deshalb zunächst mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1_NOD2/CARD15, welches für das humane NOD2/CARD15 Gen codiert, bzw. als Negativkontrolle mit dem „leeren“ pcDNA3.1-Vektor transient transfiziert. Anschließend erfolgte eine Stimulierung mit ansteigenden Konzentrationen MDP (0 - 1000 ng/ml). Nach 24 h wurden die Zellen lysiert, die Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR in DNA transkribiert. Die quantitative Analyse der CTSB- und CTSL RNA-Menge erfolgte durch Taqman® PCR.

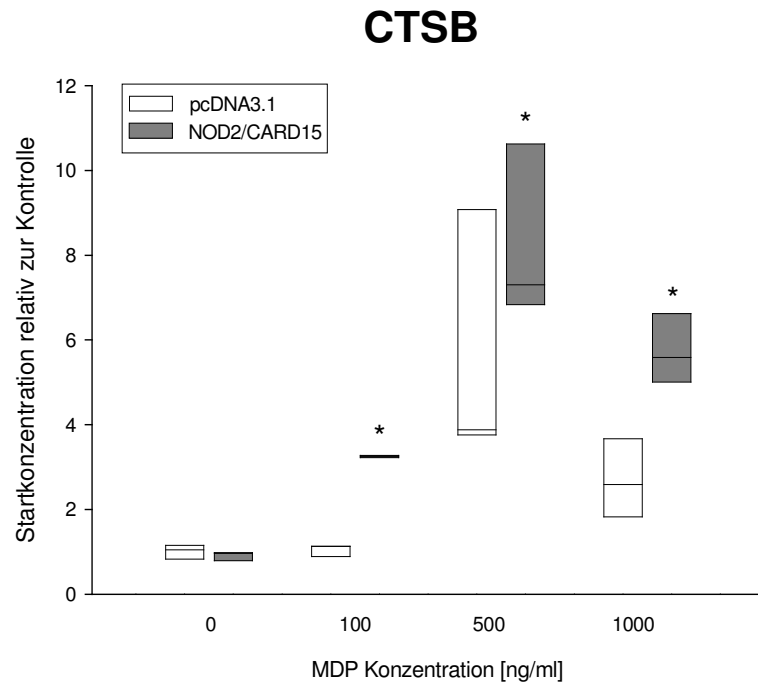
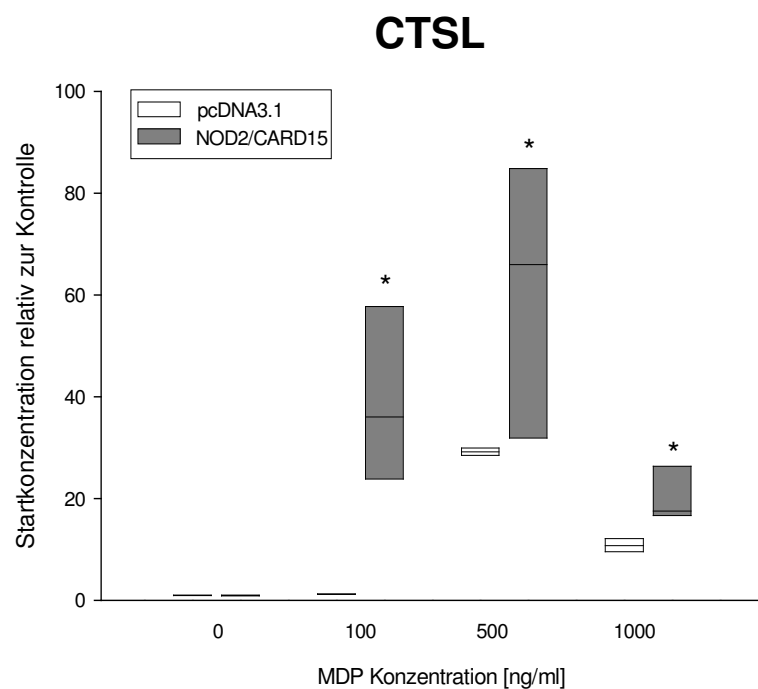
A**B**

Abb. 4.21: CTSB und CTSL Expression in HEK293T Zellen

Quantitative Analyse (Taqman®) von CTSB (**A**) und CTSL (**B**) RNA in HEK293T-Zellen. Die Zellen wurden mit dem NOD2/CARD15 Expressionsplasmid NOD2_pcDNA3.1 (grau) bzw. dem Kontrollvektor pcDNA3.1 (weiss) transient transfiziert und mit ansteigenden Konzentrationen MDP stimuliert. Die MDP-Stimulierung resultierte in einer signifikanten Steigerung der CTSB und CTSL RNA-Menge. Der höchste RNA-Gehalt wurde jeweils bei einer Stimulierungsdosis von 500 ng/ml MDP erreicht. * $p < 0,05$ (in Bezug auf pcDNA unstimuliert, Student t-Test). Diese Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die dosisabhängige Stimulierung von HEK293T-Zellen mit MDP führte *in vitro* zur signifikanten Steigerung von sowohl CTSB (Abb. 4.21 A) als auch CTSL (Abb. 4.21 B) RNA, wobei die Menge an CTSL RNA bis zu 10-fach höher war als die CTSB RNA-Menge. Die höchste Rate wurde jeweils bei einer Stimulierungsdosis von 500 ng/ml MDP erreicht. Zellen, die mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1 transfiziert wurden, zeigten hingegen keine Erhöhung des RNA-Gehaltes beider Cathepsine als Antwort auf MDP-Stimulierung (Abb. 4.21).

Die Daten zeigen, dass MDP als potentieller Stimulus bei bakterieller Translokation zur Steigerung der CTSB und CTSL RNA-Menge führt.

4.5.2 Der CTSB- und CTSL-mRNA-Gehalt ist in humanen entzündungsassoziierten IMAC erhöht

Aufgrund der Identifizierung von CTSD als differentiell exprimiertes Gen bei MC [180] und der Induktion der Expression von CTSB und CTSL als Antwort auf einen bakteriellen Stimulus wurde die mRNA-Menge von CTSB und CTSL in humanen IMAC, die aus der intestinalen Mukosa von Kontrollpatienten und CED-Patienten mit CU bzw. MC isoliert wurden, mittels RT-PCR untersucht. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte durch Taqman[®] PCR. Die Integrität der cDNA wurde mit dem Gene Checker[™] Kit überprüft (Abb. 4.22 A, repräsentativ ist hier nur GAPDH gezeigt).

Im Gegensatz zu CTSD, dessen Expression nur in entzündungsassoziierten IMAC nachgewiesen werden konnte [180], wurden CTSB- und CTSL mRNA sowohl in IMAC aus Kontrollen als auch CED-Patienten detektiert (Abb. 4.22 A).

Zur Quantifizierung der mRNA wurden *Real-time* PCR-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die mRNA von drei KO und fünf Patienten mit MC oder CU untersucht. Die CTSL mRNA war in Patienten mit CED im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten 10-fach erhöht (Abb. 4.22 B, $p < 0,05$). Ebenso konnte tendenziell mehr CTSB mRNA bei CED-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten beobachtet werden (Abb. 4.22 B). Dieser Unterschied war aufgrund der hohen Variabilität der CTSB mRNA in entzündungsassoziierten Makrophagen nicht signifikant.

Zusammen mit den Vordaten zur CTSD-Expression zeigen diese Ergebnisse erhöhte CTSB und CTSL mRNA-Mengen in IMAC bei der pathologischen mukosalen Entzündung.

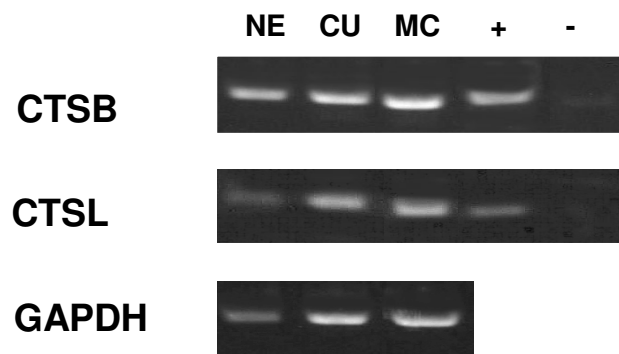
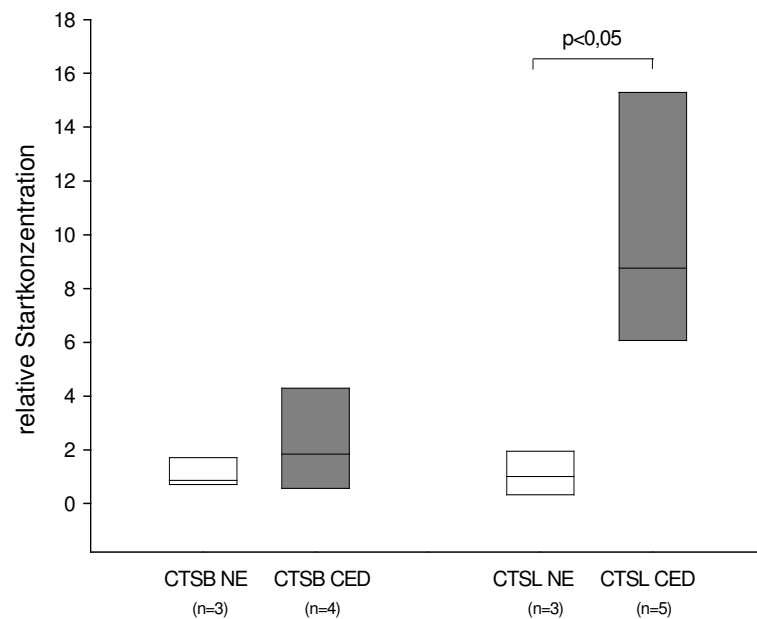
A**B**

Abb. 4.22: CT SB und CT SL mRNA-Gehalt in IMAC

(A) CT SB und CT SL mRNA-Gehalt in CD33 positiven IMAC eines Kontrollpatienten (KO), eines Patienten mit CU und eines Patienten mit MC. Positivkontrolle (+): Gelextraktion eines CT SB bzw. CT SL DNA Fragments, Negativkontrolle (-): ohne DNA. Sowohl CT SB als auch CT SL konnte in KO-Patienten und CED-Patienten nachgewiesen werden. Dieses Experiment wurde dreifach mit jeweils verschiedenen Patientenproben wiederholt. **(B)** Quantitative Analyse (Taqman®) der CT SB und CT SL mRNA-Menge in IMAC von Kontroll- (KO) und CED-Patienten. Jede Box setzt sich aus den Mittelwerten der dreifachen mRNA Quantifizierung jedes Patienten zusammen. Sowohl CT SB als auch CT SL wurde in IMAC von Kontrollpatienten und CED-Patienten exprimiert. Signifikant höhere CT SL mRNA-Level wurden bei CED nachgewiesen ($p<0,05$). Daneben wurde ein Trend zu erhöhtem CT SB mRNA-Gehalt bei CED beobachtet.

4.5.3 CTSB und CTSL Protein sind in humanen entzündungsassoziierten IMAC verstärkt nachweisbar

Um festzustellen, ob die Mengenunterschiede in der CTSB und CTSL mRNA bei CED auch auf Proteinebene nachweisbar sind, wurde humanes Kolongewebe mit und ohne intestinale Entzündung immunhistochemisch auf CTSB- und CTSL Protein in IMAC untersucht.

Hierfür wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte in Paraffin eingebetteter Darm-Resektate, die von Kontrollpatienten (n=13) und CED-Patienten (MC: n=12, CU: n=4) stammten, verwendet.

CTSB Protein wurde in histologisch nicht entzündetem Kolongewebe von Kontrollpatienten (Abb. 4.23, KO) und verstärkt in entzündetem Kolongewebe von Patienten mit CU (Abb. 4.23, CU) und MC (Abb. 4.23, MC) detektiert. Um den CTSB-produzierenden Zelltyp zu identifizieren, wurden immunfluoreszente Doppelfärbungen durchgeführt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CTSD in IMAC exprimiert wurde [180]. Die Verteilung und Akkumulation CTSB-positiver Zellen in Arealen großer Gewebeschädigung (Abb. 4.23) ließ vermuten, dass es sich hierbei ebenfalls um IMAC handelte. Die Doppelfärbungen zur Lokalisation von CTSB Protein in IMAC (CD68) zeigten sowohl in nicht entzündetem Kontrollgewebe (Abb. 4.23, Überlagerung), als auch in entzündetem Gewebe von Patienten mit CU (Abb. 4.23, Überlagerung) und MC (Abb. 4.23, Überlagerung) eine Ko-Lokalisation. Unspezifische Färbereaktionen wurden durch drei Isotypfärbungen mit Substitution des Primär-Antikörpers, des Sekundär-Antikörpers bzw. beiden ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

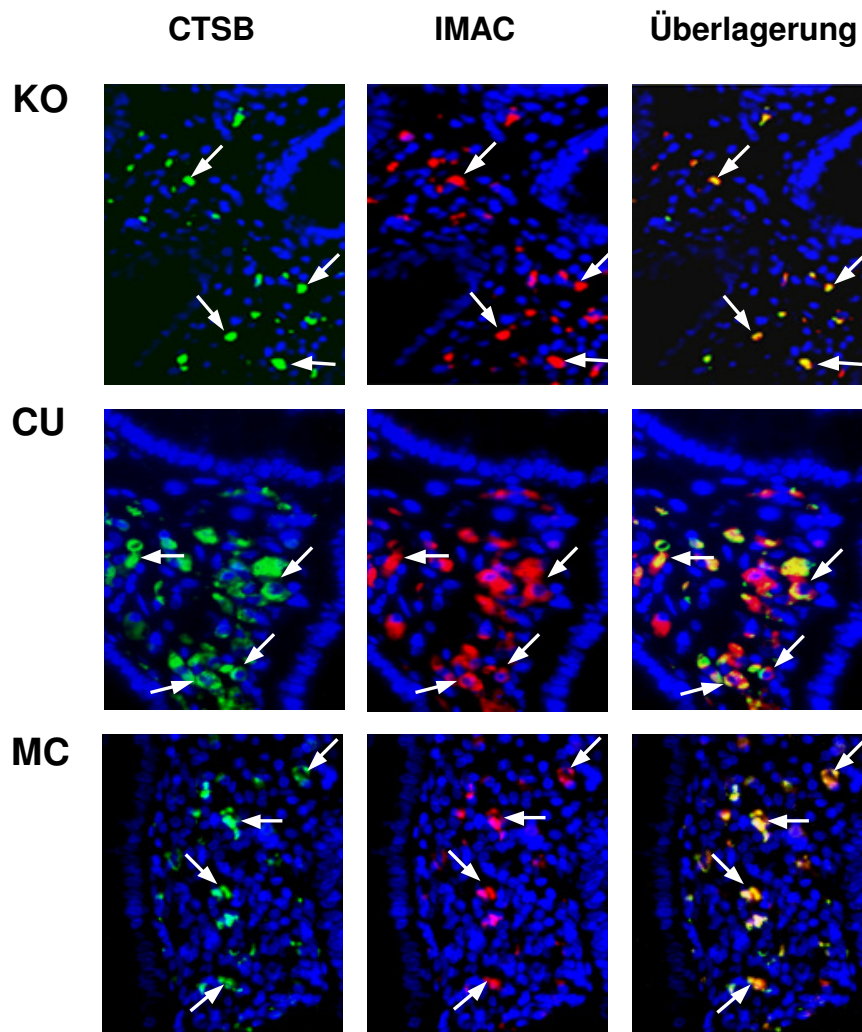


Abb. 4.23: Immunfluoreszenz Detektion CTSB-positiver IMAC

Immunfluoreszenz Detektion CTSB-positiver Zellen in humaner intestinaler Mukosa von Kontrollpatienten (KO) und CED-Patienten (CU: Colitis ulcerosa, MC: Morbus Crohn). In Paraffin eingebettetes Kolongewebe wurde fluoreszent einzeln und doppelt auf CTSB (grün), Makrophagen-spezifisches CD68 (rot) und mit DAPI (blau) gefärbt. CTSB-enthaltende IMAC waren in der Mukosa eines KO-Patienten, eines CU-Patienten und eines MC-Patienten nachweisbar. Doppelt gefärbte Zellen sind durch weiße Pfeile markiert. Vergrößerung: 400 x. Diese Abbildung ist repräsentativ für 13 KO-Patienten und 16 CED-Patienten (MC: n=12, CU: n=4).

CTSL wurde ebenfalls sowohl in intestinale Gewebe von Patienten mit histologisch nicht entzündeter Mukosa (Abb. 4.24 A, B), als auch in entzündeter Mukosa von CU-Patienten (Abb. 4.24 C, D) und MC-Patienten (Abb. 4.24 E) detektiert. CTSL-positive Zellen waren subepithelial akkumuliert und vorwiegend in der Nähe der Krypten lokalisiert. In den Isotypkontrollen wurde keine spezifische Färbung festgestellt (Abb. 4.24 F). Die Anzahl CTSL-positiver Zellen war in CED-Patienten in Arealen mukosaler Ulzerationen und Akkumulationsherden mononukleärer Zellen erhöht (Abb. 4.24 C, E). Immunhistochemische Doppelfärbungen zeigten auch für CTSL eine Ko-Lokalisation mit CD68-positiven IMAC - sowohl in nicht entzündetem mukosalem Gewebe als auch in der Mukosa von CED

Patienten. Es waren außerdem einige wenige CTSL-negative IMAC detektierbar (Abb. 4.24 C-E). Unspezifische Färbereaktionen wurden durch Isotypfärbungen ausgeschlossen: ausschließlich CTSL positive Zellen wurden detektiert, wenn der anti-CD68 Antikörper durch seinen Isotyp ersetzt wurde; wurden beide Primär-Antikörper ersetzt wurde weder CTSL noch CD68 Protein immunhistochemisch angefärbt; durch Substitution des anti-CTSL Antikörpers mit seiner Isotypkontrolle wurde nur die blaue CD68-Immunfärbung detektiert (Abb. 4.24 G)

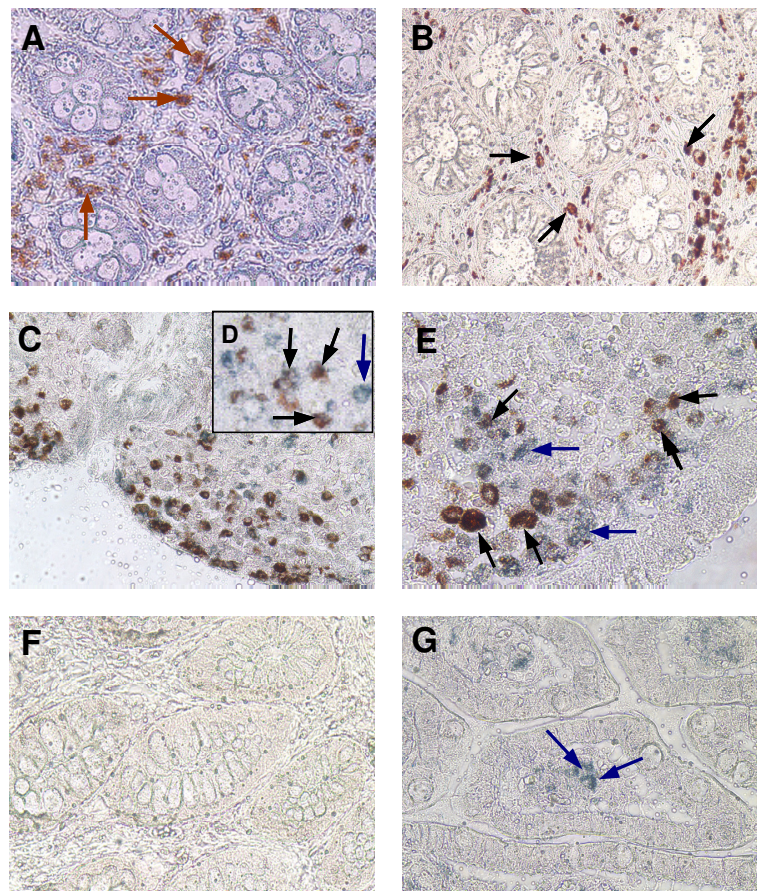


Abb. 4.24: Immunhistochemische Detektion CTSL-positiver IMAC

Immunhistochemische Detektion CTSL-enthaltender Zellen in humaner intestinaler Mukosa. CTSL-positive Zellen wurden mit Vector® NovaRED® (rotbraun) und der Makrophagenmarker CD68 mit BDHC (blau) visualisiert. (A) Einzeln gefärbte CTSL-positive Zellen (rotbraun) in der Mukosa eines KO-Patienten. Die Zellen wurden mit HE gegengefärbt. (B-E) CTSL (rotbraun) konnte mit IMAC (blau) in der Mukosa eines KO-Patienten (B), eines CU-Patienten (C, D) und eines MC-Patienten (E) ko-lokalisiert werden. Die schwarzen Pfeile zeigen doppelt gefärbte Zellen. CTSL-positive IMAC waren in Arealen starker Entzündung und Gewebeschäden akkumuliert (C, E). (F) Isotypkontrolle (KO-Gewebe). (G) Einzeln gefärbte IMAC (blau; blaue Pfeile) in der Mukosa eines KO-Patienten. Mit dem CTSL Isotyp Kontroll-Antikörper im ersten Färbeschritt wurde keine Färbung detektiert. Vergrößerung 200x (A, B, C, F) und 400x (D, E, G). Diese Abbildung ist repräsentativ für 13 KO-Patienten und 16 CED-Patienten (MC: n=12, CU: n=4).

Die immunhistochemische Detektion von CTSB- und CTSL Protein in IMAC aus der Mukosa von KO- und CED-Patienten korrelierte mit den mRNA-Daten, welche eine Erhöhung in IMAC von CED-Patienten zeigten.

Zusammenfassend zeigen diese Daten eine Erhöhung der Mengen von mRNA und Protein der lysosomalen Protease CTSL sowie einen tendentiellen Anstieg von CTSB bei CED.

4.5.4 Die Hemmung der Cathepsin-Aktivität resultiert in einer verminderten Entzündungsreaktion im murinen DSS-Colitis-Modell *in vivo*

Aufgrund der gezeigten Steigerung des CTSB- und CTSL RNA-Gehalts durch den bakteriellen Stimulus MDP, der Erhöhung der mRNA- und Proteinmenge in entzündungsassoziierten IMAC und der in Vorarbeiten gezeigten induzierten CTSD-Expression bei MC [180] sollte nun der Einfluss einer selektiven Hemmung der untersuchten Cathepsine analysiert werden. Hierzu sollte die in Balb/c-Mäusen induzierte Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)-Modell-Colitis dienen.

4.5.4.1 Die Cathepsine B, D und L sind im murinen Kolon aktiv

Um die basale biologische Aktivität der in den Expressionsanalysen untersuchten Cathepsine im murinen Kolon sicherzustellen und somit eine effiziente Hemmung dieser Enzyme zu garantieren, wurden zunächst die basalen Aktivitäten von CTSB, CTSL und CTSD in murinem Kolongewebe bestimmt. Hierfür wurden aus jeweils drei gesunden, unbehandelten Balb/c-Mäusen die Kolons präpariert, in PBS überführt und im Gesamtlysat sofort die Cathepsin-Aktivitäten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei untersuchten Cathepsine im murinen Kolon biologisch aktiv waren (Abb. 4.25).

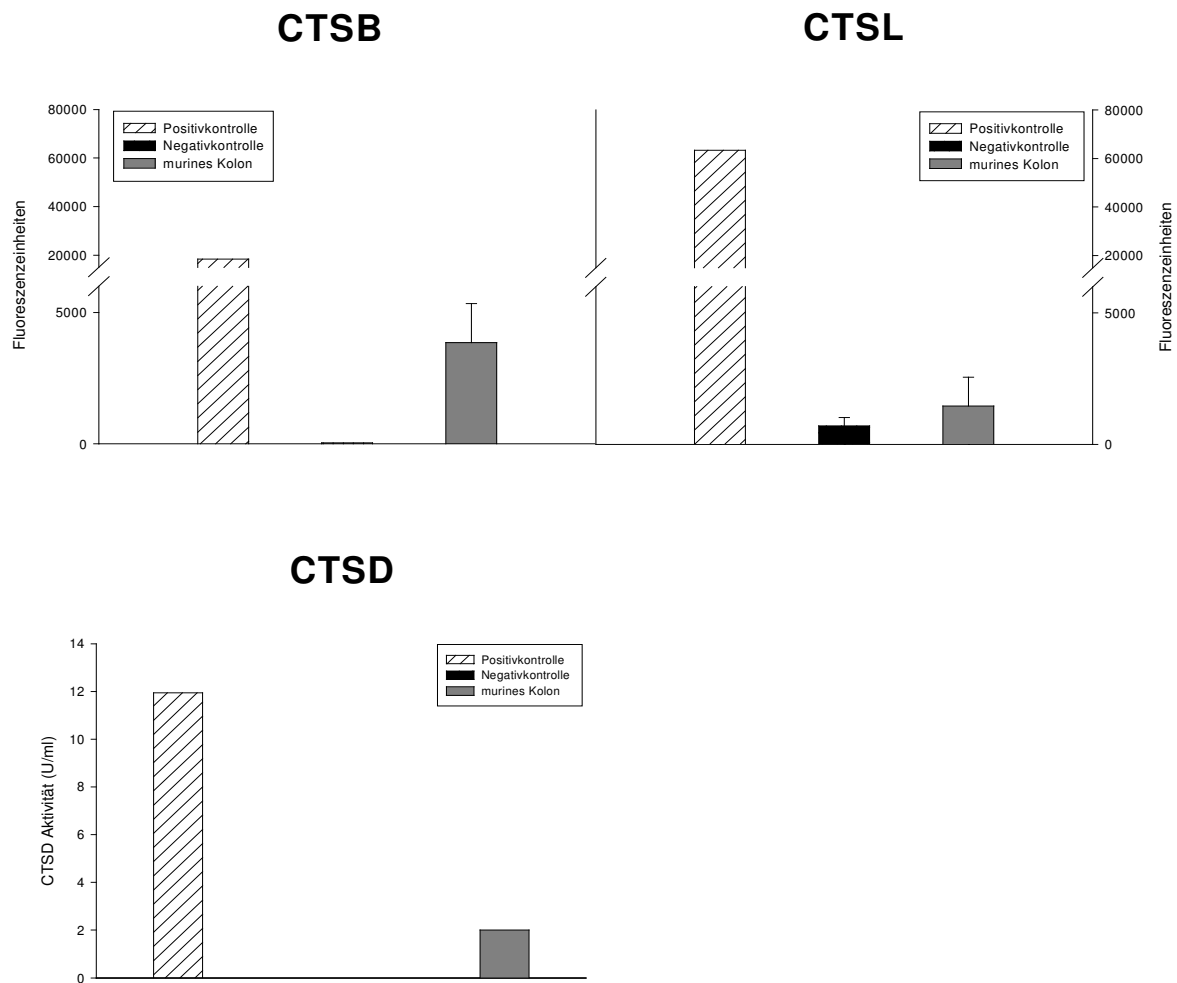


Abb. 4.25: Biologische Aktivitäten von CTSB, CTSL und CTSD im murinen Kolon

Basale biologische Aktivitäten von CTSB, CTSL und CTSD im Kolon gesunder, unbehandelter Balb/c-Mäuse ($n=3$). CTSB, CTSL und CTSD waren im murinen Kolon biologisch aktiv. Die Positiv-/Negativkontrollen waren Komponenten der Aktivitäts-Assays. Die unterschiedlichen Einheiten der angegebenen Aktivitäten für CTSB und CTSL (Fluoreszenzeinheiten) bzw. CTSD (Units/ml) resultieren aus den jeweiligen Messprinzipien der kommerziellen Assays.

4.5.4.2 Die Hemmung von CTSD reduziert Colitis-typische Symptome

Aufgrund der bekannten Induktion der CTSD-Expression bei CED [180] sollte zunächst der Einfluss der CTSD-Hemmung auf die Vitalität der Tiere und das Ausmaß der Entzündung untersucht werden. Als Modell einer induzierten Darmentzündung sollte hierbei die akute *Dextran Sodium Sulfat* (DSS)-Colitis dienen. Die Vorteile dieser chemisch induzierten Modell-Colitis liegen in ihrer Schnelligkeit, Effektivität und Reproduzierbarkeit [202]. Durch orale DSS-Gabe über eine Woche kann eine akute Colitis induziert werden, die sich histologisch durch multiple Erosionen, Ulzerationen, den Verlust von Krypten und Makrophagen- bzw. Lymphozyteninfiltrationen auszeichnet. DSS wirkt hierbei toxisch auf das mukosale Epithel (verstärkte Apoptose von Epithelzellen) und wird von Makrophagen

phagozytiert. Durch den daraus resultierenden epithelialen Barriereverlust kommt es zum Kontakt zwischen luminalen Antigenen und den Lymphozyten der *Lamina Propria*, welche dadurch zusätzlich zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine stimuliert werden.

Als spezifischer und hochselektiver Inhibitor für CTSD wurde Pepstatin A verwendet [203]. Den Tieren, welchen eine akute DSS-Colitis induziert werden sollte, wurde 7 Tage lang 2,5% DSS-haltiges Trinkwasser gegeben. Die Kontrolltiere erhielten normales Trinkwasser ohne Zusätze. Sowohl Tiere mit induzierter Colitis, als auch Tiere ohne Colitis wurden ab Tag 3 für weitere 6 Tage mit dem spezifischen CTSD-Inhibitor Pepstatin A durch intraperitoneale Applikation behandelt. Die Tiere wurden täglich gewogen und der Gewichtsverlauf dokumentiert. Am Tag 10 wurden die Tiere getötet, die Kolons präpariert und für histologische und funktionelle Untersuchungen aufbereitet. Die optimale Inhibitorkonzentration wurde Publikationen entnommen [203] und auf das Mausgewicht berechnet. Mäuse, die mit einer höheren Dosis Pepstatin A (100 mg/kg Körpergewicht) behandelt wurden, wiesen deutliche visuell erkennbare Anreicherungen des Inhibitors im Abdominalraum auf (Daten nicht gezeigt), so dass sich die applizierte Menge von 10 mg/kg Körpergewicht als optimale und effektive Konzentration erwies.

4.5.4.2.1 Symptomatik, Gewichtsverlauf und Kolonlänge

Colitis-typische Symptome wie entzündeter Anus und blutige Diarrhöe traten am stärksten in der unbehandelten Colitis-Gruppe (DSS/PBS) auf, in der alle Mäuse (100%) betroffen waren, während in der mit Pepstatin A-behandelten Gruppe (DSS/Pep) nur 40% der Mäuse diese Symptome in abgeschwächter Form zeigten (Daten nicht gezeigt). Die CTSD-Hemmung resultierte in allen untersuchten Parametern in einer deutlichen Reduktion der induzierten Darmentzündung.

Die Kontrolltiere, denen normales Trinkwasser ohne DSS verabreicht wurde, zeigten keinen signifikanten Gewichtsverlust über die Dauer des Experiments (Abb. 4.26, H₂O/PBS; H₂O/Pep). PBS-behandelte Kontrolltiere mit Colitis (DSS/PBS) verloren 17,1% ihres initialen Gewichts, während sich das Ausgangsgewicht Pepstatin A-behandelter Tiere um nur 9,3% reduzierte (DSS/Pep) (Abb. 4.26, $p < 0,001$).

Im Verlauf der Modell-Colitis kommt es typischerweise zu einer deutlichen Reduktion der Kolonlänge. Die Kolonlängen der PBS-behandelten Colitismäuse (DSS/PBS) waren mit $9,6 \pm 1,1$ cm signifikant niedriger als die der Pepstatin A behandelten Colitismäuse (DSS/Pep), die $11,0 \pm 1,3$ cm lange Kolons aufwiesen (Abb. 4.27, $p < 0,05$). Mäuse ohne Colitis zeigten eine normale Kolonlänge mit durchschnittlich $12,5 \pm 1,3$ cm in der H₂O/Pep Gruppe und $12,7 \pm 0,9$ cm in der H₂O/PBS Gruppe (Abb. 4.27).

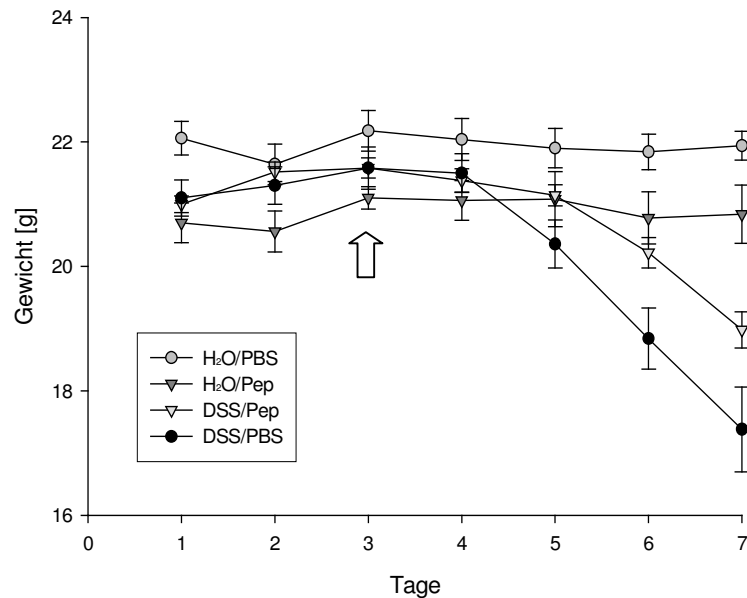


Abb. 4.26: Gewichtsverlauf

Gewichtsverlauf Pepstatin A (Pep)-behandelter Mäuse und PBS-behandelter Kontrollmäuse mit (DSS) und ohne (H₂O) Modell-Colitis. Die Gewichte sind aufgrund unverhältnismäßiger Verschiebungen der Gewichtskurven ab Tag 8 durch den Tod bzw. vorzeitige Tötung von 4 Mäusen nur für die ersten 7 Tage des Experiments angegeben. Der Pfeil zeigt die erste Applikation des CTSD-Inhibitors Pep A. Die Datenpunkte sind als Mittelwerte jeder Gruppe (n=5) $\pm$ standard error of the mean angegeben. Der Gewichtsverlauf der DSS/PBS Gruppe zeigte signifikante Unterschiede sowohl zur DSS/Pep Gruppe (univariate Varianzanalyse, $p < 0,001$) als auch zur H₂O/Pep Gruppe (univariate Varianzanalyse, $p < 0,006$).

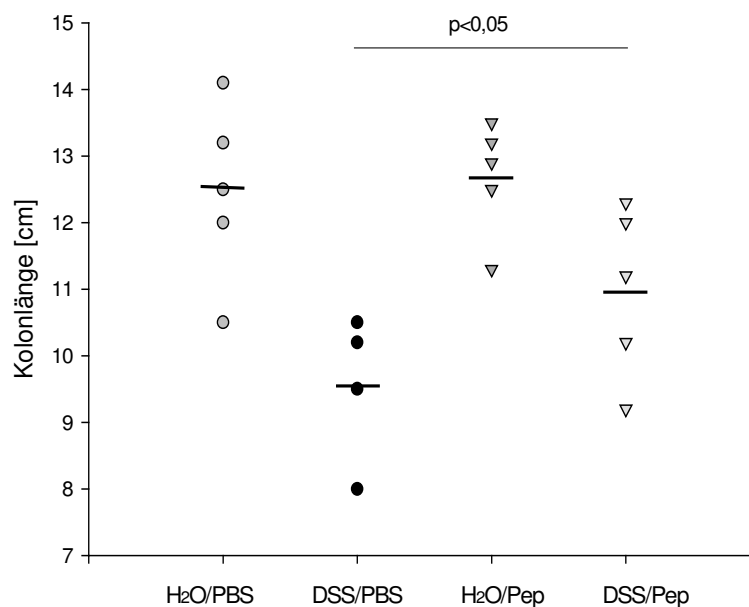


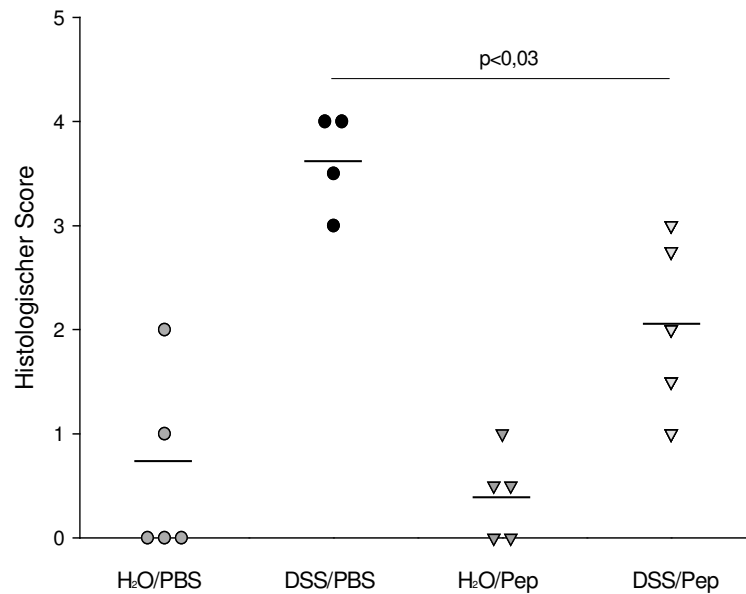
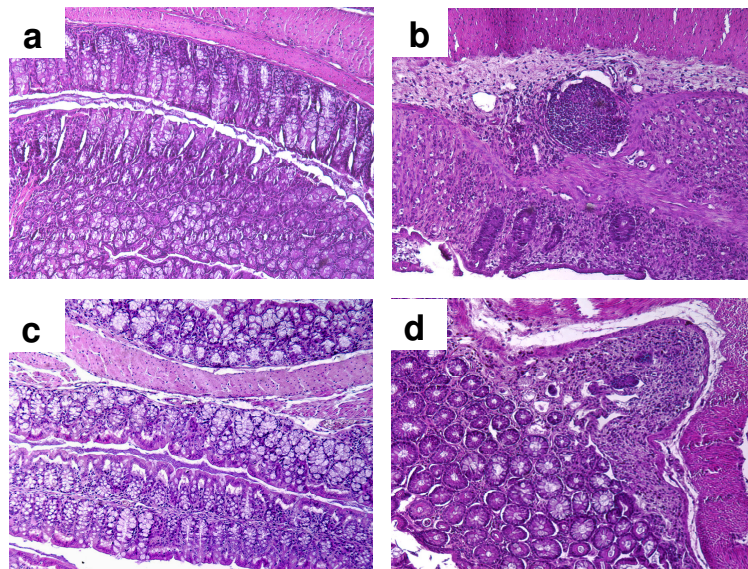
Abb. 4.27: Kolonlängen

Kolonlängen Pepstatin A (Pep)-behandelter Mäuse (Dreiecke) und PBS-behandelter Mäuse (Kreise) mit (DSS) und ohne (H₂O) experimentelle Colitis. Die horizontalen Linien geben die Mittelwerte der einzelnen Gruppen an. Mit Ausnahme der DSS/PBS Gruppe, die aus 4 Tieren bestand, setzten sich alle Gruppen aus 5 Mäusen zusammen.

4.5.4.2.2 Histologie

Als Maß für den Entzündungsgrad wurde ein individueller histologischer Score (HS) verblindet von einer unabhängigen Person ermittelt. Es wurden hierbei sowohl der Epithelschaden, als auch das entzündliche Infiltrat begutachtet. Für beide Parameter wurde an drei unterschiedlichen Stellen HE-gefärbter Gewebeschnitte ein Score von 0 (kein Schaden, kein Infiltrat) bis 4 (starker Schaden, starke Infiltration) vergeben, so dass sich 6 Einzelwerte ergaben, deren Mittelwert den Gesamtscore bildete. Die HS der einzelnen Gruppen sind in Abb. 4.28 A dargestellt.

Der HS von $3,6 \pm 0,5$ in der DSS/PBS Gruppe lag signifikant höher als der HS in der Inhibitor-behandelten Vergleichsgruppe (DSS/Pep) (Abb. 4.28 A, $p < 0,03$). Erwartungsgemäß entwickelten Mäuse ohne DSS-Supplement keine Darmentzündung, was sich in den niedrigen HS widerspiegelte (H_2O/PBS : $0,6 \pm 0,9$; H_2O/Pep : $0,4 \pm 0,4$). In Abbildung 4.28 B sind repräsentative Ausschnitte der Histologie für jede Gruppe gezeigt. In Pepstatin A-behandelten Mäusen mit Colitis waren verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe bemerkenswerte Reduktionen in Mukosadicke, Lymphknotenschwellung und entzündlichem Infiltrat feststellbar (Abb. 4.28 B (b)). Im Gewebe der Mäuse ohne DSS-Behandlung (H_2O/PBS ; H_2O/Pep) wurden keine histologischen Besonderheiten festgestellt (Abb. 4.28 B (a, c)).

A**B****Abb. 4.28: Histologie**

(A) Histologisches Ausmaß der DSS-induzierten Colitis in Mäusen mit und ohne Pepstatin A (Pep)- Behandlung. Die horizontalen Linien zeigen die jeweiligen Mittelwerte pro Gruppe an. Colitismäuse mit Inhibitorbehandlung (DSS/Pep) wiesen ein signifikant geringeres Entzündungsausmaß auf als Colitismäuse ohne Inhibitorbehandlung (DSS/PBS) ($p < 0,03$). Mäuse ohne DSS-Applikation entwickelten erwartungsgemäß keine Entzündung. Die Vergabe des histologischen Scores erfolgte verblindet durch eine unabhängige Person. **(B)** Exemplarische Darstellung eines typischen Ausschnittes der Histologie für jede Gruppe. **(a)** H₂O/PBS, **(b)** DSS/PBS, **(c)** H₂O/Pep, **(d)** DSS/Pep. Vergrößerung 100 x.

4.5.4.2.3 Die Hemmung von CTSD hat keinen Einfluss auf die MPO-Aktivität

Im Rahmen der Immunabwehr gegen eindringende Bakterien spielt die Myeloperoxidase (MPO), ein Enzym, das vor allem in neutrophilen Granulozyten vorkommt, eine wichtige Rolle. MPO katalysiert die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid:



Die Hypochloridionen oxidieren Membranlipide von Bakterien und lysieren auf diese Weise die bakterielle Zellwand. Im Zuge von Infektionen und Entzündungen ist die Aktivität der MPO erhöht, um eine stärkere Abwehr gegen invasive Pathogene zu ermöglichen. Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen erhöhten bakteriellen Translokationsrate im Zusammenhang mit CED (4.2) sollte nun die MPO-Aktivität im murinen Kolon bestimmt werden.

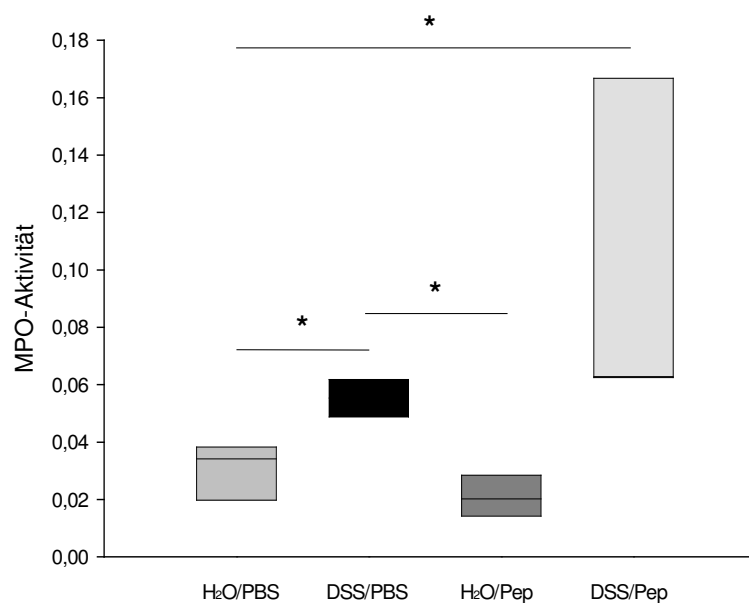


Abb. 4.29: MPO-Aktivität

MPO-Aktivität im Kolon PBS- und Pepstatin A-behandelter Mäuse mit und ohne experimentelle Colitis. Mäuse ohne Colitis (H₂O/PBS, H₂O/Pep) zeigten erwartungsgemäß eine geringe MPO-Aktivität. Colitismäuse sowohl ohne (DSS/PBS), als auch mit Pepstatin A-Behandlung (DSS/Pep) wiesen signifikant gesteigerte MPO-Aktivitäten im Vergleich zur H₂O/PBS Gruppe auf. Die Pepstatin A-Behandlung hatte im DSS-Modell keinen Einfluss auf die Aktivität der MPO. * $p < 0,05$

Mäuse ohne Colitis (H₂O/PBS, H₂O/Pep) zeigten erwartungsgemäß eine geringe MPO-Aktivität, die sich zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht unterschied. Sowohl

unbehandelte Mäuse mit Colitis (DSS/PBS) als auch Pepstatin A-behandelte Colitismäuse (DSS/Pep) wiesen eine signifikante Steigerung der MPO-Aktivität im Vergleich zur H₂O/PBS Gruppe auf ($p < 0,05$). Die Pepstatin A-Behandlung zeigte hierbei keinen Einfluss auf die Aktivität der MPO.

4.5.4.3 Die Blockierung von CTSB/CTSL reduziert Colitis-assoziierte Symptome

Aufbauend auf die *in vivo* Experimente zur Inhibition von CTSD sollte nun der Effekt der simultanen CTSB- und CTSL-Hemmung untersucht werden. Um vergleichbare Aussagen über die Effizienz der Blockierung im Hinblick auf ihre therapeutische Wirkung treffen zu können, wurde analog das akute murine DSS-Colitis-Modell verwendet. Das Applikationsschema entsprach dem der unter 4.5.4.2 beschriebenen CTSD-Hemmung.

Die in dieser Arbeit verwendeten spezifischen Inhibitoren für CTSB und CTSL sowie die jeweilige optimale Applikationsdosis wurde Publikationen entnommen: als spezifischer CTSB-Inhibitor diente L-trans-Epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH Propylamid (CA-074) [155], die Aktivität von CTSL wurde spezifisch durch Z-Phe-Tyr-Aldehyd blockiert [204-206]. Die gleichzeitige Hemmung von CTSB und CTSL wurde durch simultane Injektion beider Inhibitoren erreicht.

Die Tiere wurden täglich gewogen und der Gewichtsverlauf dokumentiert. Am Tag 10 wurden die Tiere getötet, die Kolons präpariert und für histologische und funktionelle Untersuchungen aufbereitet.

Die simultane Applikation der Inhibitoren reduzierte die Schwere der induzierten Colitis in allen untersuchten Parametern.

4.5.4.3.1 Symptomatik, Gewichtsverlauf und Kolonlänge

Colitis-assoziierte Symptome wie entzündeter Anus und blutige Diarrhöe waren in allen Mäusen ohne Inhibitorenbehandlung stark ausgeprägt (100%), während in der behandelten Gruppe 80% der Tiere symptomfrei blieben. Der Gewichtsverlust über die Dauer des Experiments betrug in unbehandelten Colitistieren (DSS/PBS) 25% vs. 6% in der Inhibitoren-behandelten Gruppe (DSS/Inhibitoren) (Abb. 4.31, $p < 0,01$).

Die mit der experimentellen Colitis einhergehende Verkürzung des Kolons spiegelte sich in der unbehandelten Colitis-Gruppe (DSS/PBS) mit einer durchschnittlichen Kolonlänge von $9,1 \pm 1,2$ cm signifikant stärker wider als in der behandelten Gruppe (DSS/Inhibitoren), die eine Kolonlänge von $10,6 \pm 0,8$ cm aufwies (Abb. 4.32, $p < 0,05$).

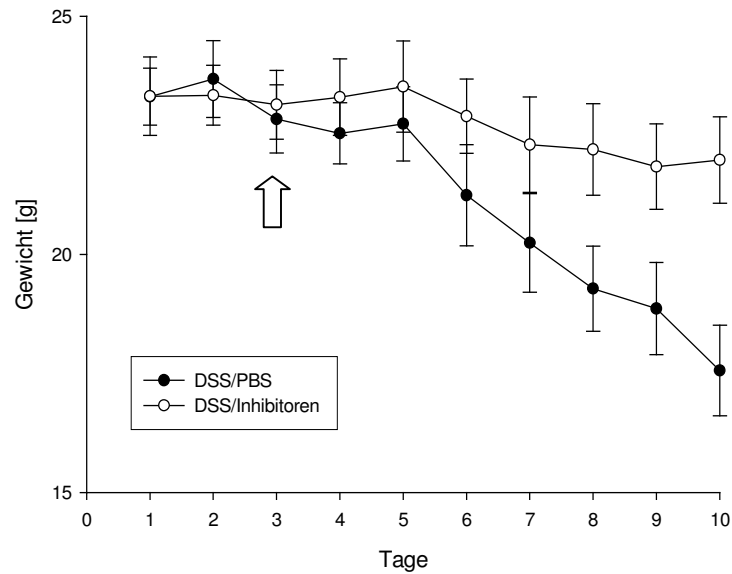


Abb. 4.30: Gewichtsverlauf

Gewichtsverlauf PBS-behandelter und CTSB/CTSL-Inhibitoren-behandelter Mäuse mit experimenteller Colitis. Die simultane CTSB/CTSL-Hemmung erfolgte durch gleichzeitige, tägliche Applikation von CA-074 und Z-Phe-Tyr-Aldehyd über 7 Tage. Der Pfeil indiziert die erste Inhibitorgabe. Inhibitoren-behandelte Mäuse (weiße Kreise) zeigten einen signifikant geringeren Gewichtsverlust als PBS-behandelte Kontrolltiere (schwarze Kreise) (univariate Varianzanalyse, $p < 0,01$). Die einzelnen Datenpunkte zeigen die jeweiligen Mittelwerte pro Gruppe ($n=5$) $\pm$ standard error of the mean.

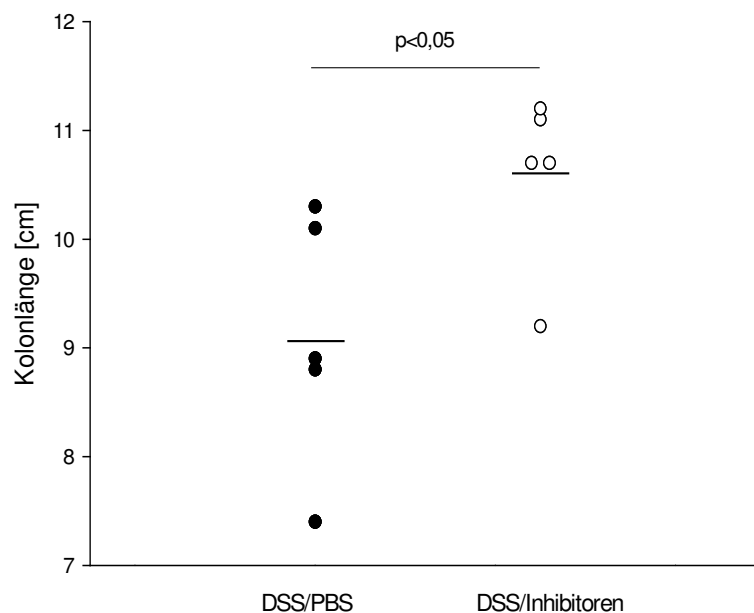


Abb. 4.31: Kolonlängen

Kolonlängen PBS-behandelter und CTSB/CTSL-Inhibitor-behandelter Mäuse. Die horizontale Linie beschreibt den Mittelwert der jeweiligen Gruppe.

4.5.4.3.2 Histologie

Der HS als Maß des Entzündungsgrades betrug in unbehandelten Tieren $3,5 \pm 0,5$ (DSS/PBS) und wurde durch Behandlung mit den Inhibitoren signifikant auf einen HS von $1,8 \pm 1,3$ reduziert (Abb. 4.33 A, $p < 0,03$). Das Kolongewebe unbehandelter Tiere wies eine starke Entzündung mit einer massiv zerstörten Mukosa, Ulzerationen, großen Lymphfollikeln, einer verdickten Submukosa und starker Infiltration auf (Abb. 4.33 B (a)), während in den behandelten Tieren nur leichte Entzündungszeichen festgestellt werden konnten (Abb. 4.33 B (b)).

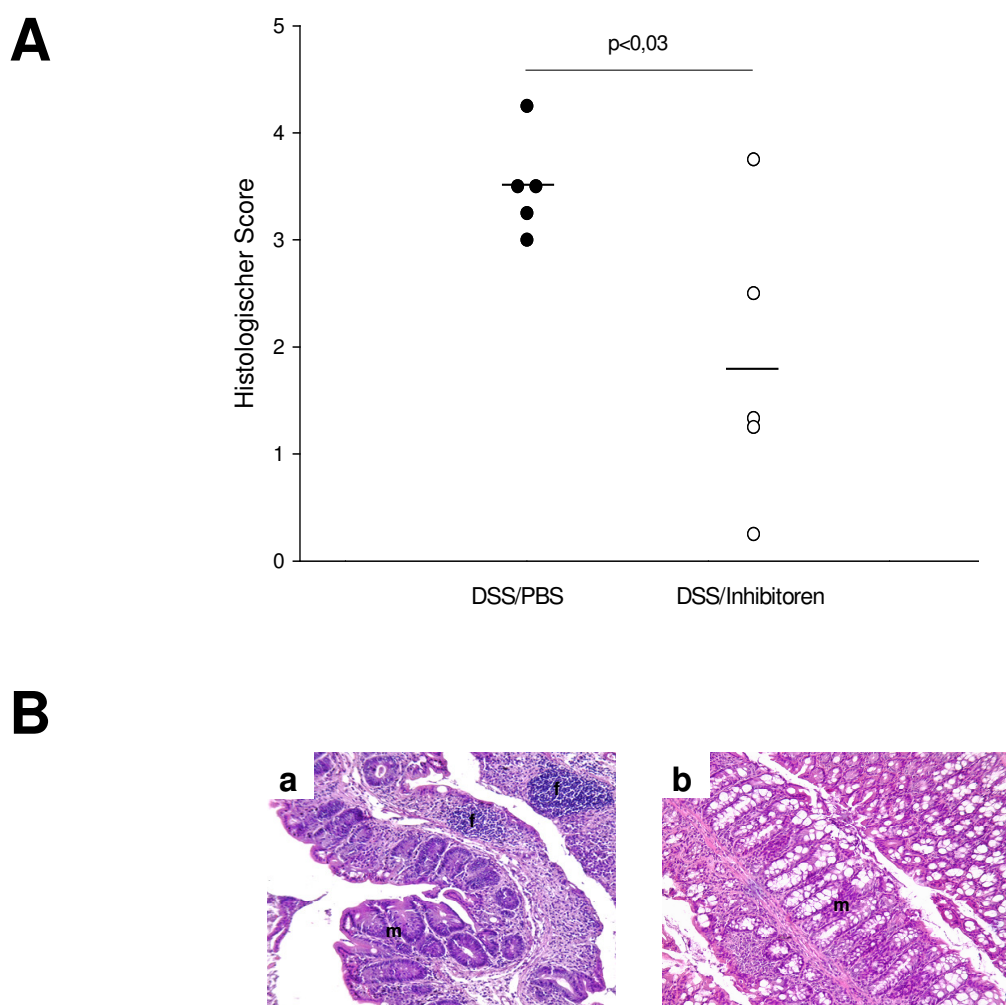


Abb. 4.32: Histologie

(A) Histologischer Score (HS) PBS-behandelter und CTSB/CTSL Inhibitoren-behandelter Mäuse mit experimenteller Colitis. Inhibitoren-behandelte Mäuse (weiße Kreise) zeigten einen signifikant geringeren HS als die Kontrollmäuse (schwarze Kreise), deren hoher HS einer starken Entzündung entsprach ($p < 0,03$). Die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten der jeweiligen Gruppe ($n=5$). **(B)** Exemplarische Ausschnitte murinen Kolongewebes der DSS/PBS Gruppe **(a)** und der DSS/Inhibitoren Gruppe **(b)**. Im Kolon der PBS behandelten Gruppe zeigten sich entsprechend dem HS starke Entzündungszeichen wie Mukosaverdickung, große Lymphfollikel und Influx von Entzündungszellen. Vergrößerung 100 x; m – intestinale Mukosa, f - Lymphfollikel

Aufgrund der Beobachtung, dass ausschließlich eine simultane, homozygote CTSB/CTSL-Defizienz letal ist [171] und aufbauend auf die hier gezeigten Daten zur simultanen CTSB/CTSL-Inhibition konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe durch Einzelblockierungsexperimente gezeigt werden, dass nur das Zusammenwirken beider Inhibitoren einen therapeutischen Effekt auf das Ausmaß der induzierten Darmentzündung im DSS-Colitis-Modell hat. Sowohl die Einzelhemmung von CTSB als auch von CTSL resultierte in keiner Verbesserung der entzündungsassoziierten Parameter und Symptome (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Cathepsine B, L und D eine destruktive Rolle in der intestinalen Entzündung spielen. Durch Blockierung deren Aktivitäten konnte ein therapeutischer Effekt hinsichtlich des Ausmaßes der Darmentzündung im murinen DSS-Colitis-Modell erzielt werden.

Kapitel 5

Diskussion

Ausgangsfragestellung

Die Identifizierung des ersten MC-assoziierten Suszeptibilitätsgens NOD2/CARD15, einem Vertreter der zytosolischen NOD-Proteinfamilie, sowie seine strukturelle und funktionelle Aufklärung im Jahre 2001 lenkten den Fokus der CED-Forschung immer stärker auf die intestinale Mikroflora [30]. Im selben Jahr entstanden erste Hypothesen, dass NOD-Proteine über ihre den TLRs homologen LRR-Domänen bakterielle Komponenten detektieren und NF- κ B induzieren können [116]. Kurz darauf wurde MDP, eine konservierte Struktur des bakteriellen Zellwandbestandteils PDG sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien [207], als Ligand für NOD2/CARD15 identifiziert [99;113]. Um die Invasion von Bakterien und vor allem pathogener Erreger aus dem Lumen in das Darmgewebe zu verhindern, verfügt der gesunde Organismus über zahlreiche lokale Schutzmechanismen (Mucusproduktion, Synthese antimikrobieller Peptide, intraluminale IgA-Sekretion, Darmmotilität), die die Adhärenz von Bakterien verhindern sollen [208;209]. Im Krankheitsbild MC sind diese protektiven Faktoren insoweit verändert, dass es zu einer Fehlregulation der intestinalen Barriere und Invasion von Bakterien kommt. Welche Routen und Mechanismen Bakterien nutzen, um die hochselektive Darmbarriere zu überwinden, ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob (i) die transepitheliale Passage von Bakterien mit dem NOD2/CARD15-Genotyp der Patienten assoziiert ist, (ii) veränderte Zell-Zell-Kontakte einen potentiellen Weg der Barriereüberwindung darstellen und (iii) welche Konsequenz die intrazelluläre bakterielle Stimulierung für die Aktivierung NOD2/CARD15- und Nalp3-vermittelter proinflammatorischer Signalpfade sowie für gewebedestruktive Prozesse (am Beispiel der proteolytischen Cathepsinfamilie und Synthese reaktiver Sauerstoffmetabolite) im Krankheitsbild MC hat.

5.1 Isolierung humaner intestinaler Makrophagen

Die Charakterisierung humaner IMAC und insbesondere die Untersuchung verschiedener Gene erforderte primär ein hochreines Zellisolat. Durch die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Anreicherung humaner IMAC über ihren Oberflächenmarker CD33 [86] wurde mit einer Reinheit der Zellpopulation von 95% die Spezifität des Isolates für nachfolgende Versuche sichergestellt.

5.2 Bakterielle Translokation und Wege der Überwindung der epithelialen Barriere im Krankheitsbild Morbus Crohn

Zu Beginn dieser Arbeit konzentrierten sich zahlreiche Studien und Publikationen auf die Untersuchung der fäkalen Mikroflora. Dadurch konnten zwar Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora bei MC-Patienten aufgedeckt werden [3;74;210], jedoch keine Aussagen über die Adhärenz oder potentielle Translokation luminaler Bakterien getroffen werden. Methoden, die Mukosa-assoziierte Bakterien direkt detektieren können, waren und sind aufgrund unzureichender Spezifität und fehlender Quantifizierungsmöglichkeiten limitiert und experimentell schwierig [211;212]. Ein überzeugender direkter Nachweis translozierter Bakterien ist bisher nur Swidsinski et al. gelungen, die im Darm von MC-Patienten Bakterien innerhalb der Epithelzellen nachwiesen [213].

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels FISH gezeigt werden, dass der intestinale Mukus im Darm von MC-Patienten eine starke bakterielle Besiedelung aufweist, während im Mukus von Kontrollpatienten keine adhärennten Bakterien detektiert wurden. Diese Daten werden durch Publikationen anderer Arbeitsgruppen gestützt [214;215]. Die erste physikalische Schutzschicht gegenüber dem Darmlumen stellt der den gesamten Gastrointestinaltrakt auskleidende Mukus, bestehend aus Glykoproteinen und Muzinen, dar. Die Muzinschicht im Darm von MC-Patienten weist eine Vielzahl biochemischer Veränderungen auf, wodurch die viskoelastischen Eigenschaften des Mukus sowie Interaktionen mit Mikroorganismen, Elektrolyten, Defensinen und Nahrungsmittelbestandteilen beeinflusst werden. Dies resultiert in einer reduzierten Funktionalität der supramukosalen Barriere [216]. Einige Vertreter der luminalen Flora sezernieren Enzyme, welche Muzin-Oligosaccharide komplett degradieren können [216]. Durch die biochemischen, funktionellen und metabolischen Veränderungen der mukosalen

Schutzschicht bei MC wird so der Kontakt des Epithels mit der veränderten (vermehrt aggressiven und reduziert protektiven [210]) bakteriellen Mikroflora verstärkt.

Da mittels FISH intraepithelial/-mukosal keine Bakterien lokalisiert werden konnten, wurden bakterielle Produkte im intestinalen Gewebe durch den immunhistochemischen Nachweis bakteriellen Endotoxins detektiert. Die Akkumulation bakteriellen Endotoxins im intestinalen Gewebe von MC-Patienten wies NOD2/CARD15 Genotyp-spezifische Unterschiede auf – Patienten mit heterozygot vorliegendem SNP8 bzw. SNP13 im NOD2/CARD15 Gen zeigten stärkere Endotoxin-Anreicherungen als Träger des WT-Gens bzw. der SNP12 Variante.

NOD2/CARD15, als Sensor des bakteriellen Zellwandbestandteils MDP, vermittelt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Wie in zahlreichen *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen gezeigt werden konnte, führen MC-assoziierte Mutationen zum Verlust der MDP-Erkennung [99;193;194]. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation des NOD2/CARD15 Proteins sowie der Heterozygotie aller Mutationen der in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten besteht vermutlich keine direkte Assoziation zwischen dem NOD2/CARD15 Genotyp der Patienten und der Stärke der bakteriellen Translokation. Jedoch könnte eine hohe intrazelluläre Konzentration bakterieller Stimuli sekundär zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion führen. Die Expression des in epithelialen Entzündungsreaktionen essentiellen Zytokins TNF wird in IEZ bei pathologischen Prozessen, so auch bei MC, induziert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass intestinale Epithelzelllinien (HT-29, SW620, SW948) nach Stimulation durch TNF eine gesteigerte NOD2/CARD15-Proteinsynthese aufweisen [217]. Wie auch im Verlauf dieser Arbeit nachgewiesen wurde, können durch alleinige Überexpression von NOD2/CARD15 HEK293T-Zellen für bakterielle Stimuli sensitiviert werden, was in einer gesteigerten Produktion und Sekretion des Chemokins IL-8, resultiert (4.3.2; [29;110;120]).

Eine gesteigerte Translokationsrate könnte somit über die Induktion der NOD2/CARD15-Proteinsynthese zu einer verstärkten Immunreaktion auf nicht pathogene und pathogene Bakterien führen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass im Darm von MC-Patienten Bakterien die epitheliale Barriere überwinden, stellte sich die Frage, welche potentiellen Translokationswege hierfür benutzt werden. Die epitheliale parazelluläre Permeabilität sowie die Barrierefunktion werden durch Zell-Zell-Kontakt-vermittelnde TJs und AJs reguliert [218]. Bei CED wurde eine durch proinflammatorische Zytokine verursachte starke Durchlässigkeitszunahme der TJs festgestellt, wobei bis heute nicht bekannt ist, welche(s) Protein(e) für die Bildung der abdichtenden Barriere bzw. für die Entstehung von Lecks in erster Linie verantwortlich ist/sind [219].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Kontakte im Darm von MC-Patienten morphologisch unverändert sind, es jedoch zu deutlichen Mengenunterschieden der TJ/AJ-assoziierten Proteine kommt. Die TJ-Proteine Claudin-1, -2, Occludin und ZO-1 waren im entzündungsassoziierten Gewebe stärker nachweisbar als im Kontrollgewebe; Claudin-4 war unverändert und die die Zell-Zell-Adhäsion vermittelnden AJ-Proteine E-Cadherin und β -Catenin [72;73] waren im entzündungsassoziierten Gewebe deutlich reduziert.

Claudin-1 und Claudin-2 erfüllen innerhalb der TJ abdichtende Funktionen – eine essentiell wichtige Voraussetzung für die epitheliale Barrierefunktion. Daher waren beide Proteine hauptsächlich im Epithel nachweisbar. Eine Veränderung im Expressions- und Synthesemuster schädigt daher primär die intestinale Barriere. Eine verstärkte Expression von Claudin-1 wurde u.a. bei kolorektalen Tumoren festgestellt [220]. Dies könnte den deutlichen Nachweis von Claudin-1 in den Kontrollproben erklären, da diese Proben im Rahmen von Operationen kolorektaler Tumore aus mehr oder weniger tumornahem Gewebe gewonnen wurden. Die detektierte Menge an Claudin-1 in den entzündungsassoziierten Proben von MC-Patienten war sogar noch höher als in tumornahem Gewebe. Die gezeigte deutliche Induktion von Claudin-2, dessen vermehrte Expression in der Bildung durchlässiger Poren resultiert [63;221], führt somit zu einer reduzierten Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte. Durch die Fähigkeit beider Claudine zur Rekrutierung und Aktivierung des Vorläuferproteins der Matrixmetalloproteinase (MMP)-2 [222;223] sowie die Aktivierung von pro-MMP-9 durch eine verstärkte Claudin-1 Expression [220] könnten die bei MC erhöhten Mengen zudem zur verstärkten Proteolyse extrazellulärer Matrixproteine führen, wodurch es zu Gewebeumbau und –schädigung kommen kann. Claudin-4 ist für die transzelluläre Na^+ -Permeabilität verantwortlich und besitzt keine abdichtende Funktion, ein Mengenunterschied im Gewebe hätte also keinen Einfluss auf die Barriereerhaltung [64]. Occludin ist in allen Epithelien lokalisiert, seine Funktion ist bisher nicht geklärt – ein Fehlen bereits in der Embryonalentwicklung ist für die Ausbildung der TJ-Barriere nicht von Bedeutung, so dass Occludin selbst vermutlich keine Rolle bei der Erhaltung der Barriere spielt [58;224]. Es gibt jedoch zahlreiche Befunde, die darauf hinweisen, dass Occludin eine wichtige Rolle innerhalb der TJ erfüllt. Die Überexpression mutierter Occludinformen führt zu einer reduzierten Barrierefunktion der TJs [57;59;60]. Ferner führt die Zugabe von synthetischen Peptiden, welche in ihrer Aminosäuresequenz den extrazellulären Schleifen von Occludin entsprechen, in epithelialen Zellen zum Verschwinden der TJ und zur Hemmung der Zelladhäsion [225-227]. Der in dieser Arbeit gezeigte verstärkte Nachweis von Occludin in intestinalem Gewebe von MC-Patienten könnte demzufolge ebenfalls an einer reduzierten Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte beteiligt sein. ZO-1 fungiert als Verbindung zwischen den Actin-Filamenten und den eigentlichen TJ-Proteinen [228]. Durch Promotorregulationen

beeinflusst ZO-1 die parazelluläre Permeabilität – ZO-1 und ein interagierender Transkriptionsfaktor (ZONAB) regulieren z.B. die Expression von ErbB2, einem wichtigen Zellzyklusregulator für die epitheliale Differenzierung und Morphogenese [71]. Ein verstärkter ZO-1 Gehalt im Gewebe könnte die „Kommunikation“ zwischen Nukleus und TJ beeinflussen, so dass es zu Veränderungen in der epithelialen Differenzierung und Zellteilung kommt.

Ein reduziertes Vorliegen der die Zell-Zell-Adhäsion vermittelnden AJ-Proteine β -Catenin und E-Cadherin fördert zusätzlich die paraepitheliale Passage potentieller Noxen.

Diese Daten zeigen, dass Veränderungen in der Proteinzusammensetzung der Zell-Zell-Kontaktpunkte im Krankheitsbild MC, die zu gestörten Barrierefunktion und zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten führen, einen optimalen Weg für luminale Bakterien darstellen, die paraepitheliale Barriere zu passieren.

5.3 Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation des intrazellulären Sensorproteins NOD2/CARD15 und die intestinale Entzündung im Krankheitsbild Morbus Crohn

5.3.1 MDP induziert die Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors sowie des NF- κ B Signalweges *in vitro*

Das intestinale Epithel als primäre Barriere gegen luminale Keime vermittelt einerseits Toleranz gegenüber der kommensalen Flora [229], andererseits müssen IEZ aber potentiell gefährliche Pathogene erkennen, so dass geeignete Immunreaktionen in der subepithelial gelegenen *Lamina Propria* eingeleitet werden können [229]. Die zugrunde liegenden Mechanismen der IEZ-Toleranz versus Intoleranz gegen luminale bakterielle Liganden werden wahrscheinlich durch TLRs und andere PRRs des angeborenen Immunsystems, wie Vertretern der intrazellulären NOD-Proteine vermittelt [229]. NOD2/CARD15 wird hauptsächlich in Phagozyten und Epithelzellen exprimiert [194] und induziert die Aktivierung von NF- κ B [132]. Eine Vielzahl der Gene, die in IEZ nach bakterieller Invasion aktiviert werden, sind NF- κ B-Zielgene (z.B. IL-8) [120;122]. Daher galt es, mit Fokus auf den NOD2/CARD15 Genotyp der Patienten zu klären, welchen Einfluss ein verstärkter intrazellulärer bakterieller Stimulus auf die Aktivierung des proinflammatorischen NF- κ B Signalweges hat.

Es konnte gezeigt werden, dass der bakterielle Zellwandbestandteil MDP *in vitro* dosisabhängig den NOD2/CARD15 Promotor aktiviert. Intrazelluläre bakterielle Stimulierung resultiert folglich in einer gesteigerten NOD2/CARD15-Expression. In *in vitro* Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Synthese und Sekretion proinflammatorischer Zytokine in IEZ als Antwort auf Stimulierung mit TNF bzw. LPS erhöht ist [230] und humane Kolonepithelzelllinien (T84, HT-29, Caco-2) nach Infektion mit pathogenen Bakterien verstärkt proinflammatorische Zytokine exprimieren [231]. Proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF, IFN- γ) können die niedrige basale Expression von NOD2/CARD15 in Epithelzellen und die Aktivierung von NF- κ B steigern [110]. Durch die Bindung von NF- κ B an adäquate Bindestellen im NOD2/CARD15 Promotor kann sich die NOD2/CARD15 Expression somit selbst hochregulieren (= autokrine Signalverstärkung). NF- κ B fungiert demzufolge als zentraler Regulator in der Aktivierung der epithelialen zellulären Immunreaktion nach bakterieller Infektion [120;232;233] und könnte mit einer starken Expression von NOD2/CARD15 in IEZ, welche durch MDP induziert wird, assoziiert sein.

Das NOD2/CARD15-Gen ist in der kaukasischen Population bei etwa 50% der MC-Patienten und 20% gesunder Menschen mutiert [234]. Welche Konsequenz diese Mutationen für die intestinale Entzündungsreaktion haben, wurde und wird kontrovers diskutiert. Es galt daher zu untersuchen, ob die MC-assoziierte(n) Mutation(en) in einer gesteigerten oder reduzierten NF- κ B-Aktivierung resultieren. Zahlreiche *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen bestätigten, dass MC-assoziierte Mutationen zum Verlust der MDP-Erkennung führen [99;193;194]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass NOD2/CARD15 in Paneth-Zellen (einer Zellpopulation in intestinalen Krypten, die große Mengen antimikrobieller Peptide synthetisiert) exprimiert wird und *in vitro* die Sekretion von humanem β -Defensin-2 verstärkt. Zusammenfassend unterstützen diese Daten das „*loss of function*“-Szenario, welches einen Defekt der NOD2/CARD15 Varianten in der Aktivierung von Abwehrmechanismen vermutet, der in einer erhöhten Bakterienlast und folglich mukosalen Entzündung resultiert [235]. Unterstützt wird die „*loss of function*“ Hypothese durch Studien, die zeigten, dass NOD2/CARD15 WT die TLR2-vermittelte Entzündungsantwort limitiert, während den mutierten NOD2/CARD15 Varianten diese Fähigkeit fehlt, was in einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung und IL-12 Expression resultiert [235]. Trotzdem gibt es bis heute keinen Beweis, dass die Antwort auf MDP den MC-Phänotyp bestimmt. Die „*loss-of-function*“ Theorie wurde aber gleichzeitig durch eine Studie widerlegt in denen Mäuse, die die SNP13 homologe Mutation trugen, eine übermäßige IL-1 β -Produktion zeigten und somit eine „*gain-of-function*“ nachwiesen [135].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von NOD2/CARD15, sowohl des WT-Gens als auch der mutierten SNP13-Variante (trunkiertes

Protein), bereits ohne bakteriellen Stimulus *in vitro* zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges führt. Durch MDP-Stimulierung wurde in Zellen, die das NOD2/CARD15 WT-Gen exprimierten, eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion beobachtet, während die Expression des trunkierten Proteins sowie des Kontrollvektors zum Verlust der Induzierbarkeit führten. Diese Daten korrelieren mit Hugot *et al.*, die 2001 in einer ähnlichen Studie zeigten, dass die Überexpression des NOD2/CARD15 WT-Gens sowie des trunkierten Proteins nach Stimulierung mit LPS zur IL-8 Sekretion führte [29]. Die NOD2/CARD15-assoziierte Mutation SNP13 ist, wie auch SNP8 und SNP12, in der LRR-Domäne des Gens lokalisiert und betrifft somit die Region, welche für die Erkennung bakterieller Komponenten essentiell ist. Die in dieser Arbeit gezeigte fehlende Fähigkeit, durch bakterielle Stimulierung NF- κ B induzieren zu können, verstärkt die „*loss of function*“ Theorie NOD2/CARD15-assoziiierter Mutation(en).

Die in diesem Teil der Arbeit gezeigten Daten zeigen starke Parallelen zur Regulation extrazellulärer PAMP-Rezeptoren, den TLRs, in IEZ [120]. Wie für TLR4 beschrieben [236] weist auch NOD2/CARD15 in unstimulierten IEZ nur eine geringe Basalexpression auf, welche durch proinflammatorische Zytokine gesteigert werden kann [237]. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden IEZ somit für bakterielle Produkte sensitiviert und geeignete Immunreaktionen induziert. Analog exprimieren IEZ kein MD-2, ein für die TLR4-vermittelte LPS-Erkennung essentielles Ko-Rezeptormolekül [120]. Außerdem zeigen sie keine Reaktion auf reines LPS. Exprimierten IEZ aber transient MD-2 und TLR4, konnte die Fähigkeit, LPS zu erkennen, wiederhergestellt werden [120;238]. Außerdem wurde eine positive Regulation der Expression von MD-2 über IFN- γ und von TLR4 zusätzlich über TNF in IEZ beschrieben [120;237]. Auch die Expression von NOD2/CARD15 in IEZ kann durch TNF und IFN- γ gesteigert werden [120]. Die negative Regulation der Expression bakterieller Sensorproteine könnte einen Mechanismus der IEZ darstellen, der sie vor einer fehlregulierten Immunabwehr gegen kommensale Bakterien schützt.

Aufgrund der gezeigten Induktion von NOD2/CARD15 (WT) durch bakterielle Stimulierung könnte dieses Sensorprotein zusätzlich zu seiner Aktivatorfunktion auch Regulatorfunktionen erfüllen.

5.3.2 Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten kommt es zur NOD2/CARD15 Genotyp-spezifischen Aktivierung von NF- κ B

Nachdem *in vitro* gezeigt wurde, dass MDP NOD2/CARD15 Genotyp-spezifisch die Aktivierung von NF- κ B induziert, sollte geklärt werden, ob diese Daten in intestinalem Gewebe reproduziert werden können. Im Darmgewebe von MC-Patienten konnte NF- κ B

Aktivität nachgewiesen werden. Bei Vorliegen von Mutationen ist diese verändert. Die ebenfalls detektierte (obgleich vs. MC geringere) NF- κ B Aktivität in den Kontrollproben, welche im Rahmen von Operationen kolorektaler Tumorerkrankungen gewonnen wurden, resultiert aus der mehr oder weniger tumornahen Herkunft des Probengewebes, welches womöglich ebenfalls eine geringe Entzündung aufwies. Heterozygote Träger der NOD2/CARD15 Varianten SNP8 bzw. SNP12 zeigten eine im Vergleich zu Patienten mit NOD2/CARD15 WT bzw. heterozygotem SNP13 höhere NF- κ B Aktivität. Diese Daten stimmen mit den *in vitro* Untersuchungen überein.

NF- κ B spielt aber nicht nur eine Rolle in Entzündungsreaktionen, sondern fungiert auch als wichtiger Regulator der epithelialen Integrität und intestinalen Immunhomöostase [127]. *In vivo* Studien zeigten, dass die IEZ-spezifische Hemmung von NF- κ B durch die Defizienz von NEMO spontan eine schwere, chronische, intestinale Entzündung verursacht, welche Apoptose von Kolonepithelzellen, eine verminderte Expression antimikrobieller Peptide und Translokation von Bakterien in die Mukosa bedingt [127]. Die in den Kontrollproben detektierte geringe NF- κ B Aktivität stellt somit eine immunologische Notwendigkeit des intestinalen Gewebes dar, die Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Daten der MC-assoziierten Proben würden aber den postulierten Funktionsverlust der Ligandenerkennung durch NOD2/CARD15 Mutationen negieren. Wie kann es beispielsweise im Darm von Patienten mit NOD2/CARD15 SNP12, die nur eine geringe Anreicherung von Endotoxin im intestinalen Gewebe zeigten, zu einer starken NF- κ B Aktivierung kommen und konträr im Gewebe von Patienten, die nur eine geringfügige NF- κ B Aktivität aufweisen, der stärkste Endotoxingehalt nachgewiesen werden? Diese Differenzen könnten aus dem heterozygoten Vorliegen der Mutationen sowie der hohen Variabilität der Daten aufgrund der geringen Patientenzahlen resultieren. Die wahrscheinlichste Erklärung ist aber die potentielle Existenz eines NOD2/CARD15-unabhängigen Signalweges, welcher diese starke Entzündungsreaktion induziert. Die meisten Autoren vermuten einen primären Defekt in der angeborenen Immunität, welcher die Proliferation von Bakterien induziert und sekundär eine durch das adaptive Immunsystem gesteuerte, NOD2/CARD15-unabhängige Entzündungsreaktion über Effektor-T-Zellen im Wirtsgewebe induziert [194]. Andere Studien zeigten, dass NOD2/CARD15 TLR2-vermittelte proinflammatorische Effekte limitiert [134] bzw. MC von einer reduzierten Produktion antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- β) resultiert [239]. Durch defekte MDP-Erkennung ist die Negativregulation des TLR2 Signalpfades aufgehoben und es kommt zur NOD2/CARD15 unabhängigen Aktivierung von NF- κ B.

Auch die Sekretion von Chemokinen und Defensinen durch IEZ ist durch fehlerhafte NOD2/CARD15-Expression reduziert. In der vorliegenden Arbeit zeigten HEK293T-Zellen, die die SNP13-Variante exprimierten, aufgrund fehlender MDP-Erkennung nach Stimulierung

eine deutlich verminderte Sekretion des Chemokins IL-8. Dadurch könnte es zu einer defizienten Aktivierung angeborener Immunreaktionen kommen, wodurch translozierte Bakterien verstärkt im Darmgewebe proliferieren könnten und es letztendlich zu einer dauerhaften Stimulierung durch bakterielle Antigene kommen könnte [80;110;120]. Im intestinalen Epithel von MC-Patienten konnte neben einer gesteigerten NOD2/CARD15-Expression [110] auch eine verstärkte TLR4-Expression nachgewiesen werden [236]. Somit könnte sowohl ein verändertes TLR-Signaling, als auch die gesteigerte Synthese des intrazellulären Sensorproteins NOD2/CARD15 an der Pathogenese des MC beteiligt sein.

In vivo Studien bestätigten, dass eine fehlende Interaktion zwischen MDP und mutiertem NOD2/CARD15 zum Verlust der kontrollierten Antwort auf bakterielle Infektionen führt: NOD2/CARD15-defizienten Mäusen fehlt die NOD2/CARD15-vermittelte Immunabwehr durch die Erkennung bakteriellen MDPs des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes*, weshalb diese Mäuse eine gesteigerte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen zeigten [120;240]. Zusätzlich wiesen diese Mäuse eine reduzierte Expression antimikrobieller Peptide (Cryptdine) auf [120].

Trotz vieler z.T. kontroverser Studien und Hypothesen scheint NOD2/CARD15 eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr des Darms gegen bakterielle Infektionen zu spielen und Mutationen eine Prädisposition für MC durch eine defekte Regulation immunologischer Reaktionen auf kommensale und/oder pathogene Bakterien zu fördern [120].

Die gesteigerte NADPH-Oxidase Aktivität, die in dieser Arbeit in humanen IMAC aus der Mukosa von Patienten mit MC gefunden wurde, stimmt mit dem Befund überein, dass in intestinalem Gewebe von MC-Patienten vs. Kontrollpatienten deutlich mehr aktiviertes NF- κ B nachgewiesen wurde. Interessanterweise zeigten MC-Patienten, die Träger der NOD2/CARD15 SNP8 Variante waren, sowohl die höchste NADPH-Oxidase Aktivität als auch die höchste NF- κ B Aktivität. Die NOD2/CARD15 Genotyp-spezifische Aktivierung von NF- κ B scheint somit u.a. direkt durch die Menge an synthetisierten ROS induziert und reguliert zu sein. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die NADPH-Oxidase, ein Leitenzym des oxidativen Burst, als differentiell exprimiertes Gen bei MC identifiziert [91]. Die membranassoziierte NADPH-Oxidase produziert Superoxide und andere reaktive Sauerstoffverbindungen. Diese Intermediate sind verantwortlich für mikrobizide und entzündliche Aktivitäten von Phagozyten [187;198]. Die Bildung toxischer Sauerstoffderivate durch Phagozyten kann in vielen Fällen zur Gewebeerstörung führen. Dies kann die Ursache für Infektionen, Arthritis und andere chronische Entzündungen sein [241], sowie zu Mutationen und Karzinogenese beitragen [242;243]. Der Enzymkomplex, welcher für die Bildung von Superoxiden verantwortlich ist, formt ein kleines transmembranäres Elektronentransportsystem. Dieses System bewirkt die Oxidation von NADPH auf der

zytoplasmatischen Seite und die Bildung von Superoxiden auf der Membranaußenseite. Die NADPH-Oxidase ist in ruhenden Zellen inaktiv und kann durch Stimulierung, z.B. mit PMA, aktiviert werden. Die intestinale Mukosa besitzt eine relativ geringe Menge antioxidativ wirkender Schutzenzyme [244]. Während der intestinalen Entzündung ist der Darm aber durch die Produktion von ROS einem starken oxidativen Stress ausgesetzt. In Studien konnte gezeigt werden, dass Antioxidantien die Darmentzündung bei CED reduzieren können und eine antioxidantienreiche Ernährung einen therapeutischen Nutzen hat [245;246]. Auch im Tiermodell konnte die Wirkung von ROS durch Antioxidantien gesenkt werden [247;248]. Es wurde gezeigt, dass Superoxidradikale auch zelluläre Signalwege beeinflussen können. Dabei können auch Transkriptionsfaktoren wie AP-2, zelluläre Signalkaskaden und das NF- κ B Signalsystem aktiviert werden [249]. NF- κ B scheint demnach ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor zu sein, der durch den Einfluss von Oxidantien aktiviert wird. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass Oxidantien wie H₂O₂ oder Superoxidradikale auch das Zytoskelett zerstören und die intestinale Permeabilität erhöhen [250;251]. Parallel konnte auch im Pflanzenreich gezeigt werden, dass die Synthese mikrobizider ROS eine frühe Antwort auf Infektionen mit Pathogenen darstellt und diese durch LPS induziert wird [252;253]. Bakterielle Translokation kann somit eine unphysiologische ROS-Produktion induzieren, wodurch final nicht nur das Bakterium selbst, sondern auch eigene zelluläre Strukturen geschädigt werden. Sekundär führt die übermäßige ROS-Synthese über die Erhöhung der intestinalen Permeabilität zu einer Verstärkung der bakteriellen Translokation.

Die in diesem Teil der Arbeit gezeigten Daten unterstützen die Hypothese, dass ROS während aktiver Entzündungsphasen für zweierlei verantwortlich sein können: die direkt davon abhängige Verletzung der intestinalen Mukosa sowie das Auslösen von zellulären Signalkaskaden mit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-2 und NF- κ B.

5.4 Einfluss bakterieller Translokation auf die Regulation von Nalp3 und die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms

Die Erkennung hoch konservierter mikrobieller Strukturen, den sog. PAMPs, durch PRRs spielt in der Initiierung potenter Immunantworten gegen Pathogene eine wichtige Rolle. Neben membranassoziierten Rezeptoren (TLRs, C-Typ Lektin-Rezeptoren, Scavenger Rezeptoren) und extrazellulären Rezeptoren (Komplement, Pentraxine, Kollektine) verfügt die Zelle auch über zytoplasmatische Sensoren für mikrobielle Bestandteile [254]. Während RNA-bindende Proteine wie die *double-stranded RNA-activated protein kinase* (PKR), *retinoic acid-inducible protein 1* (RIG-1) und *melanoma differentiation-associated gene 5*

(MDA5) der Erkennung viraler Infektionen dienen, vermitteln die NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLRs), zu denen auch NOD2/CARD15 und die Nalp-Proteine gehören, antibakterielle Abwehrreaktionen [254]. Obwohl in zahlreichen Studien die Funktion der Nalp-Proteine mittels biochemischer und genetischer Analysen untersucht wurden, fehlen bemerkenswerterweise bis heute Daten zur zelltyp- und gewebespezifischen Expression dieser Proteine [255]. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen bakteriellen Translokation und NOD2/CARD15-Genotyp-spezifischen Entzündungsantwort bei MC sollte das Verhalten eines weiteren intrazellulären Sensors bakterieller Produkte – Nalp3 – untersucht werden.

Im Hinblick auf die bekannte Expressionsregulation des MDP-Sensorproteins NOD2/CARD15 durch proinflammatorische Zytokine [110] sowie Induktion durch NF- κ B [111] wurde zunächst die Nalp3-Menge im intestinalen Gewebe von MC-Patienten vs. Kontrollpatienten verglichen. Im intestinalen Gewebe von MC-Patienten wurden deutliche Mengen Nalp3 nachgewiesen, während das Kontrollgewebe nahezu kein Nalp3 enthielt. Die positive Färbung konzentrierte sich dabei auf kryptennahe und epitheliale Bereiche. Daher galt es als nächstes, den Nalp3-produzierenden Zelltyp zu identifizieren. Aufgrund der Verteilung der Nalp3-positiven Zellen im Gewebe wurde vermutet, dass es sich um IEZ und/oder IMAC handeln könnte. Immunhistochemische Doppelfärbungen bestätigten diese Vermutung, analog zeigten sich deutliche Unterschiede im entzündungsassoziierten Gewebe vs. Kontrollgewebe. Die Untersuchungen zeigten, dass in IEZ und im epithelialen Darmgewebe von MC-Patienten verstärkt Nalp3-mRNA und -Protein nachgewiesen werden konnte, während im gesunden Darm keine Nalp3-mRNA und nur wenig Nalp3-Protein detektiert werden konnten. In IMAC dagegen wurde sowohl in Kontrollen, als auch in den entzündungsassoziierten Proben Nalp3-mRNA und -Protein detektiert, wobei die mRNA- und Proteinmenge bei MC deutlich erhöht war.

Nalp3 enthält, wie alle NBS-LRR Proteine, anstelle der für die NOD-Proteine charakteristischen aminoterminalen CARD-Domäne eine PYD-Domäne. Über ausschließlich homophile PYD-PYD Interaktionen [256;257] bindet Nalp3 an das Adapterprotein ASC, welches sowohl eine aminoterminal PYD-Domäne als auch eine carboxyterminale CARD-Domäne enthält. ASC bindet über seine CARD-Domäne Caspase-1. Dieser 700 kDa große Multiproteinkomplex – das Nalp3 Inflammasom – ist für die Aktivierung von Caspase-1 mit nachfolgender Prozessierung und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 verantwortlich. Neben dem Nalp3-Inflammasom bilden auch Nalp1, Nalp2 und IPAF ähnliche Multiproteinkomplexe, die sich vor allem durch die rekrutierten Effektorcaspasen unterscheiden [255]. Die Aggregation und Aktivität des Nalp3 Inflammasoms unterliegt einer strengen Regulierung, auf die im späteren Verlauf der Diskussion näher eingegangen wird.

Nalp3 zeigt eine starke Gewebespezifität in hauptsächlich nicht-keratinen Epithelien in Oropharynx, Ösophagus und dem weiblichen Reproduktionstrakt sowie der Urothelschicht der Harnblase [255]. Nalp3 mRNA wurde weiterhin in peripheren Blutleukozyten, z.T. in Neutrophilen (nach Stimulierung), und in geringem Maße auch im Auge und der Haut detektiert [145;258]. Die überlappenden Expressionsprofile von Nalp3 und seinem Adapterprotein ASC, welches vorwiegend in Epithelzellen und peripheren blutmononukleären Zellen nachgewiesen wurde [255] lassen vermuten, dass das Nalp3 Inflammasom eine kritische Rolle in der primären Abwehrreaktion gegen invasive Pathogene und mögliche Allergene spielt. Der in dieser Arbeit erstmals erbrachte Nachweis von Nalp3 im entzündungsassoziierten intestinalen Epithel und seine Ko-Lokalisation mit IEZ und IMAC zeigt die Bedeutung intrazellulärer bakterieller Sensoren für die Pathogenese der chronischen Darmentzündung. Das intestinale Epithel erfüllt als primäre Barriere gegen lumenale Antigene eine duale Funktion - einerseits muss es eine effektive Immunantwort gegen Pathogene mit dem Ziel der Neutralisierung und Eliminierung schädlicher Antigene induzieren, gleichzeitig aber durch eine immuntolerante Antwort auf harmlose Antigene der kommensalen Flora und Nahrungsmittel schädliche Effekte auf körpereigene Gewebe verhindern. Im gesunden Darm besteht ein Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz. Die geringe Aktivität der IEZ im gesunden Darm spiegelt sich im Vorhandensein von Oberflächenrezeptoren wieder. IEZ exprimieren konstitutiv kein CD14, exprimieren aber TLR3. TLR5-, TLR2- und TLR4-mRNA waren in normalen primären Darmepithelzellen kaum nachweisbar [236]. Spekuliert wird, dass eine Induktion insbesondere von TLR4 in IEZ bei CED eine Hyperreagibilität auf Komponenten luminaler Darmbakterien zur Folge hat [236;259]. Die in dieser Arbeit detektierten Unterschiede der Nalp3-Menge im intestinalen Gewebe von Kontrollpatienten und MC-Patienten sowie die gezeigte Induktion von NOD2/CARD15 durch bakterielle Stimulierung zeigen, dass auch intrazelluläre Sensoren bakterieller Produkte durch Stimulierung induziert werden. IEZ könnten durch die Induktion von Rezeptoren für extra- und intrazelluläre Pathogene/Pathogenbestandteile hypersensibilisiert werden, wodurch ihre immuntolerante Funktion aufgehoben wird und es zu einer unkontrollierten Entzündungsantwort auf alle luminalen Antigene, sowohl pathogene als auch nicht pathogene, kommt. Zusammen mit der bei MC nachgewiesenen fehlenden Fähigkeit, die Immunreaktionen kontrolliert beenden zu können [260], nimmt die Entzündung einen chronischen Verlauf. IEZ fiele in diesem Falle eine immunologische Starter- und Schlüsselrolle zu.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass IEZ durch Stimulierung mit invasiven Bakterien, Parasiten oder bakteriellen Zellwandpolymeren ein charakteristisches Repertoire chemotaktischer Peptide, Adhäsionsmoleküle, MHC-Klasse II-Molekülen und proinflammatorischen Zytokinen exprimieren [231;261;262]. Die Expression dieser Moleküle

ist sowohl temporär als auch in der Abfolge reguliert, wodurch zuerst Neutrophile, gefolgt von Monozyten und T-Lymphozyten aus der Zirkulation auswandern. Konsequenz der Effektorzellmigration zur verletzten/infizierten Mukosa ist die Phagozytose invasiver Pathogene (z.B. durch IMAC), die Expression proinflammatorischer Entzündungsmediatoren sowie die weitere Translokation luminaler Bakterien [192]. Eine durch bakterielle Translokation hervorgerufene Hypersensibilisierung von IEZ durch Induktion membranassoziierter und zytosolischer Sensorproteine in Kooperation mit einer fehlregulierten (dauerhaften) Entzündungsantwort könnten somit die Ursache der chronischen Darmentzündung bei MC darstellen.

Aufgrund des deutlich stärkeren Nachweises von Nalp3-mRNA und Nalp3 Protein in entzündungsassoziierten Proben und im Gewebe von MC-Patienten sollte die potentielle Aktivierung des Nalp3 Inflammasoms untersucht werden. In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei MC zur Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms kommt. Welche natürlichen Stimuli zur Aggregation und Aktivierung des Nalp3 Inflammasoms führen, ist bisher nur unzureichend bekannt. Studien zeigten eine essentielle Rolle für Nalp3 und sein Adapterprotein ASC in der Vermittlung der Caspase-1-Aktivierung als Antwort auf verschiedene bakterielle Liganden, Nukleinsäuren und antivirale Komponenten wie Imidazoquinolin [263]. Weiterhin wurde eine potente Caspase-1-Aktivierung ATP-stimulierter Makrophagen als Antwort auf LPS, Endotoxin, MDP, Lipoteichonsäure, Lipoprotein und doppelsträngige RNA gefunden [264-266]. Kürzlich wurden auch die endogenen Gicht- und Pseudogicht-auslösenden Harnsäurekristalle Mononatrium-Urat und Calcium-Pyrophosphat-Dihydrat als Nalp3-Liganden identifiziert [267]. Das Inflammasom fungiert somit als erste Abwehr gegen Zellstress [267;268]. Signale des Zellstress-aktivierten Inflammasoms können mit Signalen von TLRs und anderen PRRs, die durch endogene oder exogene Liganden aktiviert werden, kooperieren und Entzündungsantworten regulieren [269].

Caspase-1 wird als inaktive 45 kDa Proform synthetisiert und autokatalytisch nach einem adäquaten Stimulus prozessiert. Dieser Stimulus wird wahrscheinlich im Zuge der Aggregation des Nalp3 Inflammasoms durch homophile CARD-CARD Interaktionen zwischen ASC und Caspase-1 vermittelt, wodurch Konformationsänderungen induziert werden, die zur autokatalytischen Aktivierung führen [270]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte gesteigerte Aktivität von Caspase-1 im Darm von MC-Patienten zusammen mit dem deutlich stärkeren Nachweis von Nalp3 im entzündeten Darmgewebe sowie in entzündungsassoziierten IEZ und IMAC indizieren die Zusammenlagerung und Aktivierung des Nalp3 Inflammasoms bei MC. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sowohl im Darm von MC-Patienten als auch in Kontrollen konstitutiv die 24 kDa große IL-18-Proform synthetisiert wird. Reifes IL-18 wurde nur in den intestinalen Proteinlysaten von MC-

Patienten detektiert. Diese Daten unterstützen den vorab diskutierten entzündungsassoziierten Nachweis und die Aktivierung von Caspase-1. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Menge an IL-18 mRNA in IEZ aus dem Ileum und Kolon sowie in LPMNZ erhöht ist [271;272]. Auch im Serum von MC-Patienten wurden deutlich höhere Konzentrationen IL-18 detektiert als in Kontrollen, wobei die Serumlevel mit der Krankheitsaktivität korrelierten [273]. Diese Korrelation konnte bei den in diese Arbeit eingeschlossenen MC-Patienten nicht bestätigt werden. In zahlreichen Studien an experimentellen Colitismodellen hat sich außerdem die IL-18 Blockierung als therapeutisch wirkungsvoll gezeigt [274-278]. Mononukleäre Zellen der *Lamina Propria* produzieren als Antwort auf Bakterien/bakterielle Produkte nach Aktivierung von NF- κ B IL-12, welches in Ko-Stimulation mit IL-18 eine Th1-Differenzierung naiver T-Zellen bewirkt [259]. IL-12 macht daneben durch Induktion des IL-18 Rezeptors die T-Zellen empfänglich für die Stimulation mit IL-18. Zusätzlich scheinen IL-12 und IL-18 mehrere Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, unter anderem NF- κ B, wodurch synergistisch die Promotorregion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF und IL-2 aktiviert wird [259]. Neben der Ausschüttung von konsekutiv gewebedestruktiven MMPs kommt es dadurch zur erneuten Aktivierung von IMAC und Sekretion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF, wodurch die Darmentzündung durch Produktion von Akut-Phase-Proteinen, Chemotaxis und Aktivierung neutrophiler Granulozyten sowie IMAC unterstützt bzw. unterhalten wird [259]. Die durch T-Zellen kontrollierte Beendigung des Entzündungsprozesses scheint bei MC gestört zu sein, was in einem chronischen Verlauf der Darmentzündung resultiert [260].

Die Aktivierung und Prozessierung von IL-1 β und IL-18 benötigt zwei verschiedene Signale [279]. Das erste Signal wird durch TLR-Aktivierung vermittelt und führt zur Synthese von pro-IL-1 β und anderen Proteine, die für das Inflammasom benötigt werden, wobei Makrophagen und DCs ASC und Caspase-1 konstitutiv exprimieren [106;280]. Auch pro-IL-18 wird konstitutiv exprimiert, wie der Nachweis der IL-18 Proform sowohl in entzündungsassoziierten als auch Kontrollproben belegte. Die Aktivierung der Caspase-1 durch intrazelluläre Pathogene wie *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* und *Francisella* benötigt kein zusätzliches TLR *Priming*, jedoch kann dieses die Caspase-1 Prozessierung verstärken [281]. Die anhand der vorliegenden Daten postulierte bakterielle Translokation bei MC könnte somit durch exogene und endogene bakterielle Stimuli (MDP, PDG, LPS, Flagellin) die Caspase-1-Aktivität und Sekretion proinflammatorischer Zytokine erhöhen. Das zweite Signal scheint von der Aktivierung purinerger Rezeptoren des P2X₇ Subtyps auf der Zelloberfläche vermittelt zu werden, deren primärer Ligand ATP ist [282]. Endothelzellen, Epithelzellen, Makrophagen und T-Zellen sezernieren unter verschiedenen Stressbedingungen ATP in den Perizellularraum [283]. Die Notwendigkeit eines zweiten

Signals für die Zytokinprozessierung könnte eine Art Schutzmechanismus darstellen, welcher sicherstellt, dass die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine nur in Anwesenheit von „Gefahr“ stattfindet. Die P2X₇ Rezeptor-Aktivierung durch ATP induziert einen Kaliumefflux und Calciuminflux, welcher die Calcium(un)abhängige Phospholipase A₂ aktiviert. Calcium-unabhängige Phospholipase A₂ stimuliert die Ko-Lokalisation von Caspase-1 und pro-IL-1 β in sekretorischen Lysosomen, wodurch wiederum die Aktivierung der Caspase-1 und IL-1 β Prozessierung gefördert wird [284;285]. Interessanterweise wird durch die Bindung von ATP an P2X₇ auch die intrazelluläre ROS-Synthese induziert [286]. Diese Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit ebenfalls gezeigte Induktion der NADPH-Oxidase-Aktivität bei MC.

Um den differentiellen Nachweis von Nalp3 in IMAC von MC-Patienten zu bestätigen, sollte Nalp3 in MZS untersucht werden. Dieses Modell imitiert die Differenzierung humaner Blutmonozyten in die reaktive Makrophagenpopulation, welche in der Mukosa von MC-Patienten gefunden wurde [201]. MZS wurden nach 1, 3 und 7 Tagen Ko-Kultur mit Blutmonozyten auf Nalp3 Protein untersucht. Die Daten zeigten, dass Blutmonozyten gesunder Spender basal nur einen geringen Nalp3 Gehalt aufweisen. Im Zuge der Differenzierung zu reaktiven, CED-charakteristischen IMAC konnte ein deutlicher Anstieg in der Nalp3 Menge nachgewiesen werden.

Monozyten und IMAC unterscheiden sich durch ein distinktes Muster an Antigenen auf der Zelloberfläche. Neben dem „klassischen“ Monozyten-Oberflächenantigen CD14 exprimieren Monozyten auch den Fc γ III-Rezeptor (CD16), den Rezeptor für die Komplementkomponente C3b (CD11b) sowie die T-Zell ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. IMAC dagegen exprimieren weder CD14 noch CD16, ebenso findet man nur geringe Mengen CD11b und keine T-Zell ko-stimulatorischen Moleküle [85;88;90]. Möglicherweise sind mit dieser Differenzierung spezifische Funktionen für das intestinale Immunsystem verbunden. Die Expression von Oberflächenmolekülen entscheidet z.B. darüber, wie reaktionsfähig IMAC sein können und in welchem Ausmaß sie eine T-Zellantwort induzieren können. In der Mukosa von MC-Patienten konnte neben diesen anergen IMAC eine zweite reaktive IMAC-Population identifiziert werden, welche eine erhöhte CD14 Expression sowie Expression des Fc γ III-Rezeptors und der T-Zell ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aufweist [88;90]. Neben dem veränderten Antigenmuster zeigt die reaktive IMAC-Population auch Veränderungen im Aktivierungszustand – während der intestinalen Entzündung zeigte sich eine Aktivierung von NF- κ B sowie der NADPH-Oxidase und CTSD [86;91;180].

Ein Anstieg intrazellulärer Rezeptormoleküle, wie Nalp3, würde dem erhöhten Aktivierungszustand der CED-assoziierten IMAC-Population entsprechen. Erhöhte

intrazelluläre Nalp3 Level in entzündungsassoziierten IMAC können, wie in dieser Arbeit gezeigt, zur Aktivierung der Caspase-1 und Prozessierung/Sekretion von IL-18 und IL-1 β führen, deren Effektorwirkungen wiederum die intestinale Entzündung fördern. Die zusätzlich fehlerhafte, kontrollierte Terminierung proinflammatorischer Entzündungsreaktionen bei CED [260] resultiert in einer chronischen Darmentzündung.

5.5 Weitere NOD2/CARD15-abhängige Folgen der Aktivierung mit Einfluss auf die Entzündung

In diesem Teil der Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die bakterielle Zellwandkomponente MDP *in vitro* auch proteolytische Enzyme (CTSB und CTSL) induziert. In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass bakterielle Produkte zur Induktion einer proinflammatorischen Entzündungsantwort bei MC führen. Inwieweit die bakterielle Translokation auf andere entzündungsfördernde und gewebedegradierende Prozesse Einfluss nimmt, war bisher nicht bekannt. Aufgrund der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe identifizierten lysosomalen Proteinase CTSD als differentiell exprimiertes Gen bei CED [180] sowie zahlreicher Publikationen zur Beteiligung von Cathepsinen an verschiedenen destruktiven und malignen Erkrankungen [154-159] sollte eine potentielle Mitwirkung dieser Proteine am Beispiel der am besten charakterisierten Cathepsine B, L und D in der Gewebeerstörung bei MC untersucht werden.

Neben dem Nachweis der Induktion von CTSB und CTSL durch MDP konnten auch deutliche Mengenunterschiede festgestellt werden - die gemessene CTSL RNA-Menge war bis zu 10fach höher als die CTSB RNA-Menge. Die höchsten RNA-Mengen beider Cathepsine wurden bei einer Stimulierungsdosis von 500 ng/ml erreicht – der selben Dosis für die maximale Aktivierung des NOD2/CARD15 Promotors. Die Unterschiede im RNA-Gehalt erklären möglicherweise die relativ geringe Aktivität von CTSB im Vergleich zu anderen Cathepsinen [287]. Interessanterweise wird die Expression von CTSB und CTSL auch durch Zytokine reguliert. In Lungenepithelzellen konnte beispielsweise die CTSL-Expression und -Proteinsynthese durch IL-6 signifikant gesteigert werden [288], Tumorzellen zeigten durch IL-8 Stimulierung eine erhöhte Sekretion von CTSB [289]. Bakterielle Translokation bzw. intrazelluläre Stimulierung durch bakterielle Produkte könnte somit über die Aktivierung des NOD2/CARD15-vermittelten NF- κ B-Signalpfades und die Synthese proinflammatorischer Zytokine zur Induktion der Cathepsinexpression im Darm von MC-Patienten führen.

Lange Zeit wurde der terminale Proteinabbau als einzige Aufgabe der Cystein-Proteinasen innerhalb der Zelle postuliert [170]. Erst die Identifizierung weiterer Mitglieder dieser Enzymklasse und Studien an Cathepsin-defizienten Mäusen zeigten die große Bedeutung der Cystein-Proteinasen in zahlreichen degenerativen und chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Osteoporose, Krebsmetastasierung, rheumatoider Arthritis und infektiösen Erkrankungen [154-156;290]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Induktion der Cathepsinexpression durch bakterielle Stimulierung ließ eine potentielle Beteiligung dieser Proteinfamilie an der Zerstörung der Mukosa bei CED vermuten. So konnte eine Erhöhung des CTSL mRNA-Gehaltes sowie eine tendenzielle Erhöhung von CTSB mRNA in IMAC während der intestinalen Entzündung im Krankheitsbild CED nachgewiesen werden, welche sich durch immunfluoreszente Doppelfärbung mit dem Makrophagenmarker CD68 in humanem intestinalen Gewebe auch auf Proteinebene bestätigte.

Die lysosomalen Cysteinproteinasen CTSB und CTSL sind neben der Degradierung extra- und intrazellulärer Proteine auch an der Antigenpräsentierung beteiligt, wo sie in Kooperation mit CTSD und CTSB die Proteolyse antigener Peptide vermitteln, welche über MHC-Klasse II Moleküle T-Zellen präsentiert werden [291;292]. CTSB und CTSL können sezerniert werden, wodurch sie ihre proteolytischen Eigenschaften auch extrazellulär z.B. durch Degradierung extrazellulärer Matrixproteine wie Laminin und Kollagen [293;294], den Abbau von Zell-Adhäsionsproteinen (E-Cadherin) [295] sowie der Aktivierung von Proenzymen wie dem pro-Urokinase-Plasminogen-Aktivator [296;297] entfalten können. CTSB fungiert weiterhin als Aktivator anderer Proteinasen, welche wiederum degradierende Prozesse vermitteln können [298]. In IFN- γ -behandelten Makrophagen und LPS-aktivierten DCs konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Akkumulation von CTSL durch proinflammatorische Stimuli induziert wird [299]. Da auch in dieser Arbeit CTSB und CTSL mit IMAC ko-lokalisiert wurden und deren Expression durch MDP induziert werden konnte, könnten die durch bakterielle Bestandteile stimulierten Makrophagen somit Proteinasen mobilisieren und dadurch am pathophysiologischen Umbau der extrazellulären Matrix mitwirken. Ein im Darm von MC-Patienten nachgewiesener gesteigerter intrazellulärer Cathepsingehalt könnte die degradierenden Effekte zusätzlich erhöhen. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass CTSB- und CTSL-exprimierende CD68-positive humane mononukleäre Zellen eine wichtige Rolle bei Patienten mit rheumatoider Arthritis spielen, wo sie in großem Maße an der Gelenkszerstörung und Knochenerosion beteiligt sind [300]. Der Umbau extrazellulärer Matrix durch Proteasen wie dem humanen Alveolar-Makrophagen-CTSL spielt ebenso eine Rolle bei Lungenemphysemen [301]. Während chronischer Lungenentzündungen konnte weiterhin eine massiv erhöhte Aktivität der Cathepsine L, B, H und S in Alveolar-Makrophagen festgestellt werden [302].

Diese Studien zeigen zusammen mit der in dieser Arbeit festgestellten Induktion von CTSB und CTSL in der CED-assoziierten Darmentzündung die pathophysiologische Rolle beider Cathepsine in der chronischen Darmentzündung.

Folglich stellte sich die Frage, ob eine selektive Hemmung der Cathepsin-Aktivitäten im experimentellen Colitismodell eine verminderte Entzündungsreaktion bewirken kann. In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass (i) die Cathepsine B, D und L im murinen Kolon aktiv sind und (ii) durch Hemmung ihrer Aktivitäten in der DSS-induzierten Modell-Colitis eine deutliche Verbesserung der Erkrankung erzielt werden konnte.

Die akute DSS-Colitis führt durch toxische Effekte zu einer schnellen Entzündung und Zerstörung der Mukosa [303]. Aufgrund der in Vorarbeiten gezeigten Induktion gewebedegradierender Enzyme im Allgemeinen und speziell eine Erhöhung von CTSD in IMAC von MC-Patienten [91;180] wurde neben der pathophysiologischen Relevanz der Hemmung von CTSB und CTSL auch CTSD untersucht. Die Hemmung von CTSD mit dem spezifischen Inhibitor Pepstatin A resultierte in einer deutlichen Verbesserung der intestinalen Entzündung in den inhibitorbehandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen, wie ein reduzierter Gewichtsverlust, eine geringere Kolonverkürzung und ein geringerer histologischer Entzündungsgrad belegten. Die Aktivität der gewebedegradierenden MPO wurde durch die Inhibitorbehandlung nicht beeinflusst. Gleichmaßen zeigte auch die simultane Hemmung von CTSB und CTSL mit den Inhibitoren CA-074 und Z-Phe-Tyr-Aldehyd eine geringere Entzündungsmanifestation.

Die Bedeutung der Cathepsine B, D und L außerhalb des metabolischen Proteinabbaus zeigte sich durch Studien an *knockout*-Mäusen. Während CTSB- bzw. CTSL-defiziente Mäuse nur leichte phänotypische Veränderungen zeigen, führte eine simultane Defizienz postnatal innerhalb von 2 bis 4 Wochen aufgrund massiver Atrophien im Gehirn zum Tod der Tiere [171]. Daher wurde eine kombinierte Effektorwirkung beider Cathepsine vermutet und in diesem Teil der Arbeit eine simultane Hemmung durchgeführt. CTSD-defiziente Mäuse sterben postnatal an Tag 26 aufgrund massiver intestinaler Nekrose, Thromboembolie und Lymphopenie [179].

Um die Effektivität der Cathepsin-Hemmung zu garantieren, wurden zunächst die basalen Aktivitäten von CTSB, CTSD und CTSL im murinen Kolon bestimmt. Dabei zeigte sich, dass alle drei Cathepsine Enzymaktivität zeigen und CTSB, konträr zum humanen Darm, im murinen Kolon etwa doppelt so aktiv ist wie CTSL. In Tumorzellen konnte die Expression verschiedener Transkriptvarianten von CTSB und CTSL nachgewiesen werden, welche aufgrund der Nutzung alternativer Promotoren [304;305] und alternativem Spleißen

entstehen [306;307]. Hohe Mengen eines kurzen CTSB-Transkripts, welches die effektivste Translation zeigten, waren für dessen Überexpression in Tumoren der Brust, des Kolons, der Prostata und Melanomen verantwortlich [304;305;308;309]. Auch die kürzeste CTSL-Transkriptvariante bedingte in malignen Zellen die CTSL-Überexpression [310]. Möglicherweise existieren auch im murinen Darm verschiedene Transkriptvarianten, deren Translation in einem unterschiedlichen Proteingehalt resultiert, der die Basalaktivitäten bedingen könnte. Aufgrund des ausschließlichen Nachweises der *full length* Transkripte in humanen IMAC und HEK293T-Zelllysaten wurden diese Unterschiede dort nicht detektiert.

Doch wie können Cathepsine in die Pathophysiologie der CED involviert sein? Aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität gegenüber extra- und intrazellulären Proteinen könnten sezerniertes CTSB und CTSL, ebenso wie (durch Makrophagenschädigung oder Apoptose) freigesetztes CTSD Komponenten der extrazellulären Matrix zerstören, wodurch es zur Gewebedestruktion, mukosalen Schädigungen, Barrieredefekten und bakterieller Invasion kommen kann. CTSD vermittelt interessanterweise auch Apoptose, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht geklärt ist [311]. Vermutlich wird durch oxidativen Stress die Translokation aus den Lysosomen in das Zytosol initiiert, wo CTSD Caspasen aktiviert [311]. Auch in dieser Arbeit wurde ein erhöhter oxidativer Burst bei MC nachgewiesen, welcher möglicherweise zur Steigerung der CTSD-Aktivität beitragen könnte. In gesunden Individuen ist die proteolytische Aktivität der Cathepsine auf die kontrollierte Proteolyse in zellulären und metabolischen Prozessen beschränkt. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Steigerung der CTSB- und CTSL RNA-Mengen durch bakterielle Stimulierung sowie durch proinflammatorische Zytokine [288;289] könnte bei CED-Patienten die Cathepsin-vermittelte Proteolyse durch bakterielle Invasion zusätzlich gefördert werden, wodurch es zur massiven Gewebedestruktion und Entzündung kommt.

Die Daten zeigen nicht nur, dass Cathepsine eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der CED spielen, sondern darüber hinaus auch einen neuen Therapieansatz darstellen können. Therapeutische Strategien zielen heute meist auf eine Reduktion der Entzündung durch selektive Hemmung von T-Zellen oder Makrophagen. Die Hemmung der Cathepsinaktivität zeigt ein alternatives Konzept zur Prävention der mukosalen Gewebszerstörung. Die in dieser Arbeit verwendeten Cathepsininhibitoren können die Zellmembran nicht passieren und verbleiben im Extrazellularraum. Cathepsininhibitoren würden somit einen idealen Therapieansatz liefern: die intrazelluläre, essentiell wichtige Cathepsin-Aktivität (vor allem für Makrophagenfunktionen) würde erhalten bleiben, während die extrazelluläre Cathepsin-Aktivität selektiv durch Inhibitorbehandlung gehemmt würde.

Sauerstoffmetabolite (ROS), welche bei Akkumulation Gewebe- und Barriere destruktiv wirken, wird ebenfalls durch iPA_2 induziert (⑥). Neben einer durch die NOD2/CARD15-Aktivität regulierten, reduzierten Synthese antimikrobieller α -Defensine durch Paneth-Zellen (⑦) spielen auch die durch MDP und proinflammatorische Zytokine induzierten Cathepsine B, D und L (⑧) eine Rolle bei der Manifestation der intestinalen Entzündung im Krankheitsbild MC.

① Die durch die luminale Flora veränderte und zerstörte Schleimhautbarriere erlaubt eine starke Adhäsion luminaler Keime, welche durch metabolische Prozesse ein optimales Milieu für die weitere Besiedelung durch Bakterien schaffen (4.2.1). Über veränderte Zell-Zell-Kontakte können diese adhärenen Bakterien die epitheliale Barriere überwinden (4.2.2). Bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS, Endotoxin und PDG können dadurch vielfältige Signalwege induzieren, die alle in einer proinflammatorischen Immunreaktion resultieren.

② Die Aktivierung des NOD2/CARD15-vermittelten Signalweges erfolgt durch den Kontakt der LRRs des NOD2/CARD15 Proteins mit dem Liganden MDP, welcher vermutlich durch den Verdau von Bakterien in Phagolysosomen durch APCs das Zytosol erreicht. Aktiviertes NF- κ B induziert schließlich eine Vielzahl proinflammatorischer Gene, welche eine Rolle bei der Regulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort spielen, z.B. die Kontrolle der Expression unterschiedlicher Immunmodulatoren wie der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und TNF. Dadurch werden z.B. Neutrophile rekrutiert und Entzündungsreaktionen ausgelöst. Umgekehrt kann sich durch Bindung von NF- κ B an adäquate Bindestellen im NOD2/CARD15-Promotor die NOD2/CARD15 Expression selbst hochregulieren. (4.3.1; 4.3.2; 4.3.3)

③ NOD2/CARD15 kann regulierend in TLR2- und TLR4-vermittelte Signalwege eingreifen. Der bakterielle Zellwandbestandteil PDG vermittelt über TLR2 die Aktivierung von NF- κ B. Dieser Signalpfad kann durch die MDP-vermittelte NOD2/CARD15-Aktivierung negativ reguliert werden, wodurch eine reduzierte NF- κ B-Aktivierung erfolgt. In Abwesenheit von NOD2/CARD15 ist diese Negativregulation aufgehoben. TLR2 kann auch NOD2/CARD15-unabhängig, durch direkte Aktivierung von RICK, NF- κ B aktivieren. Die Aktivierung von TLR4 durch den Liganden LPS führt nicht nur zur Aktivierung von NF- κ B, sondern auch zu einer gesteigerten Expression von NOD2/CARD15, wobei NOD2/CARD15 wiederum die Expression von MyD88 und gesteigerte IKK γ -Aktivierung über einen unabhängig positiven Effekt durch RICK induzieren kann.

④ Als weiterer „Rezeptor“ für MDP wurde auch intrazelluläres Nalp3 identifiziert, deren Interaktion die Aggregation des Nalp3 Inflammasoms induziert (4.4). Diese Bindung resultiert in der Aktivierung der Caspase-1 und Prozessierung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18, die daraufhin sezerniert werden (4.4.2). Die gemeinsame Interaktion von IL-18 und IL-12 führt zur Th1-vermittelten Differenzierung naiver T-Zellen.

Durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine werden weitere Immunzellen rekrutiert, gewebedegradierende MMPs aktiviert und somit die Entzündungsreaktion und Gewebszerstörung gefördert und unterhalten.

⑤ Extrazelluläres ATP, welches von Zellen bei zellulärem Stress oder Apoptose freigesetzt wird, kann an den membranständigen P2X₇-Rezeptor binden. Diese Interaktion resultiert in der Aktivierung der Calcium-unabhängigen Phospholipase A₂ (iPLA₂). iPLA₂ stimuliert die Ko-Lokalisation von Caspase-1 und pro-IL-1 β in sekretorischen Lysosomen, wodurch wiederum die Aktivierung der Caspase-1 und IL-1 β Prozessierung gefördert wird.

⑥ Neben bakterieller Stimulierung (LPS) fördert auch die Bindung von ATP an P2X₇ die intrazelluläre ROS-Synthese. Eine unkontrollierte Akkumulation von ROS führt zu Gewebsdestruktion und Entzündungsreaktionen und kann die bakterielle Translokation zusätzlich fördern. (4.3.4)

⑦ Die Produktion und Sekretion von α -Defensinen durch Paneth-Zellen hängt ebenfalls von der NOD2/CARD15-Aktivierung ab, so dass es im Darmepithel von MC-Patienten zu einer reduzierten Sekretion dieser antimikrobiellen Peptide kommt.

⑧ Nicht zuletzt führt auch die Synthese proteolytischer Enzyme der Cathepsinfamilie, deren Synthese durch bakterielle Produkte (MDP) und proinflammatorische Zytokine signifikant gesteigert werden kann, zum unkontrollierten Abbau extrazellulärer Matrixkomponenten, wie Kollagen, Laminin oder Elastin und trägt somit zur massiven Zerstörung des mukosalen Gewebes im Darm von MC-Patienten bei. (4.5)

Zusammenfassend zeigt diese Modellvorstellung, dass Bakterien und/oder bakterielle Produkte durch Überwindung der intestinalen Barriere im Darm von CED-Patienten ein Netzwerk multipler Signalmoleküle und proinflammatorischer Entzündungsreaktionen induzieren, deren zentraler Mediator der Transkriptionsfaktor NF- κ B zu sein scheint. Zusätzlich trägt eine fehlregulierte Terminierung von Immunreaktionen sowie Reduktion autoprotektiver Schutzmechanismen wie die zerstörte Mukusschicht oder reduzierte Synthese antimikrobieller Substanzen zum chronischen Verlauf der intestinalen Entzündung bei MC bei.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Der humane Darm steht dem luminalen Fäces mit nur einer einlagigen Epithelzellschicht gegenüber. Das intestinale Epithel muss daher eine hochselektive Barrierefunktion erfüllen, die einerseits die Passage potentiell toxischer und pathogener Substanzen in den Wirt verhindert, andererseits aber die digestiv-resorptive Nahrungsassimilation erlaubt. Schleimhautschädigungen können, ebenso wie primäre Störungen der Epithelzellen, zu einem unphysiologischen Antigeneinstrom in die Darmwand führen. Die unmittelbare Erkennung und Abwehr von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem spielt für das Überleben vielzelliger Organismen eine wichtige Rolle. Der Organismus bedient sich hierbei spezifischer Rezeptoren (PRRs), welche molekulare Muster verschiedener Pathogene (PAMPs), wie LPS und MDP, erkennen. Die NOD-Proteinfamilie stellt intrazelluläre Sensoren bakterieller PAMPs dar, deren Vertreter NOD2/CARD15 als Suszeptibilitätsgen für Morbus Crohn (MC), einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, identifiziert wurde. Der direkt NOD2/CARD15-vermittelte Signalpfad endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher unter anderem die Expression eines Netzwerks proinflammatorischer Zytokine induzieren kann. Die Ätiopathogenese des MC ist bis heute nicht vollständig geklärt. Neben genetischen und ökologischen Faktoren scheint vor allem die luminalen Flora einen großen Beitrag zur Entstehung der chronischen Darmentzündung beizutragen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedeutung des „Crohn-Gens“ NOD2/CARD15 für die bakterielle Translokation in das intestinale Gewebe bei Morbus Crohn zu untersuchen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Translokation von luminalen Bakterien und/oder bakteriellen Produkten in das (sub)epitheliale Gewebe eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege induziert, welche in ihrer Kooperation die Darmentzündung und Gewebszerstörung fördern und aufrechterhalten können. Der NOD2/CARD15 Genotyp der Patienten

scheint dabei vor allem für die durch den zentralen Mediator NF- κ B vermittelten Immunreaktionen eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Charakterisierung humaner IMAC und Untersuchung verschiedener Gene erforderte primär ein hochreines Zellisolat, welches durch die in der Arbeitsgruppe etablierte Isolierung über den Makrophagenmarker CD33 erhalten wurde.

Im gesunden Darm besteht die physiologische Antwort des Immunsystems auf oral aufgenommene Nahrungsmittelantigene und die kommensale Darmflora im Fehlen einer spezifischen peripheren Immunantwort (orale Toleranz). Im Krankheitsbild MC ist diese Toleranz gestört und es kommt zu einer atolerogenen Antwort auf mikrobielle und Nahrungsmittelantigene, welche in einer hyperreaktiven, NF- κ B-vermittelten Immunantwort resultiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der bakteriellen Translokation auf die Regulation der intrazellulären Sensorproteine NOD2/CARD15 und Nalp3 sowie die intestinale Entzündung bei MC zeigten, dass (i) die bakterielle Zellwandkomponente MDP den NOD2/CARD15 Promotor sowie die NOD2/CARD15 Genotyp-spezifische Aktivierung des NF- κ B Signalweges *in vitro* induziert, (ii) es im intestinalen Gewebe von MC-Patienten zu einer NOD2/CARD15 Genotyp-spezifischen Aktivierung von NF- κ B kommt und es in IEZ und IMAC von MC-Patienten zur Erhöhung von Nalp3-mRNA und -Protein kommt. Nalp3 bildet zusammen mit ASC, Caspase-1 und Cardinal einen Proteinkomplex, das Nalp3 Inflammasom, welches eine molekulare Plattform für die Aktivierung der proinflammatorischen Caspase-1 darstellt. Die durch Aktivierung des Nalp3 Inflammasoms induzierte Prozessierung der pro-Caspase-1 sowie Reifung von IL-18 konnte nachgewiesen werden. Die differentiellen Unterschiede im Nalp3-Gehalt der IMAC konnten im multizellulären Sphäroidmodell, welches die Differenzierung von Blutmonozyten zur reaktiven IMAC-Population bei MC initiiert, bestätigt werden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die übermäßige bakterielle Stimulierung in IMAC bei MC in einer Fehlregulation gewebezerstörender Enzyme resultiert: die Aktivität der NADPH-Oxidase und somit Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite war in IMAC bei MC erhöht und der CTSB- und CTSL-mRNA-Gehalt konnte *in vitro* durch Stimulierung mit MDP signifikant gesteigert werden. Eine erhöhte Menge CTSB- und CTSL-mRNA und -Protein wurde auch in IMAC und im Gewebe von MC-Patienten detektiert. Durch Hemmung der Enzymaktivitäten von CTSD und CTSB/CTSL konnte im Modell der experimentellen DSS-Colitis *in vivo* ein neuer Therapieansatz für CED generiert werden.

Durch mikrobielle Stimuli kommt es bei MC zusätzlich zur Veränderung autoprotektiver Schutzmechanismen des Darmepithels. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der intestinale Mukus von MC-Patienten eine starke bakterielle Adhärenz aufweist, wurde untersucht, ob diese auch zur Translokation in das intestinale Gewebe führen kann.

Die Akkumulation bakteriellen Endotoxins im intestinalen Gewebe von MC-Patienten wies ebenfalls NOD2/CARD15 Genotyp-spezifische Unterschiede auf. Als mögliche Translokationsroute wurden in ihrer Proteinzusammensetzung veränderte Zell-Zell-Kontakte aufgedeckt.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass im Krankheitsbild Morbus Crohn eine Translokation luminaler Bakterien und/oder bakterieller Produkte durch Überwindung der epithelialen Zell-Zell-Kontakte stattfindet. Intrazelluläre bakterielle Stimulierung induziert ein Netzwerk multipler Signalmoleküle und proinflammatorischer Entzündungsreaktionen, deren zentraler Mediator NF- κ B zu sein scheint.

Kapitel 7

Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Morbus Crohn die übermäßige Translokation luminaler Bakterien und/oder bakterieller Produkte durch Überwindung der epithelialen Zell-Zell-Kontakte ein Netzwerk multipler Signalmoleküle und Entzündungspfade induziert, deren zentraler Mediator NF- κ B zu sein scheint.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels FISH die starke Adhärenz von Bakterien im intestinalen Mukus nachgewiesen, jedoch gelang die Detektion direkt Mukosa-assoziiierter Bakterien dadurch nicht. Bisher ist aufgrund experimenteller Schwierigkeiten und unzureichender Spezifität nur wenigen Arbeitsgruppen der überzeugende Nachweis intramukosaler Bakterien gelungen. Ein großes Ziel nachfolgender Experimente ist daher die Optimierung der FISH-Methodik durch weitere Modulation der Gewebeaufbereitung, -fixierung und immunhistochemischen Färbung. Die Amplifikation konservierter, speziestypischer, bakterieller Sequenzen mittels PCR stellt eine sensitive Alternative zum Nachweis translozierter Bakterien dar, welche final Aufschluss über die Zusammensetzung der intramukosalen Flora in Assoziation mit dem NOD2/CARD15 Genotyp der MC-Patienten sowie die Translokationshäufigkeit geben kann.

Der Nachweis einer veränderten Menge verschiedener Proteine in epithelialen Zell-Zell-Kontakten zeigte eine potentielle Translokationsroute für luminale Bakterien auf. In nachfolgenden Versuchen soll untersucht werden, ob Bakterien auch transzellulär die epitheliale Barriere überwinden können. Eine funktionelle Untersuchung der die transzelluläre Permeabilität kontrollierenden Kanäle und Membranpumpen kann diese Hypothese erörtern.

Die durch MDP induzierten NOD2/CARD15- und Nalp3-vermittelten proinflammatorischen Entzündungsantworten werfen die Frage auf, ob die Effektorwirkung dieser intrazellulären PRRs auch durch andere bakterielle Komponenten induziert werden kann. Aufgrund der direkten Negativregulatorfunktion von NOD2/CARD15 auf den TLR2-vermittelten Signalweg sowie die indirekte Interaktion mit dem TLR4-Signalfad soll in Folgeexperimenten analog die Rolle des TLR5-Liganden Flagellin untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll die intrazelluläre Wirkung von Flagellin *in vitro* und analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten in intestinalem Gewebe von MC-Patienten untersucht werden. Des weiteren wäre interessant zu analysieren, ob die Effektorwirkung bakterieller Komponenten mit bestimmten Spezies assoziiert werden kann.

Nicht zuletzt wurde in dieser Arbeit ein neuer Therapieansatz für CED durch Hemmung der Enzymaktivitäten der Cathepsine B, L und D in der akuten experimentellen Colitis entwickelt. In aufbauenden Experimenten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Einzelhemmung von Cathepsin B und Cathepsin L keinen protektiven Effekt auf das Ausmaß der Darmentzündung vermittelt. In Folgeversuchen soll zunächst die Frage geklärt werden, ob der in dieser Arbeit entwickelte Therapieansatz auch im chronischen Verlauf der experimentellen Colitis einen positiven Einfluss auf das Entzündungsausmaß hat. Weiterhin soll analysiert werden, ob eine gleichzeitige Hemmung aller drei untersuchten Cathepsine eine Steigerung des Therapieerfolges erzielen kann. Final kann die Untersuchung der Konsequenz einer präventiven Cathepsin-Hemmung die destruktive Rolle dieser Proteasen in der intestinalen Entzündung beleuchten.

Kapitel 8

Literaturverzeichnis

1. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol. 1996; 4:430-5.
2. Canny G, Swidsinski A, McCormick BA. Interactions of intestinal epithelial cells with bacteria and immune cells: methods to characterize microflora and functional consequences. Methods Mol.Biol. 2006; 341:17-35.
3. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology 2004; 126:1620-33.
4. Stallmach A.und Zeitz M. Immunologie des Intestinaltraktes. In: Caspary W.F.und Stein J., ed. Darmkrankheiten. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg., 1999
5. Feldman R.A. The Comprehensive Visual Reference, Volume 2 Edn. 1992
6. Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J.Clin.Invest 2000; 105:1493-9.
7. Caspary W.F. and Strater J. Darmkrankheiten: Klinik, Diagnostik und Therapie. Springer Verlag; Berlin-Heidelberg.
8. Jewell DP. Ulcerative colitis and Crohn's disease--susceptibility genes and clinical patterns. J.Gastroenterol. 1998; 33:458-62.
9. Kornbluth A, Salomon P, and Sachar DB. Crohn's disease. in: Sleisenger MH and Fordtran JS (eds). 1270-1304. Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Philadelphia, Saunders, 1993.
10. Duchmann R. Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. 47-64. In: Magazin Forschung der Universität des Saarlandes. 1 (1999).
11. www.kompetenznetz-ced.de. 2007.
12. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 2004; 126:1504-17.
13. Hampe J, Heymann K, Kruis W, Raedler A, Folsch UR, Schreiber S. Anticipation in inflammatory bowel disease: a phenomenon caused by an accumulation of confounders. Am.J.Med.Genet. 2000; 92:178-83.
14. Heresbach D, Gulwani-Akolkar B, Lesser M *et al.* Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. Am.J.Gastroenterol. 1998; 93:2368-72.

15. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand.J.Gastroenterol.* 2000; 35:1075-81.
16. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2004; 18:525-39.
17. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996; 312:95-6.
18. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29:990-6.
19. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:738-41.
20. Binder V, Orholm M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth.J.Med.* 1996; 48:53-6.
21. Neurath MF, Schurmann G. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]. *Chirurg* 2000; 71:30-40.
22. Hampe J, Shaw SH, Saiz R *et al.* Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am.J.Hum.Genet.* 1999; 65:1647-55.
23. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat.Genet.* 2004; 36:471-5.
24. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM *et al.* Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat.Genet.* 2004; 36:476-80.
25. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J *et al.* Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett.* 1997; 419:107-11.
26. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314:1461-3.
27. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum.Mol.Genet.* 2004; 13:763-70.
28. Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2002; 8:375-81.
29. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603.
30. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-6.
31. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA *et al.* IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132:1657-64.
32. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat.Genet.* 2007; 39:207-11.
33. Fraser C, Jr., Ahmad T, Geremia A *et al.* Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2007; 13:1063-8.
34. Weylandt KH, Kang JX. Rethinking lipid mediators. *Lancet* 2005; 366:618-20.
35. Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am.J.Gastroenterol.* 2000; 95:1008-13.
36. Klein I, Reif S, Farbstein H, Halak A, Gilat T. Preillness non dietary factors and habits in inflammatory bowel disease. *Ital.J.Gastroenterol.Hepatol.* 1998; 30:247-51.

37. Russel MG, Volovics A, Schoon EJ *et al.* Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm.Bowel.Dis.* 1998; 4:182-6.
38. Leong RW, Lau JY, Sung JJ. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2004; 10:646-51.
39. Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR, Wang Z. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J.Dig.Dis.* 2005; 6:175-81.
40. Duchmann R. Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. 47-64. In: *Magazin Forschung der Universität des Saarlandes*. 1 (1999).
41. Wittig BM, Zeitz M. The gut as an organ of immunology. *Int.J.Colorectal Dis.* 2003; 18:181-7.
42. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369:1627-40.
43. Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* 2004; 53:678-84.
44. Duchmann R. Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. 47-64. In: *Magazin Forschung der Universität des Saarlandes*. 1 (1999).
45. James SP. Mucosal T-cell function. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 1991; 20:597-612.
46. Zeitz M, Schieferdecker HL, Ullrich R, Jahn HU, James SP, Riecken EO. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol.Res.* 1991; 10:199-206.
47. Corthesy B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J.Immunol.* 2007; 178:27-32.
48. Duchmann R. Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. 47-64. In: *Magazin Forschung der Universität des Saarlandes*. 1 (1999).
49. Garside P, Mowat AM. Oral tolerance. *Semin.Immunol.* 2001; 13:177-85.
50. Mowat AM. Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 1999; 15:546-56.
51. Weiner HL, Friedman A, Miller A *et al.* Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu.Rev.Immunol.* 1994; 12:809-37.
52. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89:421-5.
53. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J.Exp.Med.* 1996; 183:2605-16.
54. Furuse M, Hirase T, Itoh M *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J.Cell Biol.* 1993; 123:1777-88.
55. Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B *et al.* Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2002; 298:657-66.
56. Ghassemifar MR, Sheth B, Papenbrock T, Leese HJ, Houghton FD, Fleming TP. Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain. *J.Cell Sci.* 2002; 115:3171-80.

57. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC *et al.* Occludin is a functional component of the tight junction. *J.Cell Sci.* 1996; 109 (Pt 9):2287-98.
58. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y *et al.* Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J.Cell Biol.* 1998; 141:397-408.
59. Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J.Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 12):1879-88.
60. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J.Cell Biol.* 1996; 134:1031-49.
61. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J.Cell Biol.* 1999; 147:891-903.
62. Furuse M, Hata M, Furuse K *et al.* Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J.Cell Biol.* 2002; 156:1099-111.
63. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH *et al.* Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J.Cell Sci.* 2002; 115:4969-76.
64. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J.Clin.Invest* 2001; 107:1319-27.
65. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J.Cell Biol.* 1999; 147:1351-63.
66. Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J.Biol.Chem.* 2000; 275:27979-88.
67. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:29745-53.
68. Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J.Cell Biol.* 1997; 138:181-92.
69. Schmidt A, Utepergenov DI, Krause G, Blasig IE. Use of surface plasmon resonance for real-time analysis of the interaction of ZO-1 and occludin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2001; 288:1194-9.
70. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J.Biol.Chem.* 1999; 274:35179-85.
71. Balda MS, Matter K. Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2000; 11:281-9.
72. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J.Cell Biochem.* 1996; 61:514-23.
73. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-57.
74. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 2001;29-40.
75. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, and Brock TD. Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag. 2000.
76. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J.Nutr.* 2000; 130:396S-402S.

77. Pena JA, Versalovic J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol.* 2003; 5:277-85.
78. Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). *Gut* 2003; 52:988-97.
79. Philpott MP. Defensins and acne. *Mol.Immunol.* 2003; 40:457-62.
80. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M *et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53:1658-64.
81. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E *et al.* Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005; 102:18129-34.
82. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW. Immunology of Crohn's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1072:135-54.
83. Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2001; 7:68-77.
84. Koh IH, Liberatore AM, Menchaca-Diaz JL *et al.* Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. *Endocr.Metab Immune.Disord.Drug Targets.* 2006; 6:143-50.
85. Grimm MC, Pavli P, Van de PE, Doe WF. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin.Exp.Immunol.* 1995; 100:291-7.
86. Rogler G, Hausmann M, Vogl D *et al.* Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* 1998; 112:205-15.
87. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 122:1987-2000.
88. Mahida YR, Patel S, Gionchetti P, Vaux D, Jewell DP. Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. *Gut* 1989; 30:826-34.
89. Malizia G, Calabrese A, Cottone M *et al.* Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100:150-9.
90. Rogler G, Hausmann M, Spottl T *et al.* T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 1999; 11:1105-11.
91. Hausmann M, Spottl T, Andus T *et al.* Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* 2001; 125:48-55.
92. Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J.Dermatol.Sci.* 2004; 34:73-82.
93. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2001; 2:675-80.
94. Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 2001; 411:826-33.
95. Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ. Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J.Immunol.* 2000; 165:903-14.
96. Bourhis LL, Werts C. Role of Nods in bacterial infection. *Microbes.Infect.* 2007; 9:629-36.
97. Delbridge LM, O'Riordan MX. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr.Opin.Immunol.* 2007; 19:10-6.
98. Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J.Immunol.* 2002; 169:4088-93.

99. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3:371-82.
100. Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* 2001; 20:6473-81.
101. van der Biezen EA, Jones JD. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr.Biol.* 1998; 8:R226-R227.
102. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90:405-13.
103. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J.Biol.Chem.* 1999; 274:17941-5.
104. Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Nunez G. Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J.Biol.Chem.* 2000; 275:8461-8.
105. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2003; 4:95-104.
106. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity.* 2004; 20:319-25.
107. Lala S, Ogura Y, Osborne C *et al.* Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125:47-57.
108. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124:993-1000.
109. Ogura Y, Lala S, Xin W *et al.* Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52:1591-7.
110. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K *et al.* TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124:1001-9.
111. Stockinger S, Reutterer B, Schaljo B *et al.* IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J.Immunol.* 2004; 173:7416-25.
112. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* 2003; 5:581-92.
113. Girardin SE, Boneca IG, Viala J *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J.Biol.Chem.* 2003; 278:8869-72.
114. Gupta DK, Theisen N, von Figura K, Hasilik A. Comparison of biosynthesis and subcellular distribution of lysozyme and lysosomal enzymes in U937 monocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1985; 847:217-22.
115. Vavricka SR, Musch MW, Chang JE *et al.* hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF- κ B and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 2004; 127:1401-9.
116. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu.Rev.Biochem.* 2005; 74:355-83.
117. Inohara N, Koseki T, Lin J *et al.* An induced proximity model for NF- κ B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 2000; 275:27823-31.
118. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y *et al.* Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* 2004; 23:1587-97.

119. Albrecht M, Domingues FS, Schreiber S, Lengauer T. Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Lett.* 2003; 554:520-8.
120. Bräutigam K. Untersuchungen zu Regulation und Funktion von NOD2 in intestinalen Epithelzellen. 2005.
121. Ben Neria Y, Schmitz ML. Of mice and men. *EMBO Rep.* 2004; 5:668-73.
122. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* 1994; 12:141-79.
123. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 1998; 391:410-3.
124. Ghosh G, van Duyne G, Ghosh S, Sigler PB. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* 1995; 373:303-10.
125. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp.Hematol.* 2002; 30:285-96.
126. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18:6853-66.
127. Nenci A, Becker C, Wullaert A *et al.* Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007; 446:557-61.
128. Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death.Differ.* 2004; 11:915-23.
129. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491-501.
130. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol.Cell Biol.* 2001; 21:5299-305.
131. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997; 16:6914-25.
132. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J.Biol.Chem.* 2001; 276:4812-8.
133. Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD *et al.* RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 2002; 416:194-9.
134. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat.Immunol.* 2004; 5:800-8.
135. Maeda S, Hsu LC, Liu H *et al.* Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 2005; 307:734-8.
136. Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., and Watanabe, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat.Rev.Immunol.* 6(1), 9-20. 2006.
137. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ *et al.* Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357:1925-8.
138. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124:521-36.
139. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M *et al.* CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat.Genet.* 2001; 29:19-20.
140. Wang X, Kuivaniemi H, Bonavita G *et al.* CARD15 mutations in familial granulomatosis syndromes: a study of the original Blau syndrome kindred and other families with large-vessel arteritis and cranial neuropathy. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:3041-5.

141. Manji GA, Wang L, Geddes BJ *et al.* PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J.Biol.Chem.* 2002; 277:11570-5.
142. Dowds TA, Masumoto J, Chen FF, Ogura Y, Inohara N, Nunez G. Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2003; 302:575-80.
143. O'Connor W, Jr., Harton JA, Zhu X, Linhoff MW, Ting JP. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J.Immunol.* 2003; 171:6329-33.
144. Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J.Immunol.* 2003; 171:6154-63.
145. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat.Genet.* 2001; 29:301-5.
146. Neven B, Callebaut I, Prieur AM *et al.* Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* 2004; 103:2809-15.
147. Hugot JP. PPAR and Crohn's disease: another piece of the puzzle? *Gastroenterology* 2005; 128:500-3.
148. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3:521-33.
149. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu.Rev.Immunol.* 2002; 20:495-549.
150. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO *et al.* Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J.Clin.Invest* 2004; 113:1296-306.
151. Strober W, Fuss I, Boirivant M, Kitani A. Insights into the mechanism of oral tolerance derived from the study of models of mucosal inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2004; 1029:115-31.
152. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J.Clin.Invest* 2007; 117:514-21.
153. Jedinak A, Malnar T. Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma* 2005; 52:185-92.
154. Ishibashi O, Mori Y, Kurokawa T, Kumegawa M. Breast cancer cells express cathepsins B and L but not cathepsins K or H. *Cancer Biochem.Biophys.* 1999; 17:69-78.
155. Kakegawa H, Nikawa T, Tagami K *et al.* Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett.* 1993; 321:247-50.
156. Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D *et al.* Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett.* 2006; 237:167-79.
157. Sinha AA, Quast BJ, Wilson MJ *et al.* Prediction of pelvic lymph node metastasis by the ratio of cathepsin B to stefin A in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 94:3141-9.
158. Eijan AM, Sandes EO, Riveros MD *et al.* High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer* 2003; 98:262-8.
159. Werle B, Kraft C, Lah TT *et al.* Cathepsin B in infiltrated lymph nodes is of prognostic significance for patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2000; 89:2282-91.
160. Guzinska-Ustymowicz K. MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). *Anticancer Res.* 2006; 26:1589-94.
161. Sebzda T, Saleh Y, Gburek J *et al.* Cathepsin D expression in human colorectal cancer: relationship with tumour type and tissue differentiation grade. *J.Exp.Ther.Oncol.* 2005; 5:145-50.

162. Deaton DN, Tavares FX. Design of cathepsin K inhibitors for osteoporosis. *Curr.Top.Med.Chem.* 2005; 5:1639-75.
163. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2007; 19:289-95.
164. Adeyemi EO, Neumann S, Chadwick VS, Hodgson HJ, Pepys MB. Circulating human leucocyte elastase in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1985; 26:1306-11.
165. Andus T, Gross V, Caesar I *et al.* PMN-elastase in assessment of patients with inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci.* 1993; 38:1638-44.
166. Pender SL, Li CK, Sabatino AD, MacDonald TT, Buckley MG. Role of macrophage metalloelastase in gut inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1072:386-8.
167. Rath T, Roderfeld M, Graf J *et al.* Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm.Bowel.Dis.* 2006; 12:1025-35.
168. Stumpf M, Cao W, Klinge U *et al.* Reduced expression of collagen type I and increased expression of matrix metalloproteinases 1 in patients with Crohn's disease. *J.Invest Surg.* 2005; 18:33-8.
169. Popadiuk S, Renke J, Glen J *et al.* [Tryptase activity in colon mucosal samples of children with inflammatory bowel disease]. *Med.Wieku.Rozwoj.* 2006; 10:437-43.
170. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu.Rev.Physiol* 1997; 59:63-88.
171. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H *et al.* Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J.Clin.Invest* 2000; 106:1127-37.
172. Yamaguchi N, Chung SM, Shiroeda O, Koyama K, Imanishi J. Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. *Cancer Res.* 1990; 50:658-63.
173. Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ, Chapman HA. Elastolytic activity of human cathepsin L. *Biochem.J.* 1986; 233:925-7.
174. Nakagawa TY, Rudensky AY. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol.Rev.* 1999; 172:121-9.
175. Frohlich E, Schlagenhauff B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2001; 91:972-82.
176. Briozzo P, Badet J, Capony F *et al.* MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. *Exp.Cell Res.* 1991; 194:252-9.
177. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol.* 1992; 31:125-30.
178. Galandiuk S, Miseljic S, Yang AR, Early M, McCoy MD, Wittliff JL. Expression of hormone receptors, cathepsin D, and HER-2/neu oncoprotein in normal colon and colonic disease. *Arch.Surg.* 1993; 128:637-42.
179. Saftig P, Hetman M, Schmahl W *et al.* Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J.* 1995; 14:3599-608.
180. Hausmann M, Obermeier F, Schreiter K *et al.* Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* 2004; 136:157-67.
181. West GA, Matsuura T, Levine AD, Klein JS, Fiocchi C. Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* 1996; 110:1683-95.

182. Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J.Gastroenterol.* 1995; 30 Suppl 8:56-60.
183. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut* 1991; 32:1531-4.
184. Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102:514-9.
185. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.Immunol.* 1991; 147:3815-22.
186. Steidler L, Hans W, Schotte L *et al.* Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289:1352-5.
187. Chanock SJ, el Benna J, Smith RM, Babior BM. The respiratory burst oxidase. *J.Biol.Chem.* 1994; 269:24519-22.
188. Nauseef WM, Volpp BD, Clark RA. Immunochemical and electrophoretic analyses of phosphorylated native and recombinant neutrophil oxidase component p47-phox. *Blood* 1990; 76:2622-9.
189. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006; 26:1175-86.
190. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2002; 283:G256-G265.
191. Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48:132-5.
192. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am.J.Gastroenterol.* 1997; 92:5S-11S.
193. Li J, Moran T, Swanson E *et al.* Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum.Mol.Genet.* 2004; 13:1715-25.
194. Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1072:9-18.
195. Weichert D, Gobom J, Klopffleisch S *et al.* Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells. *J.Biol.Chem.* 2006; 281:2380-9.
196. Christoph Zeitler. Regulation der MIP-3 alpha Induktion durch NOD2/CARD15 in intestinalen Makrophagen. 6-9-2007. 32764.
197. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig.Dis.Sci.* 2007; 52:2015-21.
198. Henderson LM, Chappel JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim.Biophys.Acta* 1996; 1273:87-107.
199. Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM *et al.* Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J.Pathol.* 1998; 186:416-21.
200. Kraus TA, Mayer L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2005; 21:692-6.
201. Spottl T, Hausmann M, Kreutz M *et al.* Monocyte differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells. *J.Leukoc.Biol.* 2001; 70:241-51.
202. Gaudio E, Taddei G, Vetusch A *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig.Dis.Sci.* 1999; 44:1458-75.
203. Leto G, Tumminello FM, Gebbia N, Rausa L. Kinetics of in vivo inhibition of tissue cathepsin D by pepstatin A. *Int.J.Biochem.* 1988; 20:917-20.
204. Luhr KM, Nordstrom EK, Low P, Kristensson K. Cathepsin B and L are involved in degradation of prions in GT1-1 neuronal cells. *Neuroreport* 2004; 15:1663-7.

205. Lynas JF, Hawthorne SJ, Walker B. Development of peptidyl alpha-keto-beta-aldehydes as new inhibitors of cathepsin L--comparisons of potency and selectivity profiles with cathepsin B. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2000; 10:1771-3.
206. Woo JT, Yamaguchi K, Hayama T *et al.* Suppressive effect of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-tyrosinal on bone resorption in vitro and in vivo. *Eur.J.Pharmacol.* 1996; 300:131-5.
207. Holtje JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 1998; 62:181-203.
208. DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J.Clin.Gastroenterol.* 2002; 34:385-96.
209. Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2003; 17:397-425.
210. Neut C, Bulois P, Desreumaux P *et al.* Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am.J.Gastroenterol.* 2002; 97:939-46.
211. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837-48.
212. Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, Hudspith BN, Brostoff J. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2005; 11:481-7.
213. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:44-54.
214. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand.J.Gastroenterol.* 2002; 37:1034-41.
215. Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999; 117:1089-97.
216. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad.Med.J.* 2000; 76:473-8.
217. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J *et al.* Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999; 353:459-61.
218. Bruewer M, Samarin S, Nusrat A. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1072:242-52.
219. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2007; 23:379-83.
220. Dhawan P, Singh AB, Deane NG *et al.* Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J.Clin.Invest* 2005; 115:1765-76.
221. Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002; 123:433-43.
222. Ichiyasu H, McCormack JM, McCarthy KM, Dombkowski D, Preffer FI, Schneeberger EE. Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2004; 30:761-70.
223. Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y *et al.* Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J.Biol.Chem.* 2001; 276:28204-11.
224. Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J *et al.* Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim.Biophys.Acta* 2005; 1669:34-42.
225. Medina R, Rahner C, Mitic LL, Anderson JM, Van Itallie CM. Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J.Membr.Biol.* 2000; 178:235-47.

226. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J.Cell Sci.* 1997; 110 (Pt 9):1113-21.
227. Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J.Cell Biol.* 1997; 136:399-409.
228. Furuse M, Itoh M, Hirase T *et al.* Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J.Cell Biol.* 1994; 127:1617-26.
229. Cario E, Podolsky DK. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Mol.Immunol.* 2005; 42:887-93.
230. Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 1993; 105:1689-97.
231. Jung HC, Eckmann L, Yang SK *et al.* A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J.Clin.Invest* 1995; 95:55-65.
232. Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Truong F, Eckmann L, Kagnoff MF. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J.Immunol.* 1999; 163:1457-66.
233. Rogler G, Brand K, Vogl D *et al.* Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115:357-69.
234. Lesage S, Zouali H, Cezard JP *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am.J.Hum.Genet.* 2002; 70:845-57.
235. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat.Immunol.* 2006; 7:1250-7.
236. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect.Immun.* 2000; 68:7010-7.
237. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J.Immunol.* 2005; 174:4453-60.
238. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 2001; 167:1609-16.
239. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ *et al.* NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur.J.Immunol.* 2004; 34:2052-9.
240. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307:731-4.
241. Fantone JC, Ward PA. Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease. *Hum.Pathol.* 1985; 16:973-8.
242. Inayama M, Hashimoto N, Tokoro T, Shiozaki H. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2007; 54:761-5.
243. Pervaiz S, Clement MV. Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2007; 39:1297-304.
244. Yamada T, Grisham MB. Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin.Wochenschr.* 1991; 69:988-94.
245. Bulger EM, Helton WS. Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 1998; 27:403-19.
246. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP *et al.* Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci.* 1996; 41:2078-86.

247. Mandal D, Lahiry L, Bhattacharyya A *et al.* Black tea protects thymocytes in tumor-bearing animals by differential regulation of intracellular ROS in tumor cells and thymocytes. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2005; 24:91-104.
248. Williams HC, Griendling KK. NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2007; 50:9-16.
249. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52:1-8.
250. Welsh MJ, Shasby DM, Husted RM. Oxidants increase paracellular permeability in a cultured epithelial cell line. *J. Clin. Invest* 1985; 76:1155-68.
251. Wilson J, Winter M, Shasby DM. Oxidants, ATP depletion, and endothelial permeability to macromolecules. *Blood* 1990; 76:2578-82.
252. Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 1997; 322 (Pt 3):681-92.
253. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004; 55:373-99.
254. Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol. Cells* 2007; 23:1-10.
255. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H *et al.* Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J. Histochem. Cytochem.* 2007; 55:443-52.
256. Bertin J, DiStefano PS. The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death. Differ.* 2000; 7:1273-4.
257. Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr. Biol.* 2001; 11:R118-R120.
258. Anderson JP, Mueller JL, Rosengren S *et al.* Structural, expression, and evolutionary analysis of mouse CIAS1. *Gene* 2004; 338:25-34.
259. Göke M.N. Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. 18, 302-307. 2002. *Chirurgische Gastroenterologie*.
260. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002; 359:62-9.
261. Dwinell MB, Luger N, Eckmann L, Kagnoff MF. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2001; 120:49-59.
262. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C451-C462.
263. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Nunez G. Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 82:220-5.
264. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A *et al.* Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:36560-8.
265. Mariathasan S, Newton K, Monack DM *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004; 430:213-8.
266. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M *et al.* Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. 2006; 24:317-27.
267. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440:237-41.

268. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* 2006; 126:659-62.
269. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat.Rev.Immunol.* 2007; 7:179-90.
270. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96:10964-7.
271. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T *et al.* Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J.Immunol.* 1999; 163:143-7.
272. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M *et al.* IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J.Immunol.* 1999; 162:6829-35.
273. Furuya D, Yagihashi A, Komatsu M *et al.* Serum interleukin-18 concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *J.Immunother.*(1997.) 2002; 25 Suppl 1:S65-S67.
274. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A *et al.* Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001; 121:875-88.
275. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F *et al.* Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 2001; 281:R1264-R1273.
276. Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S *et al.* Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* 2002; 50:812-20.
277. Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H *et al.* Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* 2001; 121:1372-9.
278. Wirtz S, Becker C, Blumberg R, Galle PR, Neurath MF. Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J.Immunol.* 2002; 168:411-20.
279. Burns K, Martinon F, Tschopp J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr.Opin.Immunol.* 2003; 15:26-30.
280. Dinarello CA. Unraveling the NALP-3/IL-1beta inflammasome: a big lesson from a small mutation. *Immunity.* 2004; 20:243-4.
281. Mariathasan S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes.Infect.* 2007; 9:664-71.
282. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; 88:8485-9.
283. Di Virgilio F, Baricordi OR, Romagnoli R, Baraldi PG. Leukocyte P2 receptors: a novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. *Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.* 2005; 5:85-99.
284. Lich JD, Arthur JC, Ting JP. Cryopyrin: in from the cold. *Immunity.* 2006; 24:241-3.
285. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* 2001; 15:825-35.
286. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J.Biol.Chem.* 2007; 282:2871-9.
287. Musil D, Zucic D, Turk D *et al.* The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 1991; 10:2321-30.
288. Gerber A, Welte T, Ansorge S, Buhling F. Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2000; 477:287-92.

289. Schraufstatter IU, Trieu K, Zhao M, Rose DM, Terkeltaub RA, Burger M. IL-8-mediated cell migration in endothelial cells depends on cathepsin B activity and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J.Immunol.* 2003; 171:6714-22.
290. Duffy MJ. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin.Cancer Res.* 1996; 2:613-8.
291. Bryant PW, Lennon-Dumenil AM, Fiebiger E, Lagaudriere-Gesbert C, Ploegh HL. Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Adv.Immunol.* 2002; 80:71-114.
292. Lennon-Dumenil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudriere-Gesbert C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 2002; 14:15-21.
293. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem.J.* 1992; 282 (Pt 1):273-8.
294. Ishidoh K, Kominami E. Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995; 217:624-31.
295. Mai J, Sameni M, Mikkelsen T, Sloane BF. Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas. *Biol.Chem.* 2002; 383:1407-13.
296. Behrendt N. The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol.Chem.* 2004; 385:103-36.
297. Curino AC, Engelholm LH, Yamada SS *et al.* Intracellular collagen degradation mediated by uPARAP/Endo180 is a major pathway of extracellular matrix turnover during malignancy. *J.Cell Biol.* 2005; 169:977-85.
298. Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile.* 1995; 2:1581-643.
299. Beers C, Honey K, Fink S, Forbush K, Rudensky A. Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. *J.Exp.Med.* 2003; 197:169-79.
300. Kaneko M, Tomita T, Nakase T *et al.* Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.(Oxford)* 2001; 40:247-55.
301. Shapiro SD, Campbell EJ, Welgus HG, Senior RM. Elastin degradation by mononuclear phagocytes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1991; 624:69-80.
302. Koslowski R, Knoch KP, Wenzel KW. Proteinases and proteinase inhibitors during the development of pulmonary fibrosis in rat. *Clin.Chim.Acta* 1998; 271:45-56.
303. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702.
304. Berquin IM, Cao L, Fong D, Sloane BF. Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene* 1995; 159:143-9.
305. Seth P, Mahajan VS, Chauhan SS. Transcription of human cathepsin L mRNA species hCATL B from a novel alternative promoter in the first intron of its gene. *Gene* 2003; 321:83-91.
306. Arora S, Chauhan SS. Identification and characterization of a novel human cathepsin L splice variant. *Gene* 2002; 293:123-31.
307. Yan S, Sloane BF. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol.Chem.* 2003; 384:845-54.
308. Gong Q, Chan SJ, Bajkowski AS, Steiner DF, Frankfater A. Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol.* 1993; 12:299-309.
309. Zwicky R, Muntener K, Csucs G, Goldring MB, Baici A. Exploring the role of 5' alternative splicing and of the 3'-untranslated region of cathepsin B mRNA. *Biol.Chem.* 2003; 384:1007-18.

310. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2006; 6:764-75.
311. Kagedal K, Johansson U, Ollinger K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* 2001; 15:1592-4.

Kapitel 9

Anhang

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Publikationen sind im Folgenden aufgelistet.

Posterbeiträge

1. **K. Menzel**, M. Hausmann, K. Schreiter, T. Spoettl, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth, G. Rogler. Regulation of cathepsin B and L in intestinal macrophages. 4th *European Mucosal Immunology Group Meeting (EMIG)*. Lyon, Frankreich (10/2004).
2. **K. Menzel**, M. Hausmann, K. Schreiter, F. Obermeier, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth, G. Rogler. Prevention of tissue destruction as new therapeutic target in IBD - effects of cathepsin inhibitors. *Digestive Disease Week (DDW) / American Gastroenterological Association (AGA)*. Chicago, USA (05/2005).
3. **K. Menzel**, M. Hausmann, K. Schreiter, F. Obermeier, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth, G. Rogler. Prävention der Gewebszerstörung als neues therapeutisches Ziel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen – Effekte von Cathepsin-Inhibitoren. *60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)*. Köln (09/2005).
4. **K. Menzel**, M. Hausmann, K. Schreiter, F. Obermeier, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth, G. Rogler. Prävention der Gewebszerstörung als neues therapeutisches Ziel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen – Effekte von Cathepsin-Inhibitoren. *33. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V.* Amberg (10/2005).

5. **K. Menzel**, M. Hausmann, K. Schreiter, F. Obermeier, W. Falk, J. Schölmerich, H. Herfarth, G. Rogler. Protektive Effekte des potenten Cathepsin D Inhibitors Pepstatin A in der experimentellen Colitis. *61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)*. Hannover (09/2006).
6. **K. Menzel**, C. Zeitler, M. Hausmann, W. Falk, J. Schölmerich, P. Rosenstiel, S. Schreiber, G. Rogler. MDP-Stimulation induziert die Expression von Cathepsin B und L *in vitro*. *61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)*. Hannover (09/2006).
7. **K. Menzel**, M. Hausmann, K. Schreiter, F. Obermeier, W. Falk, J. Schölmerich, H. Herfarth, G. Rogler. Protektive Effekte des potenten Cathepsin D Inhibitors Pepstatin A in der experimentellen Colitis. *34. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V.* Rosenheim (10/2006).
8. **K. Menzel**, C. Zeitler, M. Hausmann, W. Falk, J. Schölmerich, P. Rosenstiel, S. Schreiber, G. Rogler. MDP-Stimulation induziert die Expression von Cathepsin B und L *in vitro*. *34. Kongress der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V.* Rosenheim (10/2006).
9. **K. Menzel**, J. Brenmoehl, D. Vogl, W. Falk, J. Schölmerich, G. Rogler. Einfluss des NOD2/CARD15 Genotyps auf die NF-kappaB Aktivierung bei Morbus Crohn. *113. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM)*. Wiesbaden (04/2007).
10. **K. Menzel**, J. Brenmoehl, D. Vogl, W. Falk, J. Schölmerich, F. Obermeier, G. Rogler. Influence of NOD2/CARD15 genotype on NF-kappaB activation in Crohn's Disease. Digestive Disease Week (DDW) / American Gastroenterological Association (AGA). Washington DC, USA (05/2007).

Originalarbeiten

1. **K. Menzel**, M. Hausmann, F. Obermeier, K. Schreiter, N. Dunger, F. Bataille, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth and G. Rogler. Cathepsins B, L and D in inflammatory bowel disease macrophages and potential therapeutic effects of cathepsin inhibition *in vivo*. *Clinical Experimental Immunology*, 2006; 146: 169-180.
2. **K. Menzel**, Abb. 4.5 B (KO, beta-Catenin) der Dissertation als Titelbild in *Clinical Experimental Immunology*, 2007; 148(1).
3. **K. Menzel**, Titelbild in *Clinal Experimental Immunology*, 2007; 149(1).

4. **K. Menzel**, Abb. 4.5 A (MC, Claudin-2) der Dissertation als Titelbild in Clinal Experimental Immunology, 2007; 150(1).
5. M. Hausmann, F. Obermeier, D.H. Paper, K. Balan, N. Dunger, **K. Menzel**, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth and G. Rogler. *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. Clinical Experimental Immunology, 2007; 148(2): 373-81.
6. Spoettl T, Hausmann M, **Menzel K**, Piberger H, Herfarth H, Schoelmerich J, Bataille F and Rogler G. Role of soluble factors and three-dimensional culture in *in vitro* differentiation of intestinal macrophages. World J Gastroenterol, 2007; 13(7): 1032-41.
7. R. Altmann, M. Hausmann, T. Spoettl, M. Gruber, A.W. Bull, **K. Menzel**, D. Vogl, H. Herfarth, J. Scholmerich, W. Falk and G. Rogler. 13-Oxo-ODE is an Endogenous Ligand for PPAR γ in Human Colonic Epithelial Cells. Biochem Pharmacol, 2007; 74(4): 612-22.

Originalarbeiten in Vorbereitung

1. **K. Menzel**, J. Brenmoehl, M. Gunckel, C. Zeitler, F. Obermeier, M. Hausmann, W. Falk, J. Scholmerich and G. Rogler. Increased Nalp3 levels in patients with Crohn's Disease – a controversy between intestinal epithelial cells and intestinal macrophages. *In Vorbereitung*.
2. M. Hausmann, G. Paul, S. Kellermeier, **K. Menzel**, J. Scholmerich, W. Falk, H. Herfarth and G. Rogler. (GT) $_n$ Dinucleotide repeat polymorphism of the heme oxygenase-1 promoter region does not predict incidence of IBD. *In Vorbereitung*.
3. M. Hausmann, G. Paul, **K. Menzel**, R. Brunner-Ploss, W. Falk, J. Scholmerich, H. Herfarth and G. Rogler. NAT1 genotypes do not predict response to mesalamine in patients with ulcerative colitis. *Eingereicht bei "Zeitschrift für Gastroenterologie"*

Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innerer Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Martin für die so unkomplizierte universitätsinterne Betreuung dieser Arbeit sowie sein Interesse am Fortgang der Experimente bedanken.

Zu sehr großem Dank bin ich meinen fachlichen Betreuern, Herrn Prof. Dr. Werner Falk und Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler verpflichtet. Ohne ihre Unterstützung, gerade in der schwierigen Anfangsphase, wäre diese Dissertation niemals möglich gewesen. Ihre engagierte fachliche Hilfsbereitschaft und stets offene Tür bei jeglichen noch so kleinen Fragen und Problemen sowie die Möglichkeit, eigene Ideen in der Projektplanung verwirklichen zu können, waren für die Erstellung dieser Arbeit von überaus großer Bedeutung. In den letzten Wochen trugen vor allem die wertvollen Anregungen und Hinweise beim Rekordzeit-Korrekturlesen sehr zum Gelingen dieser Dissertation bei. Vielen Dank!

Ein riesengroßes Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Dr. Ernst Holler aus der Hämatologie/Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg für die nicht selbstverständliche Finanzierung der Endspurtphase meiner Dissertation sowie seine Geduld und den überaus großen Freiraum in der Durchführung von Experimenten, vor allem in der Schreibphase meiner Dissertation, aussprechen.

Bei allen ArbeitskollegInnen aus dem Forschungsbau H1 möchte ich mich für die nette und produktive Zusammenarbeit bedanken. Ein ganz herzliches Dankeschön geht dabei vor allem an meine Kollegen aus der AG Rogler. Trotz mancher platzknappen Perioden im R66 hat die (meistens ;-)) freundschaftliche Atmosphäre über so manchen Fehlversuch

und wundersam dauerleere Pufferflasche hinweggeholfen. Auch Eure Unterstützung beim Biopsien und Zellen holen haben mir gerade in der Schreibphase sehr geholfen – vielen Dank! Dr. Claudia Hofmann danke ich für das genaue Korrekturlesen (inkl. Bindestrich-Einfügen ;-)) meiner Arbeit sowie unsere gemeinsamen Kondi-Stunden, die so manchen Frusttag kompensiert haben. Dr. Katja Schreiter, Manuela Stieber-Gunckel, Dr. Julia Brenmoehl und Dr. Elisabeth Schnoy danke ich für die sowohl fachlich als auch kulinarisch schöne Zeit im Labor und darüber hinaus. Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Maus-Mädels Nadja und Nicole – ohne Euch hätten die Mäuse und ich noch mehr gelitten. Dr. Martin Hausmann danke ich für die vielen Tipps gerade am Anfang der Arbeit sowie Daniela Vogl für den stetigen HEK293T-Nachschub sowie ihre schnelle Hilfe bei jeglichen Problemen – dieses Luminometer war wirklich nicht intuitiv bedienbar.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern aus der Chirurgie und Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die Bereitstellung von primärem Darmgewebe.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung mein Biologiestudium nicht möglich und diese Arbeit nicht entstanden wäre. Ihre Aufmunterungen, ihr ständiges Interesse sowie Verständnis für die gerade in letzter Zeit seltenen Besuche haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein allergrößtes Dankeschön gilt Denijal – danke für einfach alles, was Du für mich tust und getan hast.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 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.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 04.10.2007

(Katrin Menzel)

