

***Intrazelluläre Transportprozesse
von Gliadin in Enterozyten
und deren Modulation durch Zöliakieserum***

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

vorgelegt von Nico Lübbling
aus Herford

Gießen, 2011

Aus dem medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Abteilung für Allgemeinpädiatrie und Neonatologie

Direktor: Prof. Dr.med. K.-P. Zimmer

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

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

Gutachter: Prof. Dr. med. E. Roeb

Tag der Disputation: 25.01.2012

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zöliakie	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Historie der Zöliakie	1
1.1.3	Epidemiologie	2
1.1.4	Symptomatologie & Assoziierte Erkrankungen	4
1.1.5	Ätiologie und aktuelles Pathogenesemodell	7
1.1.6	Diagnostik	13
1.1.7	Therapie	15
1.2	Endozytose & weitere Transportvorgänge	17
1.2.1	Transmembrantransport	17
1.2.2	Transport mit Membranverlagerung	18
1.2.3	Endozytotische Vesikel	19
1.3	Präsentation von Antigenen	21
1.3.1	Antigenpräsentierung über MHC Klasse I	22
1.3.2	Antigenpräsentierung über MHC Klasse II	22
1.3.3	Kreuzpräsentierung	23
1.4	Immunglobulin Klasse A	24
1.5	Gewebs-Transglutaminase	25
1.6	Problem- und Fragestellung	27
2	Material und Methoden	30
2.1	Studiendesign	30
2.2	Kollektiv	30
2.3	Chemikalienauflistung	31
2.4	Slot-Blot-Verfahren	32
2.4.1	Methodenbeschreibung des Slot-Blot-Verfahrens	32
2.4.2	Material für die Versuchsdurchführung	32
2.4.3	Versuchsdurchführung des Slot-Blot-Verfahrens	34
2.4.4	Versuchsauswertung des Slot-Blot-Verfahrens	35
2.5	Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie	35
2.5.1	Methodenbeschreibung des Kryoimmunogold-Labeling	35
2.5.2	Material für die Biopsiegewinnung/-verarbeitung	36
2.5.3	Material für die Versuchsdurchführung	37

2.5.4	Material für die Versuchsauswertung.....	38
2.5.5	Biopsieverarbeitung	39
2.5.6	Herstellung der Semi- und Ultradünnschnitte	39
2.5.7	Versuchsdurchführung des Kryoimmunogold-Labeling.....	40
2.5.8	Versuchsauswertung der Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie	41
2.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	43
2.6.1	Methodenbeschreibung der Immunfluoreszenzmikroskopie	43
2.6.2	Material für die Zellkulturrpfege	43
2.6.3	Material für die Versuchsdurchführung.....	44
2.6.4	Material für die Versuchsauswertung.....	45
2.6.5	Verwendete Zelllinie.....	45
2.6.6	Pflege der Zellkultur	46
2.6.7	Zellzahlbestimmung.....	47
2.6.8	Versuchsdurchführung der Immunfluoreszenzexperimente	47
2.6.9	Versuchsauswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie	49
2.7	Statistik	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Slot-Blot.....	51
3.2	Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie.....	51
3.2.1	Gliadin in frühen Endosomen	53
3.2.2	Gliadin in späten Endosomen	54
3.2.3	Gliadin in anderen Zellkompartimenten.....	56
3.3	Immunfluoreszenzmikroskopie	58
3.3.1	Aufnahme von Gliadinpeptiden durch intestinale Zelllinien	58
3.3.2	Effekt einer Inkubation mit Kontrollserum	60
3.3.3	Intrazellulärer Transport von Gliadinpeptiden	60
4	Diskussion	68
4.1	Diskussion der Methodik	68
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	69
4.2.1	Slot-Blot.....	69
4.2.2	Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie	70
4.2.3	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	74
4.3	Die Ergebnisse im Kontext anderer Studien.....	77
4.3.1	Protektiver Effekt der Muttermilch.....	77

4.3.2	Gliadinlokalisationen innerhalb der Enterozyten.....	78
4.3.3	Modifikation intrazellulärer Transportprozesse	81
4.3.4	Antigenpräsentierende Funktion von Enterozyten	82
4.3.5	Orale Toleranz	83
4.4	Ausblick.....	86
4.5	Schlussfolgerung und Perspektiven	87
5	Zusammenfassung	89
6	Summary	90
7	Literaturverzeichnis	91
7.1	Publikationen.....	91
7.2	Andere Printmedien	105
8	Anhang.....	106
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	106
8.2	Tabellenverzeichnis.....	108
8.3	Veröffentlichungen.....	109
8.4	Danksagung.....	111

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AK	Antikörper
AM	Apikale Membran
APC	antigenpräsentierende Zellen
BL	Basolaterale Membran
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CS	Coverslip
CTB	Choleratoxin-Untereinheit B
Cyt	Zytosol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dizygote Zwillinge
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell Lymphom
EE	Frühes Endosom
EEA	Early Endosome Antigen
EM	Elektronenmikroskop(-ie)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EV	Endozytische Vesikel
FF	Frazers Fraction
FKS	Fetales Kälberserum
GALT	Darmassoziierte-Lymphatische-Gewebe
Go	Golgi-Apparat
HLA	Humanes-Leukozyten Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IF	Immunfluoreszenzmikroskop(-ie)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAMP	Lysosomal Associated Membrane Proteine
LE	Spätes Endosom
Lsg	Lösung
LY	Lysosom
MeOH	Methanol
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
Mi	Mitochondrien
MICA	MHC Klasse I Polypeptid-verwandte Kette A
MZ	Monozygote Zwillinge

n.s.	Nicht signifikant
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2 Mitglied D
OT	Objektträger
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PFA	Paraformaldehyd
ppm	Parts per million
PTC	Pepsin-Trypsin-Chymotrypsin
PTG	Pepsin-Trypsin-Gliadin
RT	Raumtemperatur
sIgA	Sekretorisches Immunglobulin-A
TAP	Transporter associated with antigen presentation
tTG	Gewebstransglutaminase 2/tissue Transglutaminase 2
U/min	Umdrehungen pro Minute
ZK	Zellkern

1 Einleitung

1.1 Zöliakie

1.1.1 Definition

Die Zöliakie gehört zu der Gruppe der Nahrungsmittelunverträglichkeiten. Getriggert wird die Erkrankung durch die Ingestion der alkohollöslichen Fraktion der Speicherproteine diverser Getreidesorten, wie zum Beispiel von Weizen (Gluten), Roggen, Gerste oder Hafer. Gegenüber diesen Nährstoffen liegt ein Versagen der physiologischen oralen Toleranz bei genetisch prädisponierten Individuen vor.

Die Gluteningestion führt zu einem histomorphologisch charakteristischen Dünndarmmukosaschaden mit Kryptenhyperplasie, Zottenatrophie und vermehrtem Vorkommen der intraepithelialen Lymphozyten. Die Symptome, die in jeder Altersklasse erstmalig auftreten können, manifestieren sich in verschiedenen Organsystemen und sind beispielsweise die Folge einer Malabsorption oder von zirkulierenden IgA-Komplexen. Entgegen der ursprünglichen Definition handelt es sich nicht um eine reine Enteropathie, sondern um eine multisystemische entzündliche Erkrankung.

Neben der symptomatischen Therapie ist bisher nur die konsequente, lebenslange glutenfreie Diät wirkungsvoll [Catassi and Fasano 2008, Troncone, Ivarsson, Szajewska and Mearin 2008].

1.1.2 Historie der Zöliakie

Bereits im ersten und zweiten Jahrhundert nach Christus erfolgte die erste, auf die Zöliakie zurückzuführende Beschreibung durch den griechischen Arzt Aretaios von Kappadokien [Losowsky 2008]. Der Londoner Kinderarzt Samuel Jones Gee formulierte im Jahr 1887 die erste vollständige Krankheitsbeschreibung. Obwohl die Auslöser und die Pathogenese der Zöliakie damals noch unbekannt waren, lieferte er den alleinigen, bis heute gültigen Therapieansatz: „If the patient can be cured at all, it must be by means of diet“. Allerdings empfahl er, Reis, Früchte und Gemüse zu meiden und stattdessen die Ernährung auf rohes Fleisch und getoastetes Brot zu

fokussieren [Gee 1888]. Heute ist bekannt, dass das Gegenteil die Therapie der Wahl gewesen wäre.

Den auslösenden Faktor für die Zöliakie fand Willem-Karel Dicke in seiner Promotionsarbeit 1950 an der Universität Utrecht. Er wies nach, dass sich das Allgemeinbefinden der Patienten entschieden verbessern lässt und es zu einem Symptomrückgang kommt, wenn Weizen, Roggen Gerste und Hafer konsequent aus der Ernährung ausgeschlossen werden. Kurze Zeit später konnte diese Beobachtung experimentell bestätigt werden [Dicke, Weiljers and van de Kramer 1953]. Der Zusammenhang zwischen Getreide und der Zöliakie war Dicke aufgefallen, als er in Kriegszeiten Kinder beobachtet hatte, die je nach Verfügbarkeit Mahlzeiten mit oder auch ohne Weizen zu essen bekamen.

1.1.3 Epidemiologie

Die Prävalenz der Zöliakie wird in der Literatur in einer weiten Spanne angegeben. Diese Diskrepanz ist auf stetig verbesserte Diagnosemöglichkeiten zurückzuführen, sodass früher unerkannte Fälle in neuere Berechnungen mit einbezogen werden können. In aktuellen Screeninguntersuchungen werden serologische und histologische Untersuchungen durchgeführt, um die Diagnose zu sichern. So werden zum Beispiel in Mitteleuropa und Nordamerika Prävalenzen von knapp 1 % angegeben [Fasano, Berti, Gerarduzzi, Not, Colletti, Drago, Elitsur, Green, Guandalini, Hill, Pietzak, Ventura, Thorpe, Kryszak, Fornaroli, Wasserman, Murray and Horvath 2003, Maki, Mustalahti, Kokkonen, Kulmala, Haapalahti, Karttunen, Ilonen, Laurila, Dahlbom, Hansson, Hopfl and Knip 2003, Stepniak and Koning 2006]. Die Häufigkeit der Zöliakie ist regional sehr unterschiedlich. Sie liegt zum Beispiel in Italien und Finnland verhältnismäßig hoch. Dies wird sowohl durch die Umweltfaktoren als auch durch die Anhäufung der genetischen Faktoren begründet.

Die Verwandten von Zöliakiepatienten sind wesentlich häufiger als die Normalbevölkerung von der Zöliakie betroffen. Je enger der Verwandtschaftsgrad ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Zöliakie: Die Prävalenz liegt bei 4,5 % bei erstgradig Verwandten und 3,3 % bei zweitgradig Verwandten [Fasano *et al.* 2003]. Zwillingsstudien bieten die Möglichkeit, anhand der Konkordanzraten von

monozygoten (MZ) im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (DZ) die genetische Komponente abzuschätzen. Aus dem Vergleich der Konkordanzraten von DZ und gewöhnlichen Geschwistern lässt sich der Einfluss der Umweltfaktoren ableiten [MacGregor, Snieder, Schork and Spector 2000]. Im Fall der Zöliakie beträgt die Konkordanz von MZ 75 % und von DZ 11 %, was für eine wesentliche Beteiligung der genetischen Faktoren spricht. Als Indiz für die geringe Bedeutung der gemeinsamen Umgebung liegt im Vergleich die Konkordanzrate bei gewöhnlichen Geschwistern mit 11,1 % fast exakt auf dem Niveau bei DZ [Greco, Romino, Coto, Di Cosmo, Percopo, Maglio, Paparo, Gasperi, Limongelli, Cotichini, D'Agate, Tinto, Sacchetti, Tosi and Stazi 2002].

Heute gilt die Zöliakie als unterdiagnostiziert. Im Durchschnitt wird die Diagnose bei Erwachsenen erst elf Jahre nach Symptombeginn gestellt [Green, Stavropoulos, Panagi, Goldstein, McMahon, Absan and Neugut 2001]. Nur ein geringer Anteil der Erkrankten weist typische Symptome auf. Viele Patienten sind asymptomatisch oder die Symptome zeigen sich später im Verlauf. Dieser Sachverhalt wird von vielen Autoren als Eisbergphänomen bezeichnet [Fasano and Catassi 2005, Feighery 1999, Maki and Collin 1997, Martin 2008].

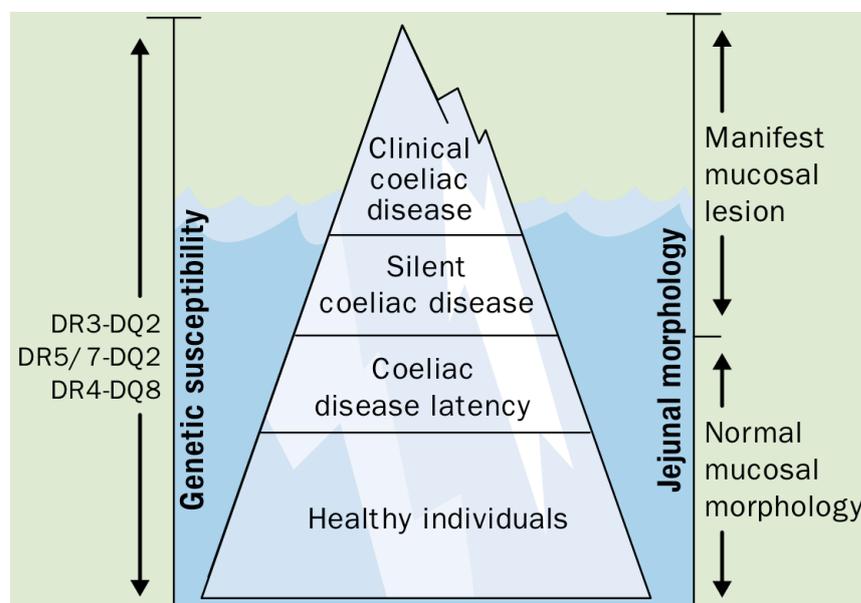


Abbildung 1.1 Der Zöliakie-Eisberg und das Spektrum der Gluten-Sensitivität

Die Häufigkeit der verschiedenen Zöliakieformen wird als Eisberg dargestellt, von dem nur ein kleiner Anteil sichtbar ist. Übertragen auf die Zöliakie, sind mit der Spitze des Eisbergs die klinisch manifesten und diagnostizierten Patienten gemeint, die nur einen geringen Anteil der Gesamtbetroffenen ausmachen.

Quelle: [Maki and Collin 1997]

Das Eisbergmodell veranschaulicht die numerischen Verhältnisse der unterschiedlichen Zöliakiesubtypen. Es wird die aktive, die silente und die latente Zöliakie (in steigender Häufigkeit) unterschieden. Die breite Basis bilden 20 % der gesunden Normalbevölkerung, die ebenfalls die genetische Disposition HLA DQ2/8 (humanes Leukozyten-Antigen) tragen, ohne zu erkranken [Maki and Collin 1997]. Folglich führt das Aufweisen der genetischen Merkmale nicht zwingend zu der Erkrankung. Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, durch welche Faktoren bei der genetischen Disposition die Zöliakie ausgelöst wird oder vermieden werden kann.

1.1.4 Symptomatologie & Assoziierte Erkrankungen

Es gibt keine spezifische Zöliakie-Symptomatik. Bedingt durch den typischen Dünndarmmukosaschaden mit Zottenatrophie treten bei der aktiven, d.h. der symptomatischen Zöliakie Symptome auf, die auf ein Malabsorptionssyndrom zurückzuführen sind.

Tabelle 1.1 Manifestationen und Symptome der unbehandelten Zöliakie

Klassische Symptome	Nicht-klassische Symptome
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vorgewölbttes Abdomen ▪ Anorexie, Appetitlosigkeit ▪ Chronische/rezidivierende Diarrhoe ▪ Wachstumsretardierung/Kleinwüchsigkeit ▪ Gewichtsverlust ▪ Reizbarkeit, Misslaunigkeit ▪ Muskelschwund ▪ Rezidivierende Bauchschmerzen ▪ Erbrechen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Arthritis ▪ Aphtöse Stomatitis ▪ Obstipation ▪ Zahnschmelzdefekte ▪ Dermatitis herpetiformis ▪ Duhring ▪ Hepatitis ▪ Eisenmangelanämie ▪ Pubertas tarda

Die Tabelle listet wesentliche Symptome der aktiven Zöliakie auf. Die Ausprägung der Symptome kann interindividuell starken Schwankungen unterliegen.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [Fasano and Catassi 2005, Tack, Verbeek, Schreurs and Mulder 2010]

Das bisher vorgestellte klinische Erscheinungsbild eines Zöliakiepatienten entspricht dem einer **aktiven Zöliakie**. Charakteristisch ist das Auftreten der Beschwerden, beginnend mit dem Zufüttern von Gluten in der Säuglingsnahrung, d.h. häufig ab dem sechsten Lebensmonat. Jedoch gibt es nicht selten eine Latenzzeit von mehreren Jahren. Vor allem bei der **atypischen** bzw. **der nicht-klassischen Zöliakie** manifestieren sich oft erst ab dem frühen Grundschulalter die ersten

Symptome, wobei extraintestinale Symptome führend sind. Dazu zählen beispielsweise Dermatitis herpetiformis Dühring, pulmonale Häm siderose und IgA-Nephropathie. Anders verhält es sich bei der **silenten Zöliakie**: Obwohl der serologische und der histologische Befund für eine Zöliakie sprechen, zeigt der Patient nur eine eingeschränkte Symptomatik [Paparo, Petrone, Tosco, Maglio, Borrelli, Salvati, Miele, Greco, Auricchio and Troncone 2005]. Davon abzugrenzen ist die **latente Zöliakie**. Es handelt sich um beschwerdefreie oder oligosymptomatische in der Regel glutenkonsumierende Patienten mit einem nicht einheitlichem pathologischem Befund der Serologie und/oder Duodenalschleimhaut. Häufig ist der Antikörperstatus bereits vor dem Entwickeln einer manifesten Zöliakie positiv. Vermutlich handelt es sich um ein Zweiphasenmodell, in dem sich aus dem Antikörper-positiven Vorbefund durch unbekannte Trigger-Faktoren die Zöliakie manifestiert [Ferguson, Arranz and O'Mahony 1993].

Für unbehandelte Zöliakiepatienten werden als mögliche Spätmanifestationen beispielsweise Osteoporose, Infertilität und Malignome angegeben. Einige Autoren geben ein bis zu sechsfaches Risiko für das Auftreten von Lymphomen [Anderson, McMillan, Watson, Monaghan, Gavin, Fox and Murray 2007, Askling, Linet, Gridley, Halstensen, Ekstrom and Ekblom 2002, Catassi, Fabiani, Corrao, Barbato, De Renzo, Carella, Gabrielli, Leoni, Carroccio, Baldassarre, Bertolani, Caramaschi, Sozzi, Guariso, Volta and Corazza 2002, Corrao, Corazza, Bagnardi, Brusco, Ciacci, Cottone, Sategna Guidetti, Usai, Cesari, Pelli, Loperfido, Volta, Calabro and Certo 2001, Rubio-Tapia, Kyle, Kaplan, Johnson, Page, Erdtmann, Brantner, Kim, Phelps, Lahr, Zinsmeister, Melton and Murray 2009] und eine deutlich erhöhte Mortalität [Biagi and Corazza 2010] bei Patienten mit der Diagnose Zöliakie an, während für andere Malignome kein signifikant erhöhtes Risiko besteht [Card, West and Holmes 2004]. Bei den Lymphomen handelt es sich vor allem um T-Zell-Lymphome, sogenannte EATL (enteropathy-associated T-cell lymphoma), deren Inzidenz bei konsequenter glutenfreier Diät signifikant geringer als bei glutenhaltiger Kost ist [Holmes 2002]. Das Risiko ist besonders bei Patienten mit der **refraktären Zöliakie** erhöht, von denen bis zu ein Sechstel ein EATL bekommen [Cellier, Delabesse, Helmer, Patey, Matuchansky, Jabri, Macintyre, Cerf-Bensussan and Brousse 2000]. Die etwa 5 bis 30 % der Zöliakiepatienten mit dieser Zöliakieform sprechen im Gegensatz zu Patienten mit den anderen Zöliakieformen nicht bzw. nicht mehr auf

eine glutenfreie Diät an. Es sind vermehrt Erwachsene betroffen, die einen langen Krankheitsverlauf der klassischen Zöliakie durchlebt haben [Daum, Cellier and Mulder 2005]. Therapeutisch muss bei diesen Patienten die glutenfreie Diät häufig durch eine Glucocortikoidsubstitution ergänzt werden.

Tabelle 1.2 Histologische und klinische Manifestationen der Zöliakie bei Kindern

Klinische Form	Histologische und klinische Manifestation
Klassische Zöliakie	Histologisches Vollbild der Enteropathie möglich Intestinale Symptome
Nicht klassisch: Atypische Zöliakie	Histologisches Vollbild der Enteropathie möglich Extraintestinale Symptome
Nicht klassisch: Silente Zöliakie	Histologisches Vollbild der Enteropathie möglich Minimale Beschwerden oder Symptomfreiheit
Nicht klassisch: Potentielle Zöliakie	Histologisch minimale Veränderungen/Normalbefund Manchmal symptomatisch
Nicht klassisch: Latente Zöliakie	Histologisches Vollbild der Enteropathie möglich Meist oligosymptomatisch

Die schematisch klassifizierten Formen der Zöliakie sind alle HLA-DQ2/8 positiv. Einzelne Patienten können die Gruppierung wechseln.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [Fasano and Catassi 2005]

Es sind mehrere Erkrankungen bekannt, die mit der Zöliakie eine hohe Ko-Inzidenzrate haben. Einen engen Zusammenhang gibt es zwischen dem insulinabhängigen Diabetes Mellitus Typ I und der Zöliakie: Cronin und Shanahan konnten verdeutlichen, dass bis zu 7,8 % der Typ-I-Diabetiker eine Zöliakie haben [Cronin and Shanahan 1997]. Tabelle 1.3 listet beispielhaft die wesentlichen, mit der Zöliakie assoziierten Erkrankungen auf.

Tabelle 1.3 Zöliakie-assoziierte Erkrankungen

Assoziierte Erkrankungen	Genetisch assoziierte Erkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Autoimmunerkrankungen (Diabetes Mellitus Typ I, Thyreoditis, Sjörger-Syndrom) ▪ Neurologische und psychologische Störungen (Ataxie, Autismus, Depression, Epilepsie, undefinierte neurol. Störungen) ▪ IgA-Nephropathie 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Down-Syndrom (Trisomie 21) ▪ Turner-Syndrom (Mono-X-Syndr.) ▪ Williams-Beuren-Syndrom (ideopathische Hyperkalzämie) ▪ Selektiver IgA-Mangel

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Osteopenie/Osteoporose ▪ Primär biliäre Zirrhose 	
---	--

Aufgelistet sind die häufigsten Krankheiten, die eine hohe Koinzidenz mit der Zöliakie aufweisen. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [Fasano and Catassi 2005, Feighery 1999]

1.1.5 Ätiologie und aktuelles Pathogenesemodell

Die Ätiologie der Zöliakie ist multifaktoriell. Die drei wesentlichen Säulen sind Umweltfaktoren sowie die genetischen und immunologischen Faktoren, die in ihrer speziellen Interaktion das Krankheitsbild der Zöliakie ergeben.

1.1.5.1 Umweltfaktoren

Die wichtigsten Umweltfaktoren der Zöliakie sind die alkohollöslichen Fraktionen der Getreidespeicherproteine von Weizen, Roggen, Gerste und Hafer. Diese Proteine heißen Gliadin, Secalin, Hordein und Avenin. Die Ingestion dieser Nahrungsbestandteile ist der Haupttriggerfaktor der Zöliakie. Die Speicherproteine anderer Getreidesorten (z.B. Reis, Mais oder Hirse) sind im Gegensatz dazu unbedenklich. Anhand der nachfolgenden Abbildung wird die Taxonomie der Getreidesorten präsentiert.

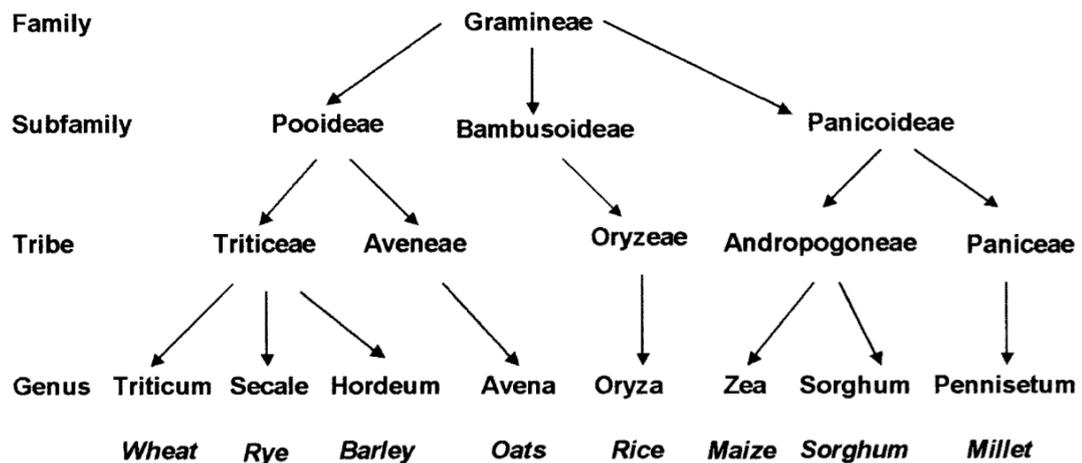


Abbildung 1.2 Die Taxonomie diverser Getreidesorten

Die Klassifikation der Familie Gramineae beinhaltet zöliakieauslösende Getreide, die von der Unterfamilie Pooideae ausgehen und unbedenkliche Getreide in den weiteren Unterfamilien Bambusoideae und Panicoideae. Der vermutlich weniger toxische Hafer ist Abkömmling eines anderen Stammes als die klassisch toxischen Proteine.

Quelle: [Kagnoff 2005]

Häufig wird der Begriff Gluten stellvertretend für die krankheitsaktivierenden Proteine verwendet. Gluten heißen diese jedoch nur bei Weizen. Gluten lässt sich in das alkohollösliche Gliadin, die sogenannte

Prolaminfraktion und in das unlösliche Glutenin differenzieren [Wieser 2008]. Beide Fraktionen lösen Symptome der Zöliakie aus [Molberg, Solheim Flaete, Jensen, Lundin, Arentz-Hansen, Anderson, Kjersti Uhlen and Sollid 2003, van de Wal, Kooy, van Veelen, Vader, August, Drijfhout, Pena and Koning 1999]. Sie unterscheiden sich wesentlich durch ihre Molekulargewichte. Die meist monomeren Gliadine haben Molekulargewichte von etwa 28.000-55.000 und sind etwa 250 bis 300 Aminosäuren lang. Anhand struktureller Unterschiede werden die Gliadine in die Untergruppen α , γ und ω aufgeteilt. Im Vergleich dazu sind die oft durch Disulfidbrücken gekoppelten Glutenine, deren Molekulargewichtspanne von 500.000 bis weit über 10.000.000 reicht, in die high-molecular-weight Glutenine mit 650 bis 800 Aminosäuren und die low-molecular-weight Glutenine mit 270 bis 330 Aminosäuren unterteilbar [Sollid 2002, Wieser 2007].

Von besonderer Bedeutung sind die überdurchschnittlich hohen Anteile der Aminosäuren Prolin und Glutamin in diesen Proteinen, die häufig in repetitiver Form vorliegen [Sollid 2000]. Durch diese Konfiguration erhalten die Peptide besondere Eigenschaften: Sie sind teilweise resistent gegen die proteolytischen Enzyme des Magens, des Pankreas und der Bürstensaummembran [Hausch, Shan, Santiago, Gray and Khosla 2002, Shan, Molberg, Parrot, Hausch, Filiz, Gray, Sollid and Khosla 2002] oder erweisen sich durch den hohen Glutaminanteil als ideales Substrat für eine Modifikation durch die Gewebstransglutaminase (siehe Kapitel 1.5). Die Sequenz der Gluten-Peptide ist für eine Stimulation von T-Lymphozyten und andere Eigenschaften entscheidend. Häufig untersuchte Peptide sind die AA-P31-49 und AA-P57-68, welche die Symptomatik der Zöliakie jeweils *in vivo* und *in vitro* triggern können [Anderson, Degano, Godkin, Jewell and Hill 2000, Fraser, Engel, Ellis, Moodie, Pollock, Wieser and Ciclitira 2003, Sturgess, Day, Ellis, Lundin, Gjertsen, Kontakou and Ciclitira 1994]. Das toxische bzw. nicht-immunodominante Peptid 31-43 und die längere Sequenz 31-49 induzieren eine Reaktion des angeborenen Immunsystems über eine Hochregulation diverser Mediatoren, z.B. Interleukin-15 (IL-15), Cyclooxygenase-2 (Cox-2), CD83, CD25 und MHC-Klasse I Polypeptid-verwandte Kette A (MICA) [Hue, Mention, Monteiro, Zhang, Cellier, Schmitz, Verkarre, Fodil, Bahram, Cerf-Bensussan and Caillat-Zucman 2004, Maiuri, Ciacci, Ricciardelli, Vacca, Raia, Auricchio, Picard, Osman, Quaratino and Londei 2003]. Im Gegensatz zu P31-43/49 ist P57-68 in der Lage, glutensensitive T-

Lymphozyten in Zöliakiepatienten zu stimulieren und wird daher als immunogenes Peptid bezeichnet [Anderson *et al.* 2000, Arentz-Hansen, Korner, Molberg, Quarsten, Vader, Kooy, Lundin, Koning, Roepstorff, Sollid and McAdam 2000, Arentz-Hansen, McAdam, Molberg, Fleckenstein, Lundin, Jorgensen, Jung, Roepstorff and Sollid 2002, Maiuri *et al.* 2003].

Neben den Getreideproteinen werden noch zahlreiche weitere Umweltfaktoren diskutiert. Gesichert ist ein Einfluss des Stillverhaltens (siehe Kapitel 4.3.1). Es ist nachgewiesen, dass probiotische Kulturen die Entwicklung des Immunsystems beeinflussen [Prioult, Fliss and Pecquet 2003]. Doch gibt es bisher keine Studien, die nachweisen, dass Probiotika einen Einfluss auf die Immunreaktion gegenüber Gluten bei der Zöliakie haben. Anders verhält es sich bei frühkindlichen Infektionen, die eine Manifestation der Zöliakie bei disponierten Kindern begünstigen. Infektionen können die Darmpermeabilität steigern, was zu einer gesteigerten Antigenpenetration mit nachfolgender Immunreaktion führt. Stene *et al.* konnten nachweisen, dass Kinder mit häufigen Rotavirus-Infektionen fast vierfach häufiger von der Zöliakie betroffen sind als Kinder ohne Infektionen [Stene, Honeyman, Hoffenberg, Haas, Sokol, Emery, Taki, Norris, Erlich, Eisenbarth and Rewers 2006].

1.1.5.2 Genetische Faktoren

Das Major-Histocompatibility-Complex-Gen (MHC) in der Chromosomenregion 6p21 codiert unter anderem für die humanen Leukozyten-Antigene (HLA). Diese werden mit vielen, vor allem autoimmunen Krankheiten assoziiert, die derzeit katalogisiert werden [Shiina, Inoko and Kulski 2004].

Genetische Faktoren haben bei der Zöliakie eine wesentliche Bedeutung. Etwa die Hälfte des genetischen Risikos ist auf HLA-Gene zurückzuführen. Über 90 % der Patienten exprimieren das HLA-DQ2 Molekül, welches durch HLA-DQA1*0501 und DQB1*0201 codiert wird. Die Mehrzahl der verbleibenden Patienten sind Träger von HLA-DQ8, codiert durch DQA1*0301 und DQB1*0302 [Caillat-Zucman 2009]. Die meisten Patienten haben den DR3-DQ2 Haplotyp (DRB1*0301–DQA1*0501–DQB1*0201) oder sind DR5–DQ7 und DR7–DQ2 heterozygot (DRB1*11/12–DQA1*0505–DQB1*0301 und DRB1*07–DQA1*0201–DQB1*0202) [Mearin, Biemond, Pena, Polanco, Vazquez, Schreuder, de Vries and van Rood 1983, Tosi, Vismara, Tanigaki, Ferrara, Cicimarra, Buffolano, Follo and Auricchio 1983]. Das

resultierende, funktionell identische HLA-DQ2 Molekül kann aus unterschiedlichen Genkombinationen entstehen, die entweder in *cis*- oder in *trans*-Position zueinander stehen (siehe Abbildung 1.3). Die Genprodukte sind ähnlich, sie unterscheiden sich jedoch zum Beispiel in ihren Affinitäten für bestimmte Peptidsequenzen.

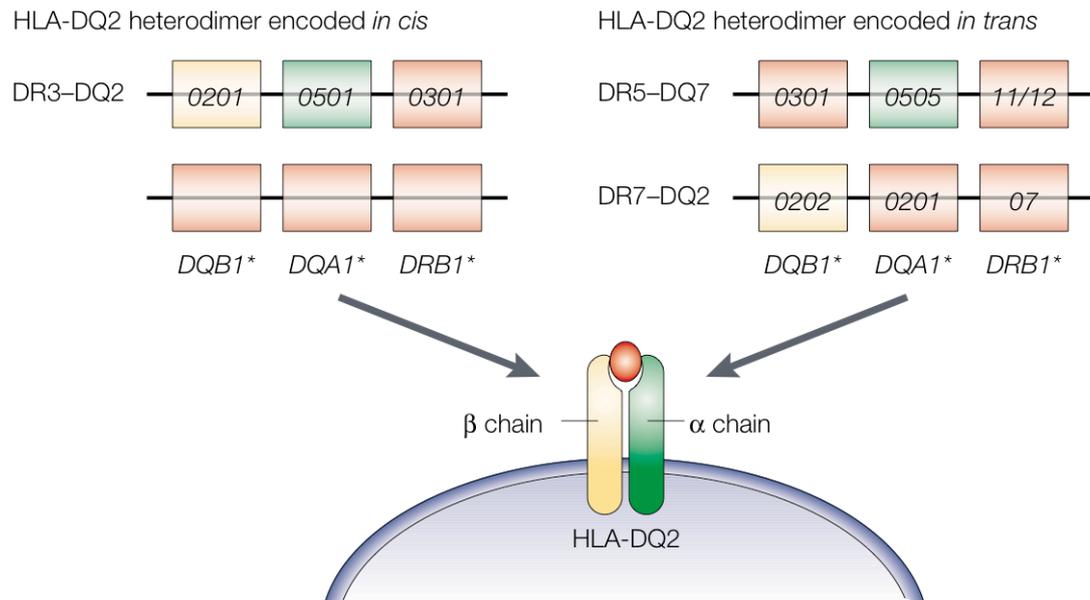


Abbildung 1.3 HLA-DQ2 Zusammensetzung bei der Zöliakie

Die meisten Zöliakiepatienten exprimieren ein spezielles HLA-DQ2-Heterodimer (DQA1*05-DQB1*02). Dieses HLA-Molekül steht entweder in *cis*-Stellung (bei Patienten mit dem DR3-DQ2 Haplotyp) oder in *trans*-Stellung (bei Personen, die DR5-DQ7 und DR7-DQ2 heterozygot sind).

Quelle: [Sollid 2002]

Die Bedeutung der HLA-Klasse-II-Allele im Rahmen der Zöliakie-Pathogenese ergibt sich aus der Interaktion von HLA-DQ2/8 an der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) mit CD4⁺-T-Lymphozyten. Im Gegensatz zu gesunden Patienten finden sich bei Zöliakiepatienten HLA-DQ2/8-abhängige, gluten-spezifische CD4⁺-T-Lymphozyten in der *Lamina propria* der Dünndarmmukosa [Halstensen, Scott, Fausa and Brandtzaeg 1993, Lundin, Scott, Hansen, Paulsen, Halstensen, Fausa, Thorsby and Sollid 1993]. Es findet eine Antigenpräsentation über DQ2/8 an die T-Zellen statt. Bei den T-Lymphozyten im peripheren Blut von Zöliakiepatienten sind diese spezifischen Eigenschaften nicht zu finden [Molberg, McAdam, Korner, Quarsten, Kristiansen, Madsen, Fugger, Scott, Noren, Roepstorff, Lundin, Sjostrom and Sollid 1998].

Viele Untersuchungen weisen auf eine HLA-unabhängige genetische Komponente hin. So gibt es Hinweise, dass auch das Chromosom 5 (5q31-33) und das Chromosom 11 (11q) zöliakie-assoziierte Gene tragen [Greco, Corazza, Babron,

Clot, Fulchignoni-Lataud, Percopo, Zavattari, Bouguerra, Dib, Tosi, Troncone, Ventura, Mantavoni, Magazzu, Gatti, Lazzari, Giunta, Perri, Iacono, Cardi, de Virgiliis, Cataldo, De Angelis, Musumeci, Clerget-Darpoux and et al. 1998]. Die Chromosomenregion 5q31-33 ist ein sogenanntes genetisches Hotbed, da sie Gene trägt, die in enger Assoziation mit (Autoimmun-)Erkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Crohn, Typ I Diabetes und Asthma, stehen.

1.1.5.3 Immunologische Faktoren

Neben den CD4⁺-T-Lymphozyten wird auch den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) eine wichtige Bedeutung zugeschrieben [Jabri, de Serre, Cellier, Evans, Gache, Carvalho, Mougnot, Allez, Jian, Desreumaux, Colombel, Matuchansky, Cugnenc, Lopez-Botet, Vivier, Moretta, Roberts, Ebert, Guy-Grand, Brousse, Schmitz and Cerf-Bensusan 2000]. Diagnostisch wird eine vermehrte IEL-Anzahl als hinweisend auf die Zöliakie gesehen. Die Funktion der IEL in der Zöliakie ist aber noch nicht endgültig aufgeklärt. Sie könnten in der refraktären Zöliakie und bei den enteropathieassoziierten T-Zell-Lymphomen eine wesentliche Rolle spielen. Möglicherweise stehen sie in einen direkten Zusammenhang mit dem Epithelschaden. Durch eine Aktivierung könnten sie ihren Phänotyp von der antigenspezifischen T-Zelle zu einer Natürlichen-Killerzellen-Art umdifferenzieren. Diese könnte über Sekretion unter anderem von IL-15 den typischen Mukosaschaden auslösen [Kagnoff 2005].

1.1.5.4 Pathogenesemodell

Gluten wird im Darmlumen von verschiedenen Peptidasen und anderen Enzymen gespalten. Die Passage einiger Peptide durch die Epithelzellschicht ist bei der Zöliakie erleichtert, da die intestinale Barrierefunktion abgeschwächt ist [Lammers, Lu, Brownley, Lu, Gerard, Thomas, Rallabhandi, Shea-Donohue, Tamiz, Alkan, Netzel-Arnett, Antalis, Vogel and Fasano 2008]. Mögliche Ursachen könnten Infektionen, mechanischer Stress oder auch der Einfluss des Myosin IXB (MY09B) auf die Tight Junctions (TJ) sein. Die Enterozyten exprimieren einen MICA-Liganden an der Zelloberfläche. Dieser MICA-Ligand bindet an IEL mit dem NKG2D-Rezeptor (Natürliche Killer Gruppe 2 Mitglied D). Durch eine IL-15-Sekretion der Enterozyten werden IEL und T-Zellen stimuliert. Es folgt eine

kombinierte Immunreaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems [Brandtzaeg 2006]. Die folgende Abbildung 1.4 vermittelt einen Überblick über die verschiedenen Vorgänge im Dünndarm bei der Zöliakie.

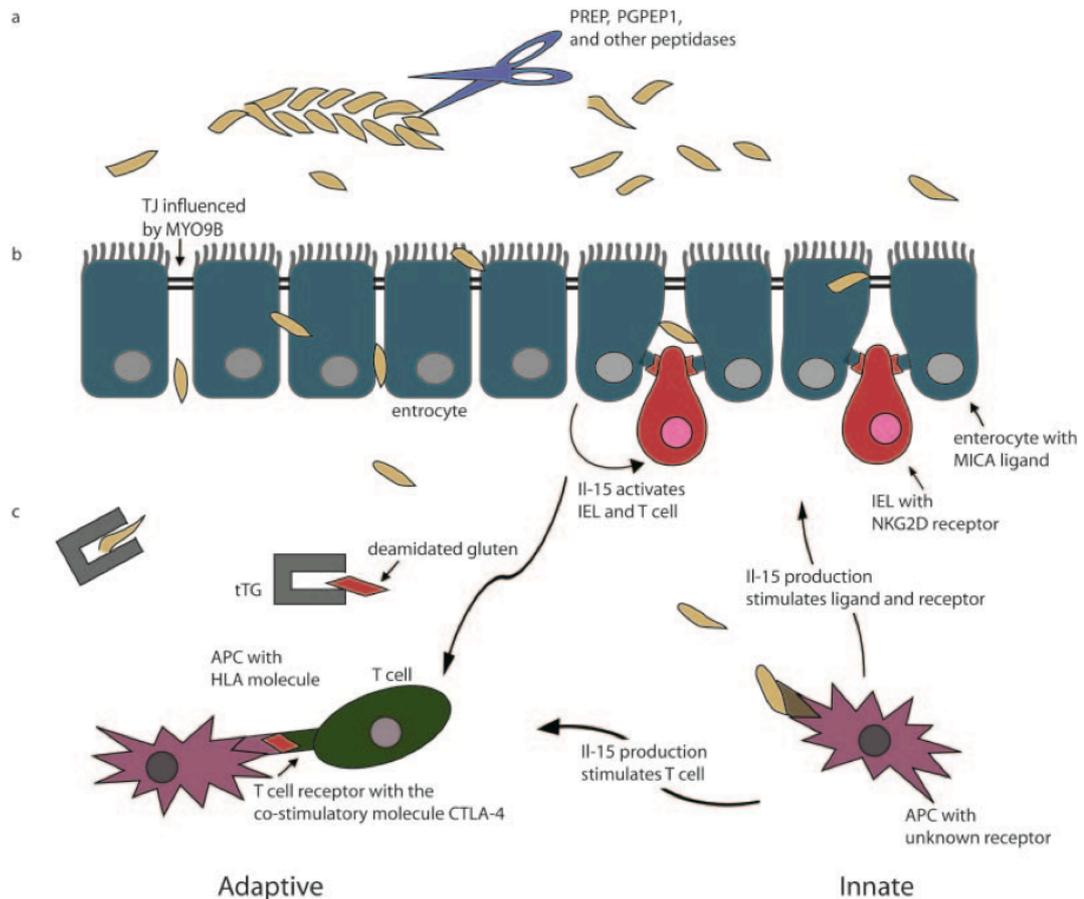


Abbildung 1.4 Das aktuelle Pathogenesemodell der Zöliakie

Die Abbildung verdeutlicht die komplexe Immunreaktion bei der Zöliakie. Es handelt sich um ein derzeit gültiges Modell. Dargestellt sind oben im Bild das Darmlumen und unten die *Lamina propria*. Quelle: [Monsuur and Wijmenga 2006]

Das adaptive Immunsystem reagiert auf potente immunstimulatorische Epitope, die durch De- bzw. Transamidierung von Gluten durch die Gewebstransglutaminase 2 (tTG), dem Autoantigen der Zöliakie, in der *Lamina propria* entstehen. Als Folge wird in genetisch disponierten Individuen (HLA DQ2/8 positiv) eine Immunantwort hervorgerufen, indem Peptide von APC an CD4⁺-Lymphozyten präsentiert werden, die durch proinflammatorische Zytokine (z.B. IFN- γ) eine Immunkaskade aktivieren [Kagnoff 2005].

Bei der Reaktion des angeborenen Immunsystems induziert Gluten in APC eine IL-15-Produktion, dem u.a. die IEL-Proliferation zugesprochen wird [Jabri *et al.* 2000]. IL-15 stimuliert sowohl die Produktion und Interaktion des MICA-Liganden

mit dem NKG2D-Rezeptor als auch die adaptive Immunantwort [Dieterich, Esslinger and Schuppan 2003, Monsuur and Wijmenga 2006]. Die MICA-NKG2D-Interaktion scheint zumindest eine Teilursache der Zottenatrophie zu sein [Hue *et al.* 2004]. Anders als bei Zöliakiepatienten wird bei Kontrollpatienten keine bedeutsame Menge des Zytokins IL-15 bei Einwirkung der toxischen Peptide exprimiert [Maiuri *et al.* 2003].

1.1.6 Diagnostik

Die Diagnosestellung der Zöliakie sollte nach den Kriterien der ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) von 1990 erfolgen. Um sicher die Diagnose stellen zu können, müssen folgende Kriterien Beachtung finden: der klinische und serologische Befund, die Histologie des Dünndarms und die Normalisierung der Serologie und der Beschwerden unter Einhaltung einer glutenfreien Diät.

Für die Erhebung des klinischen Befunds ist eine ausführliche Ernährungsanamnese mit Beginn und Menge der zugeführten gliadinhaltigen Nahrungsmittel essentiell. Zu geringe Mengen der Gliadinaufnahme können die histologische und serologische Diagnostik erschweren.

Der serologische Befund stützt sich im Wesentlichen auf zirkulierende Antikörper (AK), die bei der Zöliakie ein typisches Profil aufweisen können [Maki 1995]. Relevante AK sind u.a. α -Gliadin-IgG, α -Gliadin-IgA und Endomysium-IgA. Erstgenannter ist zwar sehr sensitiv, jedoch auch relativ unspezifisch und führt somit zu vielen falsch positiven Ergebnissen. Im Vergleich dazu sind die beiden IgA-Antikörper wesentlich spezifischer; der Endomysium-AK erreicht eine Sensitivität und Spezifität bis zu 97 %. Nachgewiesen wird er durch indirekte Immunohistochemie auf Affenösophagus oder humanem Umbilikalgewebe. Heutzutage ist bekannt, dass die durch die Endomysium-AK erkannte tTG das Auto-Antigen der Zöliakie ist [Dieterich, Ehnis, Bauer, Donner, Volta, Riecken and Schuppan 1997].

Das selektive IgA-Mangel-Syndrom ist bei Zöliakiepatienten mit bis zu 10 % weit verbreitet und kann zu falsch negativen Ergebnissen bei der Titerbestimmung der IgA-AK führen. Aus diesem Grund ist es unabdingbar, den Gesamt-IgA-Spiegel

zu messen, um die Ergebnisse der spezifischen serologischen Diagnostik richtig interpretieren zu können. Im Fall des IgA-Mangel-Syndroms müssen alternativ die IgG-AK bestimmt werden.

Um die diagnostisch bedeutsame Histologie der Dünndarmmukosa durchführen zu können, wird eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie durchgeführt. Es werden mehrere Zangenbiopsien aus verschiedenen Duodenalbereichen entnommen, um ein repräsentatives Ergebnis zu bekommen, da häufig sogenannte Patchy-Lesions mit verschiedengradigen Entzündungszustände vorliegen können. Typische Läsionen sind die Zottenatrophie, die Kryptenhyperplasie und die Vermehrung der IEL.

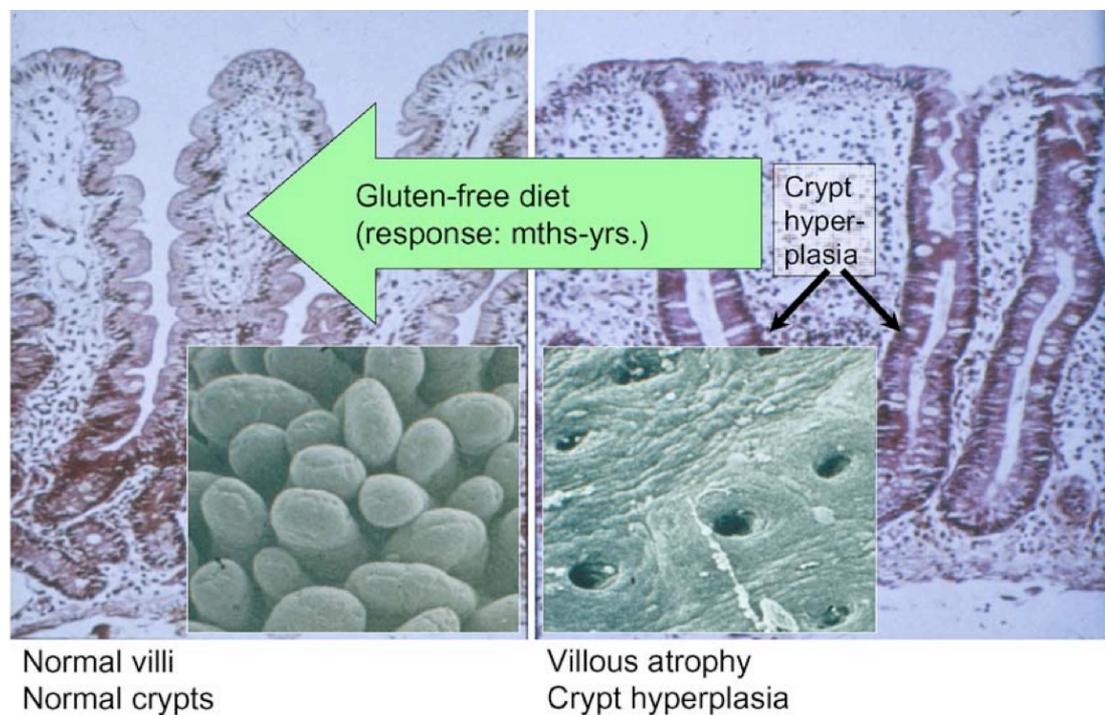


Abbildung 1.5 Der typische Dünndarmmukosachaden der Zöliakie

Die linke Bildhälfte zeigt einen Normalbefund der Dünndarmmukosa; die rechte die Veränderungen eines Zöliakiepatienten nach Gluteningestion. Sichtbar sind die Zottenatrophie, die Kryptenhyperplasie und die Vermehrung der IEL. Die jeweils kleinere Abbildung zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Villi bzw. deren Atrophie. Die Schädigungen sind binnen Monaten bis Jahren reversibel.

Quelle: [Brandtzaeg 2006]

Die Stadieneinteilung nach dem Auftreten der Läsionen geht auf Michael Marsh zurück und ist in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 1.4 Die Stadieneinteilung des Epithelschadens

Stadium	0	I	II	IIIa	IIIb	IIIc
IEL	<20	>30	>30	>30	>30	>30
Krypten	normal	normal	Hyper-	Hyper-	Hyper-	Hyper-

			trophie	trophie	trophie	trophie
Zotten	normal	normal	normal	Leichte Atrophie	Starke Atrophie	Totale Atrophie

Die in der Tabelle eingetragenen Zahlen der IEL sind Anzahlen der IEL pro 100 Enterozyten.
Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [Holtmeier and Caspary 2006, Marsh and Crowe 1995].

1.1.6.1 Differentialdiagnosen

Eine Vielzahl an weiteren Erkrankungen kann auch zu den charakteristischen histologischen Merkmalen der Zöliakie führen. Im Gegensatz zu der Zöliakie besteht bei diesen Pathologien keine strikte Abhängigkeit der Beschwerden von einer Gluteningestion. Einige nennenswerte Krankheitsbilder, die ausgeschlossen werden sollten, sind nach [Holtmeier and Caspary 2006]:

- Tropische Sprue
- Kollagenöse Kolitis
- Whipple-Erkrankung
- Giardiasis
- Virale Enteritis
- AIDS
- Morbus Crohn des Dünndarms
- Dünndarmlymphom
- Nahrungsmittelunverträglichkeiten (z.B. Kohlenhydrate oder Kuhmilch)
- Autoimmune Enteropathie
- Graft vs. Host-Erkrankung
- Strahlenschaden

1.1.7 Therapie

Die Therapie der Wahl ist das konsequente Einhalten einer lebenslangen glutenfreien Diät [Catassi and Fasano 2008, Martin 2008, Polanco 2008]. Jegliche Nahrungsmittel, die bereits geringe Mengen von Weizen, Roggen, Gerste oder Hafer enthalten, sollten nicht verzehrt werden. Die Toxizität von Hafer wird in der aktuellen Literatur als fragwürdig dargestellt. So gibt es zahlreiche Studien, die von einer direkten mukosaschädigenden Wirkung des Hafers ausgehen [Arentz-Hansen, Fleckenstein, Molberg, Scott, Koning, Jung, Roepstorff, Lundin and Sollid 2004, Haboubi, Taylor and Jones 2006], während andere Studien die beobachteten Effekte eher auf Verunreinigungen, z.B. durch die Mahlprozesse oder den Transport, zurückführen [Janatuinen, Pikkarainen, Kempainen, Kosma, Jarvinen, Uusitupa and Julkunen 1995, Lundin, Nilsen, Scott, Loberg, Gjoen, Bratlie, Skar, Mendez, Lovik and Kett 2003]. Aufgrund der unklaren Studienlage und der Indizien für eine Toxizität von Hafer sollte er sicherheitshalber aus der Diät ausgeschlossen werden.

1.1.7.1 Glutenfreie Diät

Die Lebensmittel, die kein Gluten enthalten, lassen sich in zwei Gruppen klassifizieren: Zum einen gibt es von Natur aus glutenfreie Produkte, wie z.B. Gemüse, Fleisch oder Obst. Auf der anderen Seite werden für typisch glutenhaltige Produkte, wie Brot, Nudeln und Bier, Alternativprodukte auf Basis unbedenklicher Getreide, wie beispielsweise Mais, Reis oder Hirse, in Verbindung mit Verdickungsmitteln aus Bohnenstärke oder Methylzellulose hergestellt. Glutenfreie Alternativprodukte sind nicht überall verfügbar und oft teurer als vergleichbare glutenhaltige Produkte. In den letzten Jahren war allerdings eine positive Entwicklung zu verzeichnen, da die Kennzeichnung der Lebensmittelbestandteile und die Verfügbarkeit der zöliakiegeeigneten Nahrungsmittel entscheidend verbessert wurden. Die Selbsthilfeorganisation Deutsche Zöliakie-Gesellschaft hat Listenwerke sämtlicher Lebensmittel mit Angabe der enthaltenen Glutenmengen herausgegeben, was für die Patienten eine große Hilfe sein kann. Aufgrund der Umstände, die eine zöliakiegerechte, glutenfreie Diät mit sich bringt, ist die Compliance vor allem bei jugendlichen Patienten häufig dürftig.

Nahrungsmittel dürfen bis zu dem Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes als glutenfrei deklariert werden. Dieser liegt derzeit bei 20 ppm (parts per million) Gluten für natürlicherweise glutenfreie Produkte bzw. bei 200 ppm für glutenbereinigte Produkte auf Weizenstärkebasis [Troncone *et al.* 2008]. Da viele kommerzielle Produkte Gluten als Zusatzstoff enthalten, ist der vollständige Verzicht auf Gluten schwer erzielbar. So enthalten z.B. Würstchen, Suppen, Soßen oder Pudding oft erhebliche Mengen an Gluten, dessen bindende und andickende Eigenschaften genutzt werden. Andere Nahrungsmittel, die glutenfreie Getreide enthalten, sind häufig mit Gluten kontaminiert. Eine große prospektive, doppelblinde und placebo-kontrollierte Studie verdeutlichte, dass eine Dosis von 50mg pro Tag in der glutenfreien Ernährung nicht überschritten werden sollte [Catassi, Fabiani, Iacono, D'Agate, Francavilla, Biagi, Volta, Accomando, Picarelli, De Vitis, Pianelli, Gesuita, Carle, Mandolesi, Bearzi and Fasano 2007].

1.1.7.2 Potentielle neue Therapiestrategien

Aktuell werden verschiedene Ansätze verfolgt, die alternative Therapiestrategien zur glutenfreien Diät generieren sollen. Die bei der

Enzymtherapie zugeführten bakteriellen Prolyl-Endopeptidasen sollen potente T-Zell-Epitope zerstören, die aufgrund des hohen Prolinanteils unter physiologischen Umständen weitgehend proteolytisch resistent wären [Mitea, Havenaar, Drijfhout, Edens, Dekking and Koning 2008, Stepniak, Spaenij-Dekking, Mitea, Moester, de Ru, Baak-Pablo, van Veelen, Edens and Koning 2006]. Eine andere Möglichkeit der alternativen Therapie ist die Verwendung von glutenfreiem Weizen, der durch spezielle Züchtungsmethoden oder Gentechnik erzeugt werden kann. Ganz anders verhält es sich bei den immunmodulatorischen Strategien, die das Ziel haben, die Immunreaktion abzuschwächen oder vollständig zu unterdrücken. Realisierbar könnte dieses Ziel durch die Inhibition der Effekte der tTG oder der Interleukine 10 und 15 sein [Catassi and Fasano 2008]. Weiterhin hat eine gestörte Barrierefunktion der intestinalen Mukosa eine wichtige Bedeutung in der Ätiologie der Zöliakie. Zonulin fungiert als Modulator der intestinalen Permeabilität und konnte bisher erfolgreich durch den Inhibitor AT-1001 beeinflusst werden [Paterson, Lammers, Arrieta, Fasano and Meddings 2007]. Jedoch stellen die alternativen Therapiemöglichkeiten noch keinen Ersatz für die glutenfreie Diät dar.

1.2 Endozytose & weitere Transportvorgänge

Eine Zelle ist als ein geschlossenes System mit vielen Interaktionsmöglichkeiten mit der Umwelt zu betrachten. Die Plasmamembran hat vielfältige Funktionen, beispielsweise die Sicherung der intrazellulären Homeostase, Immunantwort, interzelluläre Kommunikation und Signaltransduktion [Mukherjee, Ghosh and Maxfield 1997].

1.2.1 Transmembrantransport

Um ihre Aufgaben zu erfüllen, kann die Zelle neben elektrischen Signalen auch Materie (z.B. Hormone, Nahrungsmittelpptide) mit ihrer Außenwelt austauschen. Dabei muss die barrierebildende Zellmembran überwunden werden. Für diesen Vorgang sind verschiedene Mechanismen bekannt. Kleine lipophile Moleküle, wie z.B. Kohlendioxid, Vitamine, Harnstoff oder Alkohole, können die Lipiddoppelschicht der Membran aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften per Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles bis zum Erreichen eines Fließgleichgewichts durchwandern. Hydrophile Stoffe von sehr geringer

Molekülgröße können über passive Poren, Kanäle oder aktive Transporter, die jeweils entweder selektiv oder unselektiv arbeiten, die Membran passieren. Dieser Transportmechanismus ist von großer Bedeutung für die Aufnahme von Wasser, Ionen, Zucker und Aminosäuren. Größere Moleküle benötigen einen weiteren Mechanismus, um in die Zelle aufgenommen oder aus dieser wieder abgegeben zu werden. Biomembranen werden aufgrund dieser Eigenschaften als semipermeabel bezeichnet.

1.2.2 Transport mit Membranverlagerung

Große Makromoleküle können die Membran nicht ungehindert passieren. Der Eintritt dieser Moleküle in die Zelle erfolgt durch Invagination der Partikel in Membraneinstülpungen, die sich im Verlauf der Zellmembran abschnüren. Die somit internalisierten endozytotischen Vesikel (EV) sind von einer Membran umgeben, die Teil der Plasmamembran war. Dieser Prozess wird Endozytose genannt. Es ist die Aufnahme von festen Partikeln von der Pinozytose, der Aufnahme von in Flüssigkeit gelösten Partikeln, zu unterscheiden. Abhängig von der Art des aufzunehmenden Produkts (Rezeptor, Ligand, Lipid, o.a.) gibt es weitere Mechanismen, z.B. rezeptorvermittelte, clathrin-abhängige oder caveolin-vermittelte Endozytose [Conner and Schmid 2003, Grant and Sato 2006, Okamoto 1998]. Eine Übersicht über die wichtigen Transportvorgänge präsentiert Abbildung 1.6.

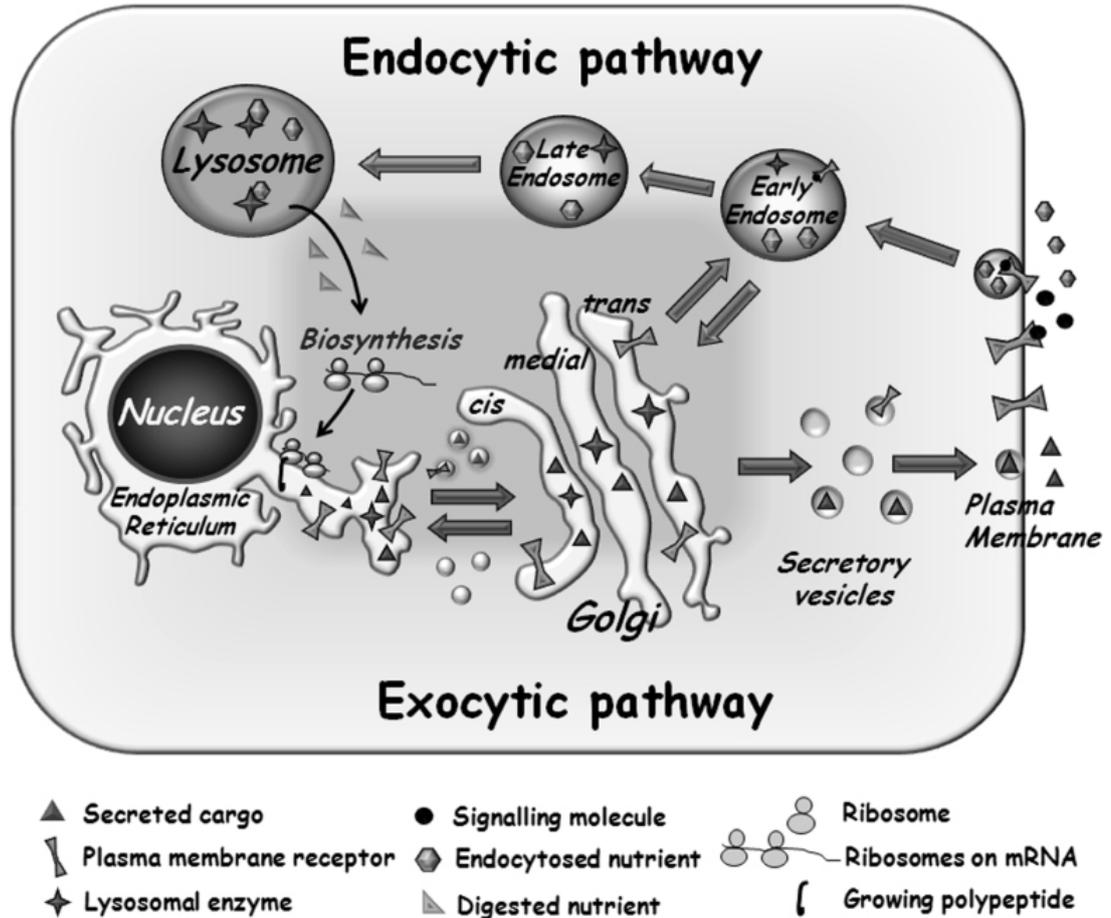


Abbildung 1.6 Schema der intrazellulären Transportvorgänge von Makromolekülen

Gezeigt werden zwei wesentliche intrazelluläre Transportwege: Die Endo- und die Exozytose. Beide Wege sind über den Golgiapparat und den davon ausgehenden bidirektionalen Austausch mit den frühen Endosomen verbunden.

Quelle: [Nava and Segev 2010]

Im Vergleich zu der Endozytose beschreibt die Exozytose den reversen Prozess der Ausschleusung. In polaren Epithelzellen gibt es zusätzlich den durchschleusenden Transport, die Transzytose. Dabei läuft ein Endozytosevorgang, gekoppelt mit einer Exozytose, als gerichteter Transport ab. So werden in Enterozyten Gliadinpeptide und andere Nahrungsbestandteile regelhaft an der apikalen Membran (AM) internalisiert und bis zur basolateralen Membran (BL) transportiert.

1.2.3 Endozytotische Vesikel

Von dem Zeitpunkt der Abschnürung eines zu endozytierenden Stoffes in einer Einstülpung der Plasmamembran ist er ein Bestandteil des Endomembransystems. Dieses System beinhaltet die Gesamtheit der membranumschlossenen Zellorganellen, die durch Vesikeltransport interagieren. Die EV durchlaufen

beispielsweise den in Abbildung 1.6 dargestellten Weg über die Fusion bzw. Integration mit frühen Endosomen (EE), anschließend mit späten Endosomen (LE), bis hin zum reifen Lysosom (LY). Durch Ansäuerung wird der pH-Wert von einem Kompartiment bis zum nächsten niedriger (EE pH 6,0-6,5, LE pH 5,0-6,0 und LY pH <4,5) [Landsverk, Bakke and Gregers 2009]. Die Passagezeiten können extrem variieren. An Enterozyten ist gezeigt worden, dass genannte Transporte bereits nach fünf bis zehn Minuten abgeschlossen sein können [Buning, Hundorfean, Schmitz, Zimmer, Strobel, Gebert and Ludwig 2006, Zimmer, Buning, Weber, Kaiserlian and Strobel 2000].

Inkorporierte Stoffe befinden sich anfangs in umhüllten EV. Sobald die EV durch ein ATP-abhängiges Enzym von ihrer Hüllschicht befreit werden, können diese untereinander oder mit EE fusionieren. Diese Reaktion benötigt die GTPase Rab5, die experimentell ähnlich wie das EEA1 (Early Endosome Antigen 1) als Markerprotein für EE verwendet werden kann. Aufgrund des niedrigen pH-Werts im Lumen der EE dissoziieren dort einige Ligand-Rezeptor-Komplexe [Grant and Sato 2006, Mukherjee *et al.* 1997]. Das EE agiert wie eine Sortierstation, da einige durch Dissoziation nun freie Rezeptoren direkt oder mithilfe von Recyclingendosomen zur Plasmamembran zur Wiederverwendung transportiert werden, während andere zu LE oder bis zu LY geleitet werden, um dort degradiert zu werden (siehe Abbildung 1.6). Ein Austausch mit dem Trans-Golginetzwerk ist eine weitere Möglichkeit des Transports aus dem EE. Der Weg vom EE zum LE kann entweder über intermediäre Transportvesikel (Vesikel-Shuttle-Model) oder durch Reifung eines EE zum LE (Maturations-Model) bewältigt werden. Für diese Reifung gibt das EE Bestandteile über einen Recyclingpfad ab und fusioniert mit anderen Komponenten über einen sekretorischen Weg. Es ist bisher nicht abschließend aufgeklärt, welche Hypothese eher zutrifft. Möglicherweise liegt eine Koexistenz vor [Grant and Sato 2006, Jovic, Sharma, Rahajeng and Caplan 2010, Mukherjee *et al.* 1997, Sadowski, Pilecka and Miaczynska 2009].

Der nächste Schlüsselpunkt im endozytotischem Weg ist das LE. Funktionell sind LE ein Zwischenschritt zwischen EE und LY. Charakteristisch für LE sind lysosomale Glykoproteine, saure Proteasen, Rab7/9 und LAMP-1/2 (Lysosomen-assoziiertes-Membranprotein), die sich als molekulare Markerproteine eignen

[Mellman 1996, Russell, Nickerson and Odorizzi 2006]. LE fusionieren mit Pre-Lysosomen und bilden dadurch sogenannte Hybrid-Lysosomen, die im Austausch mit reifen LY stehen und durch Sortierung und Abspaltung selber zu LY heranreifen [Russell *et al.* 2006].

Lysosomen ähneln LE in ihrer Morphologie und Funktion. Die etwa 0,1-1µm messenden Zellorganellen enthalten viele hydrolysierende Enzyme, wie z.B. Proteasen, Lipasen und Nukleasen. Unterscheidbar von LE sind sie z.B. anhand von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, die in LY im Gegensatz zu LE nicht vorhanden sind und durch den niedrigeren pH-Wert im Vergleich zu LE [Mellman 1996].

1.3 Präsentation von Antigenen

Jegliche Moleküle, die in Interaktion mit dem Immunsystem treten können und möglicherweise eine Immunreaktion auslösen, werden als Antigene bezeichnet. Antigene Epitope, d.h. die reaktiven Stellen des Antigens, fungieren nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip mit entsprechenden Bindungsstellen der MHC-Moleküle oder auch von Antikörpern.

Ausschließlich in an MHC-I/II komplexgebundener Form kann eine adäquate Reaktion mit T-Lymphozyten stattfinden. Die CD4⁺- und CD8⁺- T-Lymphozyten tragen einen membranständigen T-Zell-Rezeptor, der in Interaktion mit dem via MHC präsentierten Antigen tritt. Für die Präsentation an T-Zellen bildet das Immunsystem spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) aus. Zu dieser Gruppe zählen vor allem dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten. Es können auch Zellen aus anderen Zellpopulationen eine Antigenpräsentierung vornehmen, wie z.B. Enterozyten.

B-Lymphozyten exprimieren B-Zell-Rezeptoren. Durch Antigenbindung aktivierte B-Lymphozyten werden auch als Plasmazellen bezeichnet und sezernieren AK, die sich spezifisch an die Antigene binden und es dadurch markieren. Dieser als Opsonierung bezeichnete Prozess führt z.B. zur Phagozytose.

Damit Antigene durch MHC an der Zelloberfläche präsentiert werden können, müssen sie erst prozessiert werden. Dieses kann bei endozytotisch aufgenommenen Antigenen in den Endosomen geschehen. Das dortige saure Milieu und die anwesenden Aspartat- und Cystinproteasen, wie beispielsweise Cathepsine,

enthüllen Antigene und spalten sie auf. Regelmäßig werden endogene Antigene z.B. neu synthetisierte Proteine über MHC-I präsentiert, während exogene Antigene an MHC-II gebunden werden [Braciale and Braciale 1991].

1.3.1 Antigenpräsentierung über MHC Klasse I

Das MHC-Klasse-I-Molekül befindet sich auf fast allen kernhaltigen Zellen mit der Aufgabe, endogene Antigene auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Nach der Missing-Self-Hypothese sind Zellen, bei denen das ausbleibt, suspekt und potentiell schädlich, weshalb sie durch T-Killerzellen zerstört werden. Bei ordnungsgemäßer Präsentation endogener Peptide binden die $CD8^+$ -zytotoxischen T-Lymphozyten nicht mit dem T-Zell-Rezeptor an das MHC-I und tolerieren diesen Zustand. Dieses Prinzip wird als Selbsttoleranz bezeichnet. Werden jedoch veränderte Proteinbestandteile, z.B. durch Mutationen innerhalb der Zelle oder durch Virenbefall, präsentiert, so zerstört die T-Zelle die betroffene Zelle.

1.3.2 Antigenpräsentierung über MHC Klasse II

Für die Antigenpräsentation exogener Antigene an $CD4^+$ -T-Lymphozyten ist MHC-Klasse-II-Molekül zuständig [Telega, Baumgart and Carding 2000]. Der zwei α -Untereinheiten und zwei β - Untereinheiten umfassende Proteinkomplex wird auf der Zelloberfläche von APC exprimiert und membranständig verankert. Der komplexe intrazelluläre Weg ist in Abbildung 1.7 ersichtlich.

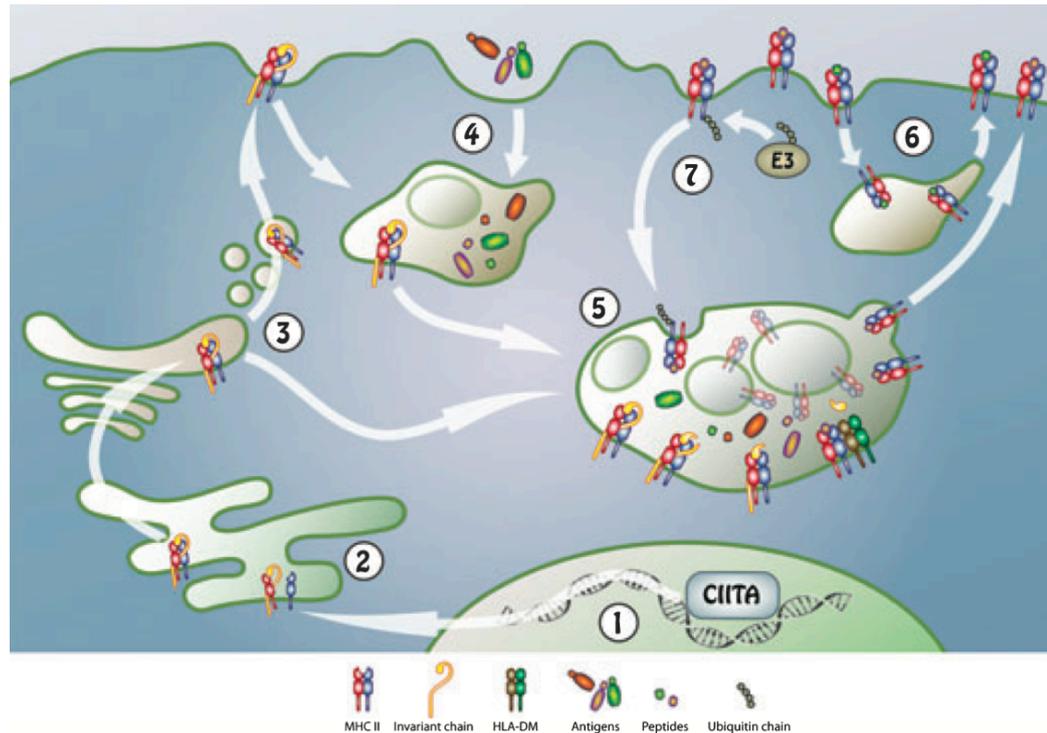


Abbildung 1.7 Der Weg von MHC-Klasse-II

Der MHC-II-Genlocus wird mithilfe des MHC-II-Transaktivators (CIITA) transkribiert (1). Die synthetisierten Polypeptide werden im ER zusammengefügt (2). Der Weg zu den Endosomen kann vom Trans-Golgi-Netzwerk oder über die Membran erfolgen (3). Beladen wird MHC-II durch extrazelluläre Proteine (4). Durch Fusionsprozesse gelangen die Proteine in EE und LY, wo sie durch Proteasen degradiert werden. Die im ER befindlichen MHC-II-Moleküle werden durch eine invariante Kette blockiert, um nicht unspezifisch zu binden. MHC-II verlässt das ER und invadiert ein LE. Die invariante Kette wird durch Proteasen gespalten und ein weiterhin blockierendes Peptid namens CLIP bleibt zurück (5). Sobald CLIP abgespalten wird, kann im LE eine Bindung mit dem Peptid erfolgen, welches darauf an die Zelloberfläche gebracht und an CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert wird (6). MHC-II kann von der Zelloberfläche aus recycelt werden, bis es durch spezifische E3-Ligasen ubiquitiniert wird und als Reaktion auf dieses Signal degradiert wird (7) [Braciale and Braciale 1991, Geuze 1998, Landsverk *et al.* 2009, Watts 2004].

Quelle: [Landsverk *et al.* 2009]

1.3.3 Kreuzpräsentierung

Wie zuvor beschrieben, werden grundsätzlich endogene Antigene über die MHC-Klasse-I an CD8⁺-T-Lymphozyten und exogene Antigene via der MHC-Klasse-II an CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert. Diese Vorgänge laufen nicht immer vollständig isoliert voneinander ab. Werden exogene Antigene über die MHC-I an CD8⁺-Lymphozyten präsentiert, handelt es sich um eine Kreuzpräsentierung [Dudziak, Kamphorst, Heidkamp, Buchholz, Trumpfheller, Yamazaki, Cheong, Liu, Lee, Park, Steinman and Nussenzweig 2007, Schnorrer, Behrens, Wilson, Pooley, Smith, El-Sukkari, Davey, Kupresanin, Li, Maraskovsky, Belz, Carbone, Shortman, Heath and Villadangos 2006]. Es werden zwei mögliche Modelle diskutiert: Bei dem TAP-abhängigen Weg haben zytosolische exogene Antigene Zugang zu dem

klassischen MHC-I-Beladungs-Vorgang. Alternativ könnten die Peptide in Endosomen an die MHC-I-Komplexe binden, die entweder aus dem ER oder von der Zellmembran stammen [Gromme, Uytdehaag, Janssen, Calafat, van Binnendijk, Kenter, Tulp, Verwoerd and Neefjes 1999].

1.4 Immunglobulin Klasse A

Der Begriff Immunglobulin (Ig) bezeichnet synonym Antikörper. Gebildet und sezerniert werden AK von zu Plasmazellen ausdifferenzierten B-Zellen. Aufgebaut sind Ig aus je zwei identischen schweren und leichten Ketten. Die einzelnen Ketten sind durch Disulfidbrücken zu einer ypsilon-förmigen Struktur verbunden. Es wird ein Fc-Fragment von dem antigenbindenden Fab-Fragment unterschieden, welches aus Anteilen der leichten und der schweren Kette gebildet wird. Beide Fragmente lassen sich enzymatisch durch die Cysteinprotease Papain voneinander abspalten [Litman, Rast, Shamblott, Haire, Hulst, Roess, Litman, Hinds-Frey, Zilch and Amemiya 1993].

Antikörper binden non-kovalent und spezifisch an Antigenen. Die Agglutination unterliegt dem Massenwirkungsgesetz, sodass eine Komplexbildung nur bei stöchiometrisch annähernd gleichen Verhältnissen von AK und Epitop möglich ist. Entstehende polyvalente Komplexe können die Eigenschaften der Einzelkomponenten entscheidend verändern.

Vertebraten haben in der Regel fünf verschiedene Isotypen der Ig, die in unterschiedlichen Kompartimenten des Körpers zur Verfügung stehen. Sie werden anhand der Struktur in verschiedene Klassen eingeteilt: Regelhaft sind IgA, IgD, IgE und IgG Monomere, sekretorisches IgA Dimere und IgM Pentamere [Woof and Burton 2004].

Das Ig-A dient vor allem dem Schutz vor Keimbesiedlung von Schleimhäuten im Darm, in den Atemwegen und dem Urogenitaltrakt. Sezerniertes IgA existiert in Speichel, Tränen, Muttermilch und anderen Körpersekreten. Es liegt in homodimerer Form vor, bei der die beiden Einzelteile durch Joining-Ketten verknüpft sind. Der Mensch besitzt zwei Subklassen des IgA: IgA1 hat einen Anteil von etwa 80 bis 90 % des Gesamt-IgAs und ist vorwiegend im Serum zu finden, während IgA2 hauptsächlich in Körpersekreten vorkommt [Underdown and Schiff 1986].

Das Auftreten von IgA gegen Gliadin und tTG ist hinweisend für die Zöliakie. Es ist gezeigt, dass der Transferrinrezeptor (=CD71-Rezeptor) an einer Retrotranszytose von Gliadin beteiligt ist. Dabei werden Gliadinpeptide vor der Degradation geschützt von der apikalen zur basalen Zellmembran transportiert (siehe Abb. 1.8). Dieser Prozess ist abhängig von sIgA, da es zu einer Komplexbildung der Peptiden mit den Immunglobulinen kommt [Jabri and Sollid 2009, Matysiak-Budnik, Moura, Arcos-Fajardo, Lebreton, Menard, Candalh, Ben-Khalifa, Dugave, Tamouza, van Niel, Bouhnik, Lamarque, Chaussade, Malamut, Cellier, Cerf-Bensussan, Monteiro and Heyman 2008, Meresse, Ripoche, Heyman and Cerf-Bensussan 2009].

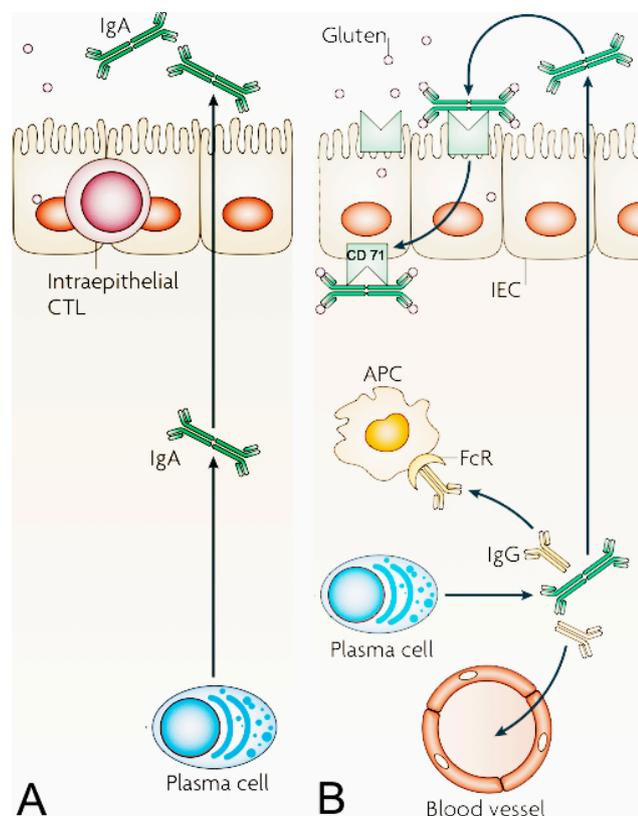


Abbildung 1.8 IgA-Weg in der Dünndarmmukosa

A: Unter normalen Intestinalbedingungen werden Ig in der *Lamina propria* von Plasmazellen sezerniert. Nach dem Durchwandern der Epithelschicht werden sie ins Lumen freigesetzt. B: Liegen entzündliche Prozesse vor, existieren zusätzlich auch retrotranszytotische Transportvorgänge von IgA: Der CD71-Rezeptor wird hochreguliert, mit dessen Interaktion IgA-Gliadin-Komplexe vom Lumen zur *Lamina propria* einem protektiven Transport unterliegen können.

Quelle: [Jabri and Sollid 2009]

1.5 Gewebs-Transglutaminase

Die Gewebstransglutaminase II trägt eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Zöliakie. Das Ca^{2+} -abhängige, ubiquitäre Enzym besitzt die Fähigkeit für wesentliche post-translationale Modifikationen: Transamidierung und

Deamidierung. Bei der auch Cross-Linking genannten Transamidierungsreaktion wird ein Glutaminrest eines Proteins durch die tTG mit einem Lysin oder einem anderen primären Amin durch eine Isopeptidylbindung verknüpft. Die Transamidierung steht in einem Fließgleichgewicht mit der Deamidierung, deren Verhältnis von äußeren Faktoren abhängt. Bei pH-Werten $<7,3$ und/oder in Abwesenheit von primären Aminen liegt der Reaktionsschwerpunkt bei der Deamidierung. Diese Reaktion bindet mithilfe der tTG Wasser an einen Glutaminrest unter Abspaltung von Ammoniak. Das Produkt ist die negativ geladene Glutaminsäure. Die HLA-DQ2/8-Moleküle haben eine Präferenz für negative Ladungen. Aus diesem Grund erzeugt die Transglutaminase durch die zahlreichen Deamidierungsvorgänge im entzündeten Dünndarmgewebe große Mengen an immunstimulatorischen Epitopen. Ohne Einwirkung der tTG weisen Glutenpeptide nur wenige negative Ladungen auf [Molberg, McAdam, Lundin, Kristiansen, Arentz-Hansen, Kett and Sollid 2001, Molberg *et al.* 1998, Sjostrom, Lundin, Molberg, Korner, McAdam, Anthonsen, Quarsten, Noren, Roepstorff, Thorsby and Sollid 1998, Skovbjerg, Koch, Anthonsen and Sjostrom 2004, Sollid 2002, van de Wal, Kooy, van Veelen, Pena, Mearin, Papadopoulos and Koning 1998].

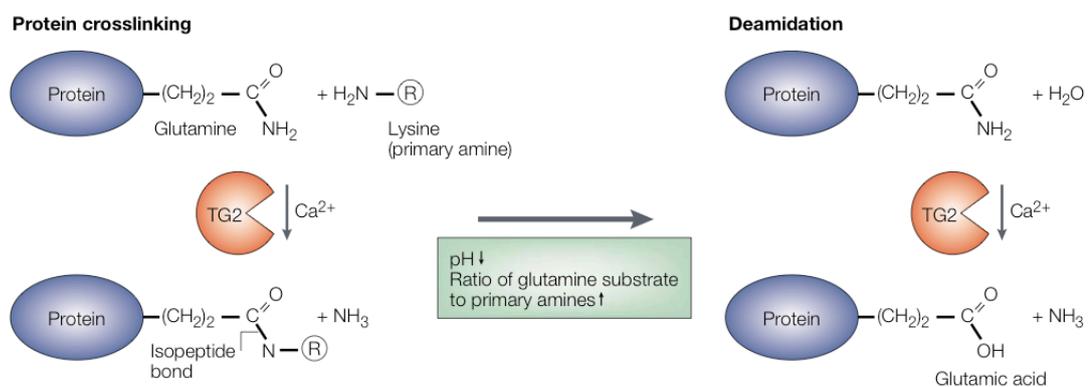


Abbildung 1.9 Die Reaktionen der Gewebstransglutaminase II

Auf der linken Seite ist die Verknüpfungsreaktion, die Transamidierung, dargestellt. Sinkt der pH-Wert und/oder sind wenige primäre Amine als Akzeptor vorhanden, verschiebt sich das Verhältnis der ausgeführten Reaktionen zugunsten der Deamidierung, deren Endprodukt die Glutaminsäure ist. Quelle: [Sollid 2002]

Im Jahr 1997 hat die Arbeitsgruppe um Detlef Schuppan herausgefunden, dass das Antigen für die Endomysium-AK die tTG ist, die somit als Autoantigen identifiziert wurde [Dieterich *et al.* 1997]. Den Autoantikörpern wird nicht nur eine entscheidende diagnostische Bedeutung zugesprochen, sondern es ist davon auszugehen, dass sie an der Immunpathologie der Zöliakie beteiligt sind. Sie

inhibieren die Ausdifferenzierung der intestinalen Epithelzellen (T84) [Halttunen and Maki 1999], induzieren eine Epithelzellproliferation [Barone, Caputo, Ribecco, Maglio, Marzari, Sblattero, Troncone, Auricchio and Esposito 2007, Halttunen and Maki 1999], steigern die Permeabilität des Epithelverbands, aktivieren Monozyten [Zanoni, Navone, Lunardi, Tridente, Bason, Sivori, Beri, Dolcino, Valletta, Corrocher and Puccetti 2006] und hemmen die Angiogenese, z.B. indem sie die Migration mesenchymaler Zellen behindern [Myrsky, Kaukinen, Syrjänen, Korponay-Szabo, Maki and Lindfors 2008]. Es ist anzunehmen, dass die tTG-Autoantikörper durch eine Interaktion mit membrangebundener tTG in die Aufrechterhaltung und Progression des Mukosaschadens involviert sind [Caputo, Barone, Martucciello, Lepretti and Esposito 2009]. Immunhistochemisch sind epithelial und subepithelial Gliadin-tTG-Komplexe sowie Depots der Anti-tTG-AK nachweisbar [Ciccocioppo, Di Sabatino, Ara, Biagi, Perilli, Amicosante, Cifone and Corazza 2003, Tosco, Maglio, Paparo, Rapacciuolo, Sannino, Miele, Barone, Auricchio and Troncone 2008].

1.6 Problem- und Fragestellung

Die Pathogenese der Zöliakie ist trotz intensiver Forschung noch nicht ausreichend verstanden. Eine Aufklärung der wesentlichen pathogenetischen Bestandteile ist von großem gesellschaftlichem Interesse, da die Zöliakie zu den häufigsten Nahrungsmittelunverträglichkeiten gehört und somit ein großes Kollektiv betroffen ist. Aufgrund einer besseren Kenntnis der Entstehung und Mechanismen der Krankheit könnten alternative Therapie- und Präventionsmöglichkeiten entwickelt werden. Bisher gilt ausschließlich die lebenslange glutenfreie Ernährung als wirkungsvoll. Diese Diät stellt für die Patienten eine erhebliche Belastung dar, weil sie relativ aufwändig und teuer ist. Die Lebensqualität der Patienten ist eingeschränkt, da sie bei vielen gesellschaftlichen Ereignissen durch ihre Krankheit behindert werden. Eine Non-Compliance kann zu schweren Folgen, z.B. Tumorerkrankungen, führen.

Diese Arbeit hat das Ziel, weitere Erkenntnisse des Pathomechanismus der Zöliakie *ex vivo* und *in vitro* zu gewinnen. Der besondere Fokus richtet sich auf den intrazellulären Transportweg der Gliadinpeptide. Diese können durch Goldpartikel bzw. einen Fluoreszenzfarbstoff markiert und die Lokalisation

innerhalb verschiedener markierter Zellkompartimente elektronen- und immunfluoreszenzmikroskopisch eruiert werden. Das Stillen von Säuglingen während des ersten Zufütterns von Gluten scheint einen protektiven Effekt gegenüber der Zöliakie zu haben [Auricchio, Follo, de Ritis, Giunta, Marzorati, Prampolini, Ansaldi, Levi, Dall'Olio, Bossi, Cortinovis and Marubini 1983]. Möglicherweise ist dieser Effekt auf Gliadin bzw. gliadinspezifische Antikörper der Klasse IgA zurückzuführen, die in der Muttermilch nachgewiesen wurden [Ozkan, Ozeke and Meral 2000, Rumbo, Chirido, Anon and Fossati 1998]. Es soll die Frage beantwortet werden, ob durch Inkubation der Biopsien und Zellen mit Serum und den darin enthaltenen IgA der intrazelluläre Transport von toxischen Gliadinpeptiden bis in die späten Endosomen erzielt werden kann. Die Hypothese besagt, dass Gliadinpeptide mit spezifischen Antikörpern polyvalente Komplexe bilden, die intrazellulär bis in späte Endosomen transportiert und anschließend an der basolateralen Zellmembran präsentiert werden. Diese Variation könnte eine wichtige Voraussetzung für die Induktion einer oralen Toleranz darstellen. Die Enterozyten besitzen eine antigenpräsentierende Fähigkeit, die unter anderem eine Lokalisierung der Antigene, in diesem Fall der Gliadinpeptide, in späten Endosomen als Ausgangslage benötigt. Die späten Endosomen enthalten HLA-DR, wodurch eine Antigenpräsentation ermöglicht wird und eine Toleranz gegenüber Gliadin induzierbar ist. Mithilfe der Untereinheit-B des Cholera-toxins ist ein Leiten von Gliadinpeptiden in späte Endosomen gelungen [Zimmer, Fischer, Mothes, Weissen-Plenz, Schmitz, Wieser, Buning, Lerch, Ciclitira, Weber and Naim 2010]. Die vorliegende Arbeit soll eine vergleichbare Modifikation des Transportweges mit Antikörpern erreichen. Bei einem erfolgreichen Ausgang dieser Arbeit könnte der Mechanismus als Basis für die Entwicklung neuer Präventionsmöglichkeiten gegenüber der Zöliakie genutzt werden. Möglicherweise können genetisch disponierte Säuglinge vor dem Auftreten von Symptomen bewahrt werden.

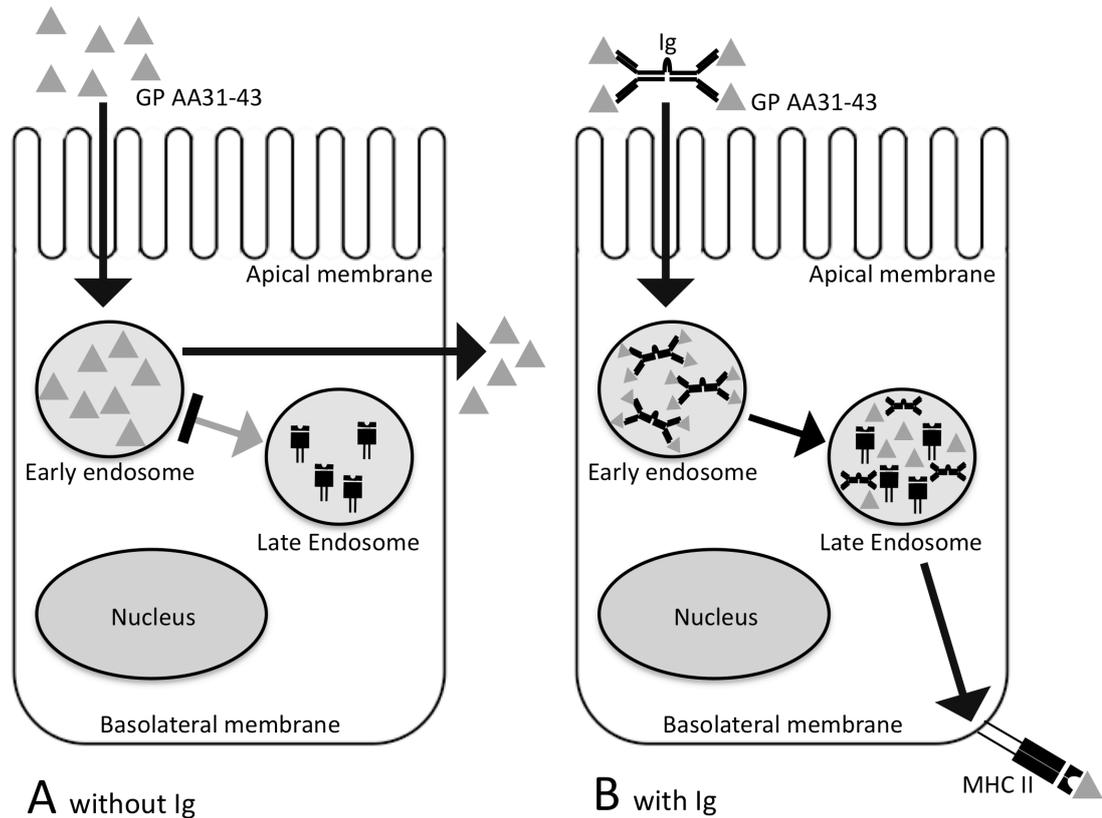


Abbildung 1.10 Schematisches Modell der Hypothese

Gezeigt werden zwei Enterozyten, die das Gliadinpeptid 31-43 an der apikalen Membran endozytieren. Der in Bild A dargestellte Weg ist für toxische Gliadinpeptide beschrieben [Zimmer *et al.* 2010, Zimmer, Naim, Weber, Ellis and Ciclitira 1998, Zimmer, Poremba, Weber, Ciclitira and Harms 1995]. Der Hypothese entsprechend, können komplexgebundene toxische Peptide über das EE hinaus bis in LE transportiert werden (Bild B). LE sind HLA-DR positiv, aus diesem Grund können die Peptide an der basolateralen Membran via MHC-II präsentiert werden und möglicherweise eine orale Toleranz induzieren.

Quelle: Eigene Darstellung

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine experimentelle explorative Studie an Dünndarmbiopsien und an einer intestinalen epithelialen Zelllinie. Durch die Kombination von *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten konnten auf verschiedenen Abstraktionsebenen die jeweiligen Vorteile der Methoden ausgenutzt und sich ergänzend eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.1).

2.2 Kollektiv

In die Studie wurden 14 Patienten eingeschlossen. Davon fungierten acht als Zöliakie-Patienten (Alter $9,24 \pm 2,08$ Jahre; zwei männlich, sechs weiblich) und sechs waren Kontrollpatienten, davon vier mit Diagnosen ohne Darmbeteiligung (Alter $16,95 \pm 8,61$ Jahre; einer männlich, drei weiblich) und zwei Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung/CED/Morbus Crohn (beide 13,7 Jahre alt; einer männlich, einer weiblich). Die Kontrollpatienten hatten serologisch und histologisch keinen Anhalt für eine Zöliakie.

Bei allen Patienten wurde eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie durchgeführt. Dabei wurden Biopsien als Bestandteil der Diagnostik entnommen. Da bei der Zöliakie, wie bei allen entzündlichen Darmerkrankungen, die Ausprägung des Mukosaschadens regional stark abweichen kann, wurden routinemäßig mehrere Proben von verschiedenen Stellen entnommen. Durch die direkte lupenmikroskopische Betrachtung konnten die Biopsien anhand ihres Entzündungsgrades sortiert werden. Biopsien mit schwerwiegenderen Läsionen wurden in die Pathologie gesandt. Die verbleibenden Gewebeproben wurden nicht verworfen, sondern zur Durchführung dieser Studie verwendet. Alle Patienten bzw. deren Sorgeberechtigten wurden über die Verwendung der Biopsien für diese Studie neben der Diagnostik aufgeklärt und waren einverstanden. Der Ethikantrag mit dem Aktenzeichen 157/09 wurde von der Ethik-Kommission des Fachbereiches Medizin der Universität Gießen angenommen.

Da erst durch die Auswertung der Biopsien die Diagnose Zöliakie gestellt werden kann, ist davon auszugehen, dass sich die Patienten bis zu diesem Zeitpunkt

glutenhaltig ernährt haben. Eine glutenfreie Diät wurde erst im Anschluss bei Bedarf empfohlen. Die Diagnosestellung der Zöliakie entsprach den ESPGHAN-Kriterien. Die Schweregradeinstufung der Biopsien reichte von Marsh 2 bis Marsh 3C.

2.3 Chemikalienauflistung

Tabelle 2.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
• Accutase	• Thermo Electron, Victoria, Australien
• AEC-Substrat	• Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• Chloroform	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Chymotrypsin	• Roth, Karlsruhe, Deutschland
• DMEM (Glc 1g/l; ohne L-Glutamin)	• PAA, Pasching, Österreich
• FKS	• Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• Formvar	• Electron Microsc. Sc., Washington, USA
• Gliadin	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Glutamin	• PAA, Pasching, Österreich
• Gluten	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Glycerol	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Glycin	• Serva, Heidelberg, Deutschland
• Goat-Serum	• Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• HCl	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Höchst-Farbstoff 33258	• Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• Methanol	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Methylcellulose	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Mowiol 4-88	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Na ₂ CO ₃	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• NaOH	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Natriumtetraborat	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Paraformaldehyd	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• PBS	• Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• Penicillin-Streptomycin	• Biochrom, Berlin, Deutschland
• Pepsin	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Pipes-Puffer	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• ProLong-Gold	• Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• PVP-10/Polyvinylpyrolidone	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Pyronin	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Saccharose	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Tissue Tec	• Takura, Tokyo, Japan

• Toluidinblau	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Tris-Puffer	• Roth, Karlsruhe, Deutschland
• Triton X-100	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Trockenmilchpulver	• Roth, Karlsruhe, Deutschland
• Trypsin (für Digeste)	• Sigma, Taufkirchen, Deutschland
• Trypsin (Zellkultur) 0,25%-EDTA	• Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
• Tween	• Merck, Darmstadt, Deutschland
• Uranylacetat	• Merck, Darmstadt, Deutschland

2.4 Slot-Blot-Verfahren

2.4.1 Methodenbeschreibung des Slot-Blot-Verfahrens

Die zu analysierende Lösung wurde auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und mittels Vakuum in die Membran transferiert. In Analogie zum Western-Blot wurden für den Slot-Blot Antikörper gegen die Zielproteine eingesetzt, welche über einen zweiten markierten AK sichtbar gemacht wurden. Es konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob der AK an ein Antigen innerhalb der zu untersuchten Lösung gebunden hat und anhand der Stärke der Färbung lies sich die Antigenmenge semiquantitativ abschätzen. Der Grad der Färbung korrelierte proportional zur quantitativen Antikörperbindung.

2.4.2 Material für die Versuchsdurchführung

AEC-Substrat

- AEC-Kit (3-Amino-9-Ethylcarbazol) der Fa. Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Der rote Farbstoff der Endreaktion entsteht durch Interaktion des Zweikomponentensystems, bestehend aus AEC-Chromogen und AEC Substrat mit der Horseradish-peroxidase (HRP).

Blockmilch

- Die Blockmilch besteht aus 5 % Trockenmilchpulver, in PBST gelöst

Frazers Fraction/FF [Frazer, Fletcher, Ross, Shaw, Sammons and Schneider 1959]

- 100 g Gluten und 0,5 g Pepsin zu 1 l 1 M HCl-Lösung (pH 1,8) zufügen
- Bei 37°C für 4 h unter ständigem Rühren inkubieren
- pH-Wert Titration auf 7,8 durch etwa 100 ml einer 1 M NaOH-Lösung
- Einbringen von 0,5 g Trypsin

- Erneut bei 37°C für 4 h unter ständigem Rühren inkubieren
- Durch Zugabe von etwa 50 ml 1 M HCl-Lösung pH-Wert auf 4,5 senken, wobei es zur Ausbildung eines Niederschlags kommt
- Zentrifugation bei 2.500 1/min: Überstand entspricht Frazer's Fraction III. Verdünnungen wurden mit Medium durchgeführt

Gliadin

- Natives Gliadin der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

Medium/DMEM

- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (low Glucose 1 g/l; ohne L-Glutamin; mit 25 mM HEPES) als Ausgangslösung. Zugabe von 1 % Penicillin-Streptomycin. Für die Inkubation der Biopsien wird auf FKS und Glutamin verzichtet.

Membran

- Cellulosenitrat- (≅Nitrocellulose-) Membran der Firma Whatman (Dassel, Deutschland)

PBST

- Um PBST zu erhalten, wird PBS (siehe 2.3.4) 5 % Tween hinzugefügt

Pepsin-Trypsin-Chymotrypsin-Digest/PTC [Bronstein, Haeffner and Kowlessar 1966]

- 100 g Gliadin in 1 l 0,2 N HCl-Lösung (pH 1,8) mit 2 g gereinigtem Pepsin für 2 h bei 37°C andauern
- Mit 0,2 N NaOH auf pH-Wert 8,0 einstellen
- Hinzufügen von 2 g gereinigtem Trypsin
- Für 4 h bei 37°C kräftig rühren
- 2 g gereinigtes Chymotrypsin hinzufügen und 2 h bei 37°C rühren
- Ggf. pH-Wert mit HCl oder NaOH auf 8,0 korrigieren

PT

- Kommerzielles Pepsin-Trypsin angedautes Gliadin von Zedira (Darmstadt, Deutschland)

Transferpuffer

- 10 x Puffer: 30 g Trispuffer-Pulver und 145 Glycin in 1.000 ml dH₂O lösen.
- 20 ml Produkt mit 140 ml dH₂O und 40 ml Methanol vermengen

2.4.3 Versuchsdurchführung des Slot-Blot-Verfahrens

Für die Slot-Blot-Untersuchung wurden je 3 und 30 µg Protein der Gliadinlösungen und 150 µl der zu analysierenden Medien ausgetestet. Die nachfolgende Tabelle listet die Bestückungen der einzelnen Slots im Detail auf:

Tabelle 2.2 Analysesubstanzen im Slot-Blot-Verfahren

Slot	Inhalt	Konzentration	Menge
1	DMEM	pur	150 µl
2	DMEM + 1 % Gln	pur	150 µl
3	DMEM + 10 % FKS	pur	150 µl
4	DMEM + 10 % FKS + 1 % Gln	pur	150 µl
5	FF	0,45 µg/µl	66,7 µl für 30 µg Protein
6	FF	0,09 µg/µl	33,3 µl für 3 µg Protein
7	PTC	0,3 µg/µl	100 µl für 30 µg Protein
8	PTC	0,1 µg/µl	30 µl für 3 µg Protein
9	PT	1 µg/µl	30 µl für 30 µg Protein
10	PT	0,1 µg/µl	30 µl für 3 µg Protein
11	Gliadin in C ₂ H ₅ OH	0,5 µg/µl	60 µl für 30 µg Protein
12	Gliadin in C ₂ H ₅ OH	0,1 µg/µl	30 µl für 3 µg Protein

Der Primär-AK, der bei dieser Methode sein Reaktionsverhalten mit den verschiedenen Analyselösungen herausstellen sollte, war der polyklonale α-Gliadin-AK (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Er wurde in einer Konzentration von 1:1.000, mit Blockmilch verdünnt, bei 4°C über Nacht auf einem Rüttler inkubiert. Um den Versuchsansatz vor Austrocknung zu schützen, wurde der Ansatz in eine Folie eingeschweißt. Als Sekundärantikörper wurde das F(ab')₂-Fragment eines goat-α-rabbit IgG (H+L), konjugiert mit HRP (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), in einer Verdünnung von ebenfalls 1:1.000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Sekundär-AK wurde durch das AEC-Substrat (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sichtbar gemacht. Durch die Reaktion des Substrats mit der HRP entstand der rot sichtbare Farbstoff. Folgend sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung des Slot-Blot-Verfahrens aufgelistet:

- Membran 5 min. in Transferpuffer einweichen
- Membran in mit dH₂O gespülte Kammer einspannen
- Proben nach Probenplan in die Slots laden
- Vakuum anlegen (Wasserstrahlpumpe) → Probentransfer
- Membran 2 mal 5 min. in PBST waschen
- 1 h in Blockmilch blockieren
- Primär-AK über Nacht bei 4°C auf der Membran, eingeschweißt in Folie, inkubieren
- Membran 2 mal 5 min. in PBST waschen
- Sekundär-AK für 1 h bei RT auf der Membran inkubieren
- Membran 2 mal 5 min. in PBST waschen
- AEC-Substrat auf Membran inkubieren, bis der Hintergrund durchschlägt, d.h. die Membran sich unspezifisch zu färben beginnt
- Reaktion mit dH₂O stoppen
- Membran trocknen und möglichst zeitnah Bilder erstellen (Membran verfärbt sich)

2.4.4 Versuchsauswertung des Slot-Blot-Verfahrens

Auf der Cellulosenitratmembran wurde durch die Reaktion der HRP das rot erscheinende Chromogen sichtbar. In den Slots mit Antikörperreaktionen hoher Affinität war eine kräftigere Rotfärbung zu erkennen. Dokumentiert und digitalisiert wurden die Ergebnisse mit einer digitalen Fotokamera D40X (Nikon, Tokyo, Japan).

2.5 Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie

2.5.1 Methodenbeschreibung des Kryoimmunogold-Labeling

Die Kryo-Immunogold-Technik wird seit vielen Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet. Die Methode stammt von Tokuyasu [Tokuyasu 1973] und wurde in ihren Details mehrfach variiert [Griffiths, McDowall, Back and Dubochet 1984, Tokuyasu 1978]. Die Bearbeitung des Gewebes beginnt mit einer milden chemischen Fixierung mittels Aldehydlösungen, wie zum Beispiel Paraformaldehyd. Nach Abschluss einer Kryoprotektion durch eine hochkonzentrierte Saccharoselösung kann das Präparat in flüssigem Stickstoff kryofixiert werden.

Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die erhaltene Antigenität des Gewebes, welche bei anderen Techniken häufig durch starke Fixantien, Dehydrierungs- oder

Einbettungsschritte herabgesetzt wird. Dennoch bleibt bei den Ultradünnschnitten eine gute Ultrastruktur der Gewebe erhalten. Zur Antigenmarkierung durch Goldpartikel werden Primärantikörper gegen das Zielantigen benutzt und weitere goldmarkierte gegen den Wirt der Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper binden an die Primärantikörper. Die Goldmarkierungen erscheinen im Transmissionselektronenmikroskop als elektronendichte Punkte. Durch den Einsatz von Antikörpern aus verschiedenen Wirten und mit unterschiedlichen Größen gekoppelten Goldes können zeitgleich mehrere Antigene dargestellt werden.

2.5.2 Material für die Biopsiegewinnung/-verarbeitung

Paraformaldehyd/Pipes 5 %

- Lösung A: Paraformaldehyd
- 100 ml H₂O auf 60°C erwärmen
- 10 g Paraformaldehyd hinzugeben
- Mit 1 M NaOH-Lösung titrieren, bis die Lösung klar ist
- Lösung B: Pipes-Puffer (0,4 M)
- 12,096 g Pipes-Puffer in 80 ml H₂O lösen
- Das trübe Zwischenprodukt mit hochkonzentrierter NaOH (5 M) auf pH 7,0 einstellen, wodurch es klar wird
- Anschließend mit H₂O auf ein Volumen von 100 ml auffüllen
- Die Lösungen A und B werden 1:1 gemischt und bei -20°C gelagert

PVP-Saccharose

- 30 g PVP ad 24 ml H₂O und 6 ml 1,1 M Na₂CO₃ unter Rühren zugeben
- Wenn das PVP vollständig aufgelöst ist, 70 ml einer 2,3 M Saccharoselösung hinzufügen und danach bei RT über Nacht rühren
- Vor der Verwendung mindestens eine Woche bei +4°C stehen lassen

Saccharose 2,3 M

- 78,72 g Saccharose werden in 100 ml PBS gelöst; Lagerung bei +4°C

Serum

- Serum von serologisch auf Zöliakie positiv getesteten Patienten. Die Titer des Anti-Gliadin-IgA betragen 121±63 U/ml, die des Anti-Gliadin-IgG 108±80 U/ml

2.5.3 Material für die Versuchsdurchführung

Elektronenmikroskopienetze/Grids

- Nickel mit Formvar-/Kohlefilm, 3,05 mm Durchmesser, 100-mesh Typ S162N7 (Plano, Wetzlar, Deutschland)
- Kupfer-Palladium, 3,05 mm Durchmesser, 100-mesh (Plano, Wetzlar, Deutschland), mit folgender Methode befilmt:
 - Flachbürette mit Chloroform durchspülen,
 - 1 % Formvarlösung einfüllen
 - Geputzten Objektträger (OT) für 5 Sekunden in Bürette stellen
 - Formvar über exakt 10 Sekunden ablaufen lassen (Filmbildung)
 - OT entnehmen und trocknen
 - Film auf dem OT mit einer Rasierklinge umschneiden
 - OT angehaucht und leicht schräg in dH₂O absenken
 - Netze mit Kupferseite oben auf den schwimmenden Film legen
 - Mit einem Etikett beklebten Objektträger auf den Film drücken, der sich darauf samt Netze an den Objektträger legt
 - Abschließend die Netze trocknen lassen

FKS/Fetales Kälberserum

- FKS wird mittels PBS zu einer 5 %- bzw. 10 %-igen Lösung angesetzt

Formvar 1 %

- In 200 ml Chloroform werden 2 g Formvar gelöst

Kryotom

- Die Ultra- und Semidünnschnitte wurden mit einem Kryotom Modell Leica EM UC6 mit der Kryokammer Leica EM FC6 der Firma Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) hergestellt. Für Semidünnschnitte und zum Zurechttrimmen des Präparateblocks wurde ein Glasmesser verwendet, welches mit dem Messerbrecher KMR2 (ebenfalls Leica Microsystems GmbH) mit einem Schneidflächenwinkel von 45° gebrochen wurde. Zum Schneiden der Ultradünnschnitte wurde ein Schneidediamant Modell Cryo-Immuno der Firma Diatome AG (Biel, Schweiz) mit einem Schneidewinkel von 35° benutzt

Lichtmikroskop

- Begutachtung der Semidünnschnitte mit einem Lichtmikroskop von Hund (Wetzlar, Deutschland) mit den Objektiven 10x- und 40x-Vergrößerung

Methylcellulose 2 %

- 100 ml dH₂O auf 95°C erhitzen und unter ständigem Rühren 2 g Methylcellulose hinzufügen
- Ansatz 3 Tage bei +4°C rühren und anschließend bei 300.000 x g für 90 min. bei ebenfalls +4°C zentrifugieren
- Entstehende Pellets entfernen; Lagerung bei +4°C

PBS

- Die Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung kann aus Konzentraten oder Tabletten erfolgen. Die Endlösung enthält 0,8 % NaCl, 0,2 % KCl, 8 mM Na₂HPO₄ und 1,5 mM K₂HPO₄
- Die Lösung muss mittels HCL bzw. NaOH auf pH 7,4 eingestellt werden

Toluidinblau

- 2 g Toluidinblau in 200 ml dH₂O lösen
- 2 g Natriumtetraborat in weiteren 200 ml dH₂O lösen
- 0,5 g Pyronin mit 50 ml dH₂O vermengen
- Alles vermischen und vor Gebrauch filtrieren; Lagerung bei RT

Uranylacetat, sauer, 4 %

- 2 g Uranylacetat werden in 50 ml dH₂O gelöst
- Gemisch 3 bis 4 mal filtrieren; Lagerung bei +4°C

2.5.4 Material für die Versuchsauswertung

Die Auswertung erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 410 (EM) von Philips (Eindhoven, Niederlande). Zur Dokumentation wichtiger mikroskopierter Bereiche wurden Fotos mit Imago-EM 23- (Madison, Wisconsin, USA) oder Kodak 4489- (Rochester, New York, USA) Elektronenmikroskopiefilmen (jeweils 8,3 x 10,2 cm) gemacht. Ausgewählte Negative wurden mit einem Hewlett-Packard-Scanner G4050 (Böblingen, Deutschland) digitalisiert.

2.5.5 Biopsieverarbeitung

Die Duodenal-Biopsien wurden in DMEM unter einem Stereomikroskop (Motic, Wetzlar, Deutschland) in dreifacher Vergrößerung begutachtet und in mehrere, etwa gleich große Stücke zerteilt, die jeweils einen Abschnitt mit apikaler Membran bzw. mikroskopisch sichtbaren Zotten enthielten. Diese Biopsiestücke wurden auf verschiedene Inkubationsansätze verteilt. Der Nativansatz enthielt Paraformaldehyd, ein weiterer Ansatz Frazer's Fraction 1:20 und der dritte Frazer's Fraction 1:20 und 1:5 gepooltes Zöliakieserum. Die Inkubation wurde für 60 min. in einem Wasserbad bei 37°C schwenkend durchgeführt. Im Anschluss wurden die Biopsiestücke für zwei Stunden bei RT in PFA eingelegt, nachdem die Inkubationsflüssigkeit drei Mal mit PFA abgewaschen wurde. Zur Kryoprotektion wurden die Biopsien über Nacht mit PVP-Saccharose infiltriert. Abschließend wurden die Biopsien unter dem Stereomikroskop mit der apikalen Membran von der Objektträgerplatte abweisend in Tissue-Tec aufgesetzt. Bei guter Ausrichtung wurde der Kryotom-Objektträger in flüssigen Stickstoff getaucht, damit die Biopsie aushärten und bei -196°C in Lagerdewars langzeitkonserviert werden konnte.

2.5.6 Herstellung der Semi- und Ultradünnschnitte

Die Schnitte für die Kryoimmunogold-Versuche wurden bei einer Kammer- und Präparatblocktemperatur von -110°C und einer Messertemperatur von -100°C hergestellt. Die 160 nm dicken Semidünnschnitte wurden mit einer mit 2,3-molarer Saccharose benetzten Öse aus der Kryokammer aufgenommen und auf einen Objektträger transferiert, getrocknet und daraufhin mit einem Tropfen Toluidinblau benetzt. Nach erneutem Trocknen wurden die Farb- und Saccharosereste mit dH₂O abgespült. Im Anschluss konnten die gefärbten Semidünnschnitte im Lichtmikroskop bei Vergrößerungen von 10-40 x begutachtet werden.

Für das Immunlabeling wurden Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 55 nm analog zu den Semidünnschnitten hergestellt. Jedoch wurden die Schnitte nicht auf OT, sondern auf die Elektronenmikroskopie-Netze aufgebracht. Diese Netze wurden mit den Schnitten nach unten auf der Oberfläche in PBS auf Eis schwimmend bis zum Versuchsbeginn gelagert.

2.5.7 Versuchsdurchführung des Kryoimmunogold-Labeling

Tabelle 2.3 Verwendete Antikörper für das Kryo-Immunolabeling

Antikörper	Wirt/Klonalität	Firma	Konzentration
<u>Primärantikörper</u>			
R5	Mouse/m	Operon, Barcelona, Spanien	1:40
WB 6/8	Mouse/m	Ciclitira, London	1:10
α -Gliadin	Rabbit/p	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	1:30
<u>Primär-AK für Doppelmarkierungen</u>			
LAMP-2 / CD 107b	Mouse/m	BD Pharmingen, New Jersey, USA	1:5
Cathepsin-D	Rabbit/p	Dako, Hamburg, Deutschland	1:40
<u>Sekundärantikörper</u>			
Goat α Mouse 6 nm	Goat	Jackson Immunos., Suffolk, GBR	1:2,5
Goat α Rabbit 12 nm	Goat	Jackson Immunos., Suffolk, GBR	1:40
Goat α Mouse 12 nm	Goat	Jackson Immunos., Suffolk, GBR	1:5
Goat α Rabbit 6 nm	Goat	Jackson Immunos., Suffolk, GBR	1:50

Die Tabelle zeigt die eingesetzten AK mit den verwendeten Konzentrationen auf. Die Klonalität ist mit „m“ für monoklonal und mit „p“ für polyklonal angegeben.

Quelle: Eigene Darstellung

Die Primär-AK (siehe Tabelle 2.3) wurden grundsätzlich in der Doppelmarkierungstechnik eingesetzt. Diese Technik ermöglicht die Markierung eines Zellkompartiments zusätzlich zu anderen Antigenen. In dieser Studie wurden LE beziehungsweise LY mit Antikörpern gegen die Protease Cathepsin-D und das lysosomale Membranprotein CD107b/LAMP-2 mit 6 nm großen Goldpartikeln markiert. Auf diese Weise konnte die Lokalisation von dem Zielantigen Gliadin in Relation zu den Endosomen und Lysosomen beurteilt werden. Dazu wurden drei verschiedene Antikörper gegen Gliadin(-peptide) verwendet (R5, WB 6/8 und p- α -Gliadin), die jeweils mit Goldmolekülen mit 12 nm Durchmesser gekoppelt waren. Für diese Doppelmarkierungstechnik mussten die beiden Zielantigene aus verschiedenen Wirten stammen, damit der goldkonjugierte sekundäre Antikörper wirtsspezifisch an den Primärantikörper binden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde stets ein anti-Maus-AK mit einem anti-Kaninchen-AK eingesetzt, wobei je einer gegen Gliadin und der andere gegen Cathepsin-D bzw. LAMP-2 gerichtet waren.

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörperkombinationen für das Kryoimmunolabeling

Netz	Gliadin-AK	Doppelmarkierung	12 nm-Sek.-AK	6 nm-Sek.-AK
1,2	R5	Cathepsin-D	Goat α mouse	Goat α rabbit
3,4	WB 6/8	Cathepsin-D	Goat α mouse	Goat α rabbit
5,6	α -Gliadin	LAMP-2	Goat α rabbit	Goat α mouse

Für jeden der Inkubationsansätze wurden für jeden Patienten auf jeweils sechs Netzen mehrere 55 nm dicke Ultradünnschnitte aufgenommen. Diese Netze wurden dann für fest definierte Zeiten auf Tropfen untenstehender Flüssigkeiten gegeben. Die Tropfen befanden sich in Mulden, die in Parafilm gedrückt wurden. Die Versuchsdurchführung folgte dem Protokoll:

1. 15 min. Blockierung unspezifische AK mit 10 % FKS
2. 45 min. Inkubation mit primärem AK (in 5 % FKS verdünnt; 5 μ l je Netz)
3. 15 min. Abwaschen von ungebundenem AK über fünf Tropfen PBS
4. 45 min. Inkubation mit sekundärem AK (in 5 % FKS verdünnt; 5 μ l je Netz)
5. 30 min. Abwaschen von ungebundenem AK über sechs Tropfen PBS
6. 5 min. Abwaschen von ungebundenem AK über fünf Tropfen dH₂O
7. 5 min. Kontrastierung und Schnittprotektion vor Austrocknung über drei Tropfen Uranylacetat (10 %, in Methylcellulose verdünnt) auf Eis
8. Netze auf Platinösen aufnehmen und den Überschuss an Uranylacetat/Methylcellulose auf Filterpapier im 45° Winkel abstreifen, Netze lufttrocknen

2.5.8 Versuchsauswertung der Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie

Zum Auswerten der Versuche wurden auf allen Grids mehrere Schnitte bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet. Zur Identifikation und Lokalisationsanalyse der Goldpartikel wurden im Wesentlichen Vergrößerungen zwischen 13.300-fach und 33.300-fach verwendet. Neben einer semiquantitativen Analyse wurde das besondere Augenmerk auf eine eventuelle Kolo-kalisationen der verschieden großen Goldmarkierungen gerichtet, wodurch eine genaue Differenzierung der gliadinenthaltenden Vakuolen ermöglicht wurde.

Zur objektiven Quantifizierung des Goldlabels wurden auf jedem Netz beliebige Schnitte, die weder von der Schnittdicke, -gleichmäßigkeit oder aufgrund

von Artefakten auffällig waren, ausgezählt. Diese Schnitte wurden nach einem konstanten mäanderförmigen Muster durchmikroskopiert (siehe Abbildung 2.1).

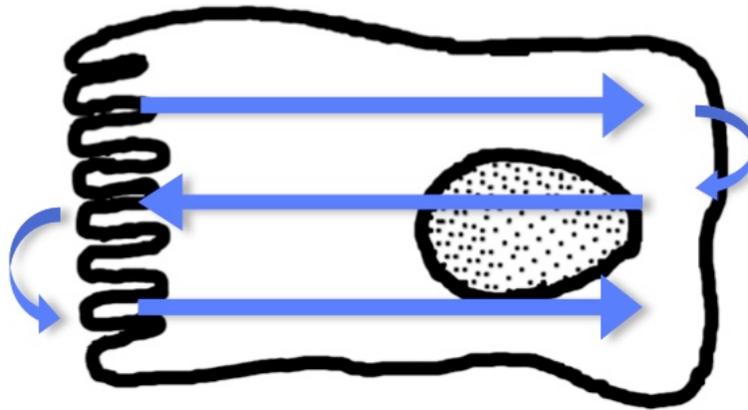


Abbildung 2.1 Mäanderförmige Präparateführung zum Quantifizieren

Für eine standardisierte Quantifizierung wurde schematisch entlang der Enterozyten mikroskopiert. Anhand der Pfeile zeigt die Abbildung den Verlauf des mikroskopischen Sichtfelds. So konnte jeder Bereich der Enterozyten exakt einmal bewertet werden.

Quelle: Eigene Darstellung

Das relative Vorkommen der 12 nm Goldpartikel markierend für Gliadin wurde für die Zellkompartimente für jedes Netz separat bestimmt und dokumentiert. Dies waren im Einzelnen (Abkürzungen in Klammern):

- | | |
|---|---------|
| ▪ Frühe Endosomen (Cathepsin-D bzw. LAMP-2 negativ) | ▪ (EE) |
| ▪ Späte Endosomen/Lysosomen (Cathepsin-D bzw. LAMP-2 positiv) | ▪ (LE) |
| ▪ Nuklei | ▪ (N) |
| ▪ Golgi-Apparate | ▪ (G) |
| ▪ Mitochondrien | ▪ (Mi) |
| ▪ Apikale Membran | ▪ (AM) |
| ▪ Basolaterale Membran | ▪ (BL) |
| ▪ Zytosol | ▪ (Cyt) |

Die Auswertung erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop EM 410 (EM) von Philips (Eindhoven, Niederlande). Es wurden jeweils 100 12 nm durchmessende Goldpartikel ausgezählt, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen. So konnte die relative Labelverteilung für die einzelnen subzellulären Kompartimente errechnet und zwischen den Kollektiven verglichen werden. Da die Labelstärke inter- und intraindividuellen Schwankungen unterliegt, ist es notwendig, die relativen Goldlabelverteilungen anzugeben. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Bestimmung der Labeldichte mittels Zählraster an Fotos verzichtet, um objektiv beurteilen zu können. Bei letztgenanntem Verfahren ist die Auswahl der

fotografierten Stellen subjektiv zu stark beeinflussbar und die Labeldichte unterliegt zu starken Schwankungen. Zur Dokumentation wichtiger mikroskopierter Bereiche wurden Fotos mit Imago-EM 23- (Madison, Wisconsin, USA) oder Kodak 4489- (Rochester, New York, USA) Elektronenmikroskopiefilmen (jeweils 8,3 x 10,2 cm) gemacht. Ausgewählte Negative wurden mit einem Hewlett-Packard-Scanner G4050 (Böblingen, Deutschland) digitalisiert.

Zur Evaluation der Spezifität der AK wurde die Labeldichte auf frühen Endosomen als Positivkontrolle und auf Zellkernen und Mitochondrien als Negativkontrolle bestimmt. Dazu wurden je AK-Kombination zwölf Fotos mit folgender Formel ausgewertet [Griffiths and Hoppeler 1986]:

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

(MD = Markierungsdichte, GP = Anzahl der Goldpartikel, VG = Vergrößerungsfaktor, P = Anzahl der Kreuzungspunkte, d = Abstand der Gitterlinien)

2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Methodenbeschreibung der Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei dem immunhistochemischen Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen oder Gewebebestandteile mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die an Antikörper gekoppelt waren. Zur Visualisierung wurde ein markierter sekundärer AK gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers eingesetzt. Weiterhin wurden für die Inkubation Gliadinpeptide verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lissamin-Rhodamin gekoppelt sind, welcher durch Laseremission der Wellenlänge 574 und 602 Nanometer angeregt rot erschien. Die Fluoreszenzsignale konnten unter Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopen sichtbar gemacht werden. Durch den Einsatz verschiedener Farben der Fluorochromen konnten mehrere Antigene in einem Versuch markiert werden und durch den Einsatz spezieller Farbfilter konnten alle Farben isoliert oder im sogenannten Overlay bzw. Merge zeitgleich betrachtet werden.

2.6.2 Material für die Zellkulturpflege

Alle Materialien und Lösungen für die Zellkultur wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder, falls möglich, bei 100°C für eine Stunde sterilisiert.

Inkubator

- Thermo Fischer Scientific Hera-Cell 150 (Waltham, Massachusetts, USA)

Kryoprotektionsmedium

- Einfriermedium aus 10 % Dimethylsulfoxid (DSMO) in FKS

Medium/DMEM

- Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (high Glucose/4500 mg/l) mit 500.000 U/l Penicillin, 10 mg/l Streptomycin, 1 % Glutamin sowie 10 % fetalem Kälberserum (FKS)

Sterilbank

- Steril-VBH Compact (VWR, Wien, Österreich)

Untertisch-Lichtmikroskop

- Zeiss Axiovert 40C (Oberkochen, Deutschland), 10x-Objektiv

Zellkulturschalen

- Polystyrene, Falcon (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), Ø 30, 60 und 100 mm

Zentrifuge

- Thermo Fischer Scientific ALC PK130 (Waltham, Massachusetts, USA)

2.6.3 Material für die Versuchsdurchführung

Coverslips

- Coverslips von der Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH (Braunschweig, Deutschland), Ø 12 mm, Stärke Nr. 1

Gliadinpeptide

- AA-Gliadinpeptide P31-43 (Sequenz: LGQQQPFPPQQPY) und P57-68 (Sequenz QLQPFPQPQLPY) synthetisiert von Inbios (Neapel, Italien)
- Beide Peptide wurden in einer mit Lissamin-Rhodamin gekoppelten Form verwendet (P31-43liss bzw. P57-68liss)

Höchst-Farbstoff

- 50-fach konzentrierter Höchst-Farbstoff 33258 wird in Aliquots bei -20°C gelagert. Verdünnung mit PBS. Lagerung bei +4°C im Dunkeln

Mowiol-Mounting-Medium

- 6 g Glycerol in 50 ml Falcon-Röhrchen abwiegen
- 2,4 g Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) hinzufügen
- 6 ml dH₂O mit einrühren, 2 h bei RT vermischen
- 12 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) hinzugeben
- Zum Auflösen des Mowiol für 10 min. (bei Bedarf auch länger) im 50-60°C warmen Wasserbad erwärmen
- 20 min. mit 5.000 x g zentrifugieren, um Schwebstoffe zu entfernen
- Überstand aliquotieren und bei -20°C lagern

Paraformaldehyd 3 %:

- 100 ml PBS für 30 min. im Wasserbad auf 60°C erwärmen
- 3 g Paraformaldehyd hinzufügen (im Abzug)
- Weitere 30 min. in Wasserbad erwärmen (dunkel halten!)
- Mehrfach schütteln (klare Flüssigkeit entsteht)
- Aliquotieren und einfrieren

Triton X-100

- 10 %-Lsg. von Sigma mit PBS auf Konzentration von 0,15 % verdünnen

2.6.4 Material für die Versuchsauswertung

Die Präparate wurden mit einem Laser-Scanning-Konfokalmikroskop LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer 63-fachen Vergrößerung ausgewertet. Als Laserquelle dienten zwei Argon-Laser mit den Emissionswellenlängen von 458, 477, 488 bzw. 514 nm und ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm. Um Interferenzen zwischen den Spektren zu vermeiden, wurden die Laser separat eingeschaltet. Die grünen und roten Emissionen wurden durch einen dichromatischen Splitter (FT560) aufgeteilt und mit einem 515-540 nm Bandpassfilter für Grün bzw. einem >610 nm Passfilter für Rot gefiltert. Die Auswertung, die statistische Analyse und die Kolokalisationsberechnung erfolgten mit der Zeiss-AIS-Software (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

2.6.5 Verwendete Zelllinie

Die verwendete Zelllinie Caco-2 hat die Eigenschaften von adhärennten Epithelzellen. Die Zellen wurden von einem primären Kolonkarzinom eines männlichen, 72 Jahre alten Kaukasiers isoliert. Das Wachstum in der Zellkultur war

zunächst inselförmig und in späteren Stadien war die gesamte Fläche von einem dichten Zellrasen besiedelt. In diesem konfluenten Stadium veränderten die Zellen ihre Eigenschaften. Sie differenzierten aus und bildeten durch Tight-Junctions einen dichten Epithelverband. Es entstand die für Enterozyten typische Polarität mit apikalen und basolateralen Membranen. Ein Überwuchern wurde vermieden, sodass ein dichtes Monolayer entstand.

2.6.6 Pflege der Zellkultur

Die Zellen wurden in einem Wärmeschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und bei 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Jegliche Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Während der Kultivierungsphasen fand alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel statt. Weiterhin wurde die Unversehrtheit der Zellen mit einem Untertischlichtmikroskop geprüft, zum Beispiel auf erhöhte Ablöseraten, Verunreinigungen oder starke Zelldeformierungen.

Bei präkonfluentem Zellwachstum wurden die Kulturschalen gesplittet. Die Arbeitsabläufe dafür waren wie folgend aufgeführt:

- 60 mm (100 mm) Zellkulturschalen mit 1,5 ml (2,5 ml) Trypsin waschen
- 1,5 ml (2,5 ml) Trypsin auf die Zellen geben
- 5 min. bei 37°C inkubieren
- Mit DMEM abstoppen und in 5ml Pipette gründlich resuspendieren
- In Falcon-Röhrchen 5 min. bei 1.500 U/min. zentrifugieren
- Überstand absaugen und verwerfen
- Pellet in 1 ml DMEM gründlich resuspendieren und benötigte Menge Medium hinzufügen
- Zellen in 4-5 ml Medium pro 60 mm (bzw. 5-7 ml pro 100 mm) Zellkulturschale aufnehmen und entsprechend auf die Schalen verteilen

Die Zellkulturen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerkonserviert werden. Dazu musste ein Einfriermedium zur Kryoprotektion aus 10 % Dimethylsulfoxid (DSMO) in FKS angesetzt werden. Das Einfriermedium wurde 1:1 mit der Zellsuspension gemischt, in Kryoröhrchen gegeben und in Isopropanol für acht bis zwölf Stunden bei -80°C gekühlt. Das Isopropanol gewährleistete ein

schonendes, langsames Einfrieren mit einem Temperaturabfall von etwa 1°C/min. Anschließend konnten die Kryoröhrchen in Dewargefäße mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Reaktivieren von eingefrorenen Zellen mussten sie möglichst rasch im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Nach dem Abzentrifugieren des zytotoxischen DMSO wurden die Zellen in das Kulturmedium überführt und resuspendiert. Bevor weitere Experimente durchgeführt werden konnten, sollten die Zellen einige Tage kultiviert und gegebenenfalls auch gesplittet werden, damit sie sich einem normalen Zellzyklus anpassen konnten.

2.6.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mithilfe einer Neubauer-Improved-Zählkammer durchgeführt. Ein angehauchtes Deckglas wurde der Kammer angedrückt und zentralwärts geschoben, bis Newtonsche Ringe erschienen. Anschließend wurde die Kammer mit 10 µl einer 1:10 Toluidinblau-Zellsuspensions-Mischung befüllt. Gezählt wurden alle Zellen in vier oder acht Gruppenquadraten. Zellen mit einer kompletten Zellfärbung wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt, da dies ein Zeichen für avitale Zellen ist. Aus den Summen der Zählung der Gruppenquadrate wurde das arithmetische Mittel errechnet und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zellzahl} = \text{Zellzahl/Quadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Menge in } \mu\text{l} \times \text{Neubauer-Koeffizient (10}^4\text{)}$$

2.6.8 Versuchsdurchführung der Immunfluoreszenzexperimente

Etwa 5×10^3 Zellen/cm² Caco-2-Zellen wurden als Ausgangsmaterial auf Glas-Coverslips ausgesäht. Sobald die Coverslips zu 50-90 % konfluent besiedelt waren, konnten sie für Experimente verwendet werden. Für die Versuchsdurchführung wurden die Coverslips in Multiwellplatten mit Gliadinpeptiden inkubiert. Die verwendete Zelllinie Caco-2 hat die Eigenschaften von adhären Epithelzellen. Die Zellen wurden von einem primären Kolonkarzinom eines männlichen, 72 Jahre alten Kaukasiers isoliert. Das Wachstum in der Zellkultur war zunächst inselförmig und in späteren Stadien war die gesamte Fläche von einem dichten Zellrasen besiedelt. In

diesem konfluenten Stadium veränderten die Zellen ihre Eigenschaften. Sie differenzierten aus und bildeten durch Tight-Junctions einen dichten Epithelverband. Es entstand die für Enterozyten typische Polarität mit apikalen und basolateralen Membranen. Ein Überwuchern wurde vermieden, sodass ein dichtes Monolayer entstand.

Die Details der Peptidinkubation veranschaulicht Tabelle 2.5.

Tabelle 2.5 Peptidstimulation der Caco-2-Zellen

Stimulation	Peptid ^{+Lissamin-R.}	Zeit (in Minuten)
P31-43 Pulse	70 µg/ml	20 Stimulation
P57-58 Pulse	70 µg/ml	20 Stimulation
P31-43 Chase	70 µg/ml	20 Stimulation + 180 in DMEM
P57-58 Chase	70 µg/ml	20 Stimulation + 180 in DMEM

Das Early-Endosome-Antigen (EEA1) wurde zur Markierung der frühen Endosomen und LAMP-2 zur Darstellung der späten Endosomen eingesetzt. Für Kernfärbungen wurde der Höchst-Farbstoff 33258 benutzt. Dieser membrangängige, fluoreszierende Bisbenzimid-Farbstoff bindete spezifisch an Adenin-Thymin-Regionen der DNA mit resultierendem Wechsel des Emissionsmaximums von 500 zu 460 nm, welches als blaues Signal sichtbar gemacht werden konnte.

Tabelle 2.6 Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenz an Kulturzellen

Antikörper/Farbstoff	Wirt/ Klonalität	Firma	Konzentration	Inkubationsdauer/ -temperatur
<u>Primärantikörper</u>				
EEA1 (C-15)	Goat p	Santa Cruz	1:100	1 h/RT
LAMP-2 (H4B4)	Mouse m	Santa Cruz	1:100	1 h/RT
<u>Sekundärantikörper/Farbstoffe</u>				
Donkey α Goat-Alexa	Goat	Molec. Probes	1:100	45 min/RT
Donkey α Mouse-Alexa	Goat	Molec. Probes	1:200	45 min/RT
Höchst 33258	-	Höchst	1:1000	5 min/RT

Die Klonalität ist mit „m“ für monoklonal und mit „p“ für polyklonal angegeben. Die sekundären Antikörper waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 (grün) gekoppelt. Verdünnungen erfolgten mit 1% FKS in PBS.

Quelle: Eigene Darstellung

Die einzelnen Schritte der Durchführung der Immunfluoreszenzversuche nach Stimulation mit den Gliadinpeptiden lauteten wie folgt:

- Caco-2-bewachsene Coverslips (CS) in eine Multiwellplatte überführen

- 15 min. Vorinkubieren mit den Inkubationsmedien
- 70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ P31-43_{liss} bzw. P57-68_{liss} hinzugeben
- Für 20 min. inkubieren, 3x in DMEM waschen
- Bei Chase-Experimenten für 180 min. in DMEM inkubieren, 3x in PBS waschen
- 4 min. mit PFA 3 % fixieren, 3x in PBS waschen
- 1 min. permeabilisieren (Triton 0,15 %/PBS), 3x in PBS waschen
- 30 min. blocken (1 % FKS in PBS), 3x in PBS waschen
- 1 h primären AK inkubieren (bei RT im Dunkeln), 3x in PBS waschen
- 45 min. sekundären AK inkubieren (bei RT im Dunkeln), 3x in PBS waschen
- 5 min. mit Höchst-Farbstoff anfärben (bei RT im Dunkeln), 3x in PBS waschen
- CS mit 8 μl Mowiol auf OT montieren und mehrere Stunden trocknen lassen

Die auf Objektträger aufgebrauchten Coverslips konnten bei 4°C im Dunkeln für mehrere Tage gelagert werden, sollten jedoch zeitnah mikroskopiert werden, da die Leuchtkraft der Fluoreszenzfarbstoffe nach einiger Zeit abgeschwächt war.

2.6.9 Versuchsauswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Auswertung mit einem Immunfluoreszenz-Konfokalmikroskop wurden PBS-Rückstände auf den CS mit Zellstoff und dH₂O entfernt. Nach dem Auftragen von Immersionsöl wurden die Präparate bei einer Vergrößerung von 63 x mikroskopiert. Dabei wurde zunächst per Immunfluoreszenz eine geeignete Stelle im Präparat gesucht und eingestellt. Anschließend konnte die Akquirierung durch die Laser der verschiedenen Wellenlängen isoliert vorgenommen werden. Das entstehende Bild ließ sich mit der Software darstellen und bearbeiten. Eine wichtige Funktion der Zeiss-AIS-Software war die Analyse der Kolokalisationen der verschiedenen Farben und die Angabe eines Kolokalkisationskoeffizienten. Weiterhin konnte anhand Profilabbildungen der Verlauf der Farbintensitäten der Signale verglichen werden (siehe Abbildungen 3.13 und 3.16). Ein Peak beider Signale an identische Stelle bzw. Distanz spricht für eine Kolokalisation.

2.7 Statistik

Die Auswertung und Auszählung der elektronenmikroskopischen Präparate sind in Kapitel 2.5.8 beschrieben. Die prozentualen Anteile der Gliadinsignale in den einzelnen Zellkompartimenten und die jeweiligen Kolokalkisationskoeffizienten aus den IF-Experimenten wurden tabellarisch in Excel eingefügt (Microsoft, Redmond,

Washington, USA). Die statistische Analyse wurde softwaregestützt mit SPSS 12.0 durchgeführt (IBM, Chicago, Illinois, USA). Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte in SPSS mithilfe des Mann-Whitney-U-Testes. Dieser parameterfreie Homogenitätstest konnte aus den Rohdaten der Messungen und Zählungen p-Werte errechnen, auch wenn die Daten nicht in einer Gaußschen Normalverteilung vorlagen. Der p-Wert gab bei vorher definiertem Signifikanzniveau α an, ob eine Nullhypothese (bspw. kein Effekt) verworfen werden musste und stattdessen die Alternativhypothese (bspw. Effekt vorhanden) verwendet werden musste. Je kleiner ein p-Wert war, desto wahrscheinlicher war, dass die beobachteten Effekte nicht auf einen zufälligen Ausgang der Experimente zurückzuführen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde ein α von 0,05 als Signifikanzgrenze gewählt. Es wurde keine Bonferroni-Korrektur für multiples Testen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Slot-Blot

Das Slot-Blot-Verfahren wurde durchgeführt, um das Reaktionsverhalten des p- α -Gliadin-Antikörpers im Vergleich auf verschiedenen Gliadinandaupräparaten zu testen. Die jeweils höhere Konzentration des Antigens von 30 μ g zeigte eine stärkere Reaktion, d.h. eine ausgeprägtere Rotfärbung als die geringere Konzentration von 3 μ g. Der Gliadinandau Frazers Fraction (FF) wurde für die Inkubation der Biopsien verwendet. Dessen Reaktionsstärke war etwa mit der des kommerziellen Pepsin-Trypsin-Gliadins (PTG, Zedira, Darmstadt, Deutschland) vergleichbar. Das Pepsin-Trypsin-Chymotrypsin (PTC) zeigte eine schwächere Reaktion. Den deutlichsten Farbumschlag der Membran erzeugten Gliadin und Gluten. Mit den unfraktionierten Produkten zeigte der Antikörper die ausgeprägteste Reaktion. Ohne Antikörperreaktionen blieben die Slots mit den Peptidasen Pepsin und Trypsin als Negativkontrolle. Als weitere Negativkontrolle wurden dieselben Testlösungen ausschließlich mit dem sekundärem Antikörper eingesetzt. Dadurch konnten unspezifische Reaktionen desselben ausgeschlossen werden, da kein positives Signal zu erkennen war. In der folgenden Abbildung 3.1 sind alle Ergebnisse des Slot-Blots zusammengefasst.

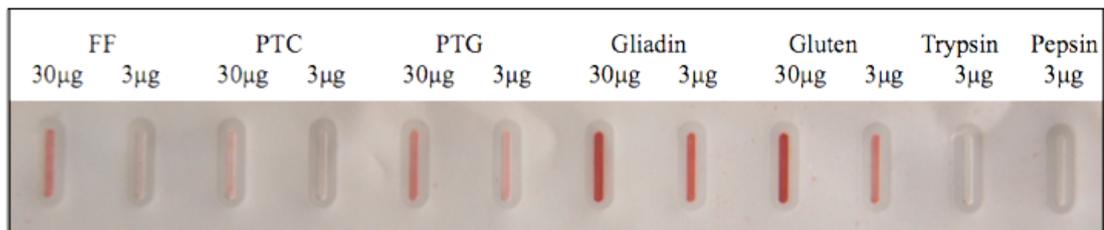


Abbildung 3.1 Foto der Slots (p- α -Gliadin-AK mit verschiedenen Antigenen)

Alle Gliadin-, Gluten- und Andastufenslots zeigten eine Ak-Reaktion im Gegensatz zu den Peptidasen als Negativkontrolle. Die stärksten Reaktionen gingen von unangedautem Gluten und Gliadin aus.

Quelle: Eigene Darstellung

3.2 Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie

Mittels Immunogold-Verfahren wurden Markierungen von Gliadin und späten Endosomen durchgeführt. Lagen beide Marker in einem Kompartiment, handelte es sich um eine Kolokalisation. Bei der Auszählung konnte für jedes Zellkompartiment der relative Anteil des darin enthaltenen Gliadins angegeben werden.

Die Anzahl der mikroskopierten Enterozyten für die Auszählung von 100 Goldpartikeln lässt auf die Labelverteilung und damit auf die Gliadinaufnahme der Biopsien während der Inkubation schließen. Bei Zöliakieserum-inkubierten Biopsien mussten im Median neun Enterozyten und bei Biopsien ohne Zöliakieserum zehn Enterozyten durchgemustert werden. Durch die Inkubation der Biopsien mit FF konnte der intrazelluläre Gliadinegehalt gegenüber den Nativansätzen effektiv gesteigert werden. Die absolute Gliadinaufnahme der Biopsien war durch das Zöliakieserum in den Inkubationsmedien nicht signifikant beeinflusst. Die Spezifität der AK konnte durch den Anteil des unspezifischen Labels, auch als Hintergrund bezeichnet, abgeschätzt werden. Zellkerne und Mitochondrien enthalten kein Gliadin, sodass ein von Gliadin-AK angezeigtes Label auf diesen Zellorganellen als unspezifisches Signal gewertet werden konnte [Zimmer *et al.* 2010]. Die hier verwendeten AK erzeugten wenige Markierungen auf ZK und fast keine auf Mitochondrien (siehe Tabelle 3.1). In keiner der Gruppen (mit bzw. ohne Zöliakieserum-inkubierte Biopsien) ließ sich eine deutlich verringerte Spezifität gegenüber der anderen Gruppe feststellen. Die Differenzen der verschiedenen AK waren nicht signifikant.

Tabelle 3.1 Mediane der prozentuellen Hintergrundmarkierungen (EM)

Mediane	R5	WB 6/8	p- α -Gliadin
Zellkerne (mit Zöliakieserum)	7,5	5,0	3,5
Zellkerne (ohne Zöliakieserum)	5,0	9,0	4,0
Mitochondrien (mit Zöliakieserum)	0,0	0,8	0,8
Mitochondrien (ohne Zöliakieserum)	1,0	1,0	2,0

Der Hintergrund ist für die drei verwendeten Gliadinantikörper und die Inkubation mit/ohne Serum in der Tabelle aufgeschlüsselt. Die angegebenen Werte sind prozentuale Anteile.

Quelle: Eigene Darstellung

Die zur weiteren Spezifitätsbestimmung der AK-Kombinationen durchgeführte Bestimmung der Labeldichten zeigte eine hochspezifische Markierung der Gliadinantikörper. Die Positivkontrolle (EE) hatte signifikant mehr Gliadinmarkierungen enthalten als die Negativkontrollen (ZK/Mi; siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Labeldichten der Gliadinantikörper im Vergleich zur Spezifitätsbestimmung

Antikörper	Labeldichte EE	Labeldichte ZK	Labeldichte Mi
R5	39,16	0,14	0,76
WB 6/8	18,13	0,04	0,2
a-Gliadin	15,58	0,26	2,76

3.2.1 Gliadin in frühen Endosomen

Dem endozytotischen Weg folgend, werden an der AM aufgenommene Nahrungsmittelproteine in EE transportiert. Sowohl bei Zöliakiebiopsien als auch bei Biopsien von gesunden und kranken Kontrollen waren im Mittel 49,6 % des intrazellulären Gliadins in EE lokalisiert. Die Inkubation mit Zöliakieserum hatte keinen bedeutsamen Einfluss auf die Gliadinmenge in EE (mit Zöliakieserum 49,5 % vs. 51,2 % ohne Serum). Die Abbildung 3.2 zeigt beispielhaft ein EE und ein LE.

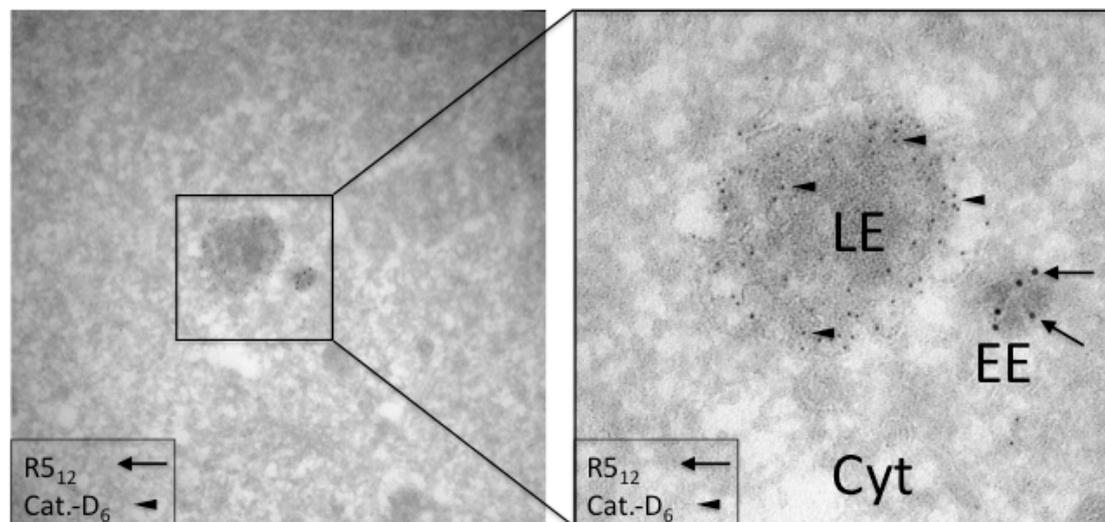


Abbildung 3.2 Gliadin in EE neben LE ohne Gliadin (EM)

Das EM-Bild zeigt den Schnitt einer Zöliakie-Biopsie, ohne Zöliakieserum inkubiert. Zu sehen ist ein Gliadin enthaltene frühes Endosom. Daneben befindet sich ein spätes Endosom (Cathepsin-D positiv) ohne Gliadin. Objektiv: x33.900

Quelle: Eigene Darstellung

Die verwendeten AK verhielten sich in Bezug auf Gliadin in EE minimal unterschiedlich (R5 50,6 %, WB 6/8, 45,7 %, p- α -Gliadin 52,7 %). Innerhalb des Labels eines AK gab es weder in Zöliakie- noch in gesunden oder kranken Kontrollbiopsien signifikant erhöhte bzw. verminderte Mengen von Gliadin in EE. Ein signifikanter Unterschied bestand lediglich zwischen Zöliakiebiopsien und CED-Biopsien (je mit Zöliakieseruminkubation und p- α -Gliadin/LAMP-2). Bei letzterer Gruppe schien ausgleichend der Gliadinanteil in LE erhöht (vergleiche Abbildung 3.6). Die Abbildung 3.3 fasst die Anteile des Gliadins in den verschiedenen Gruppen zusammen.

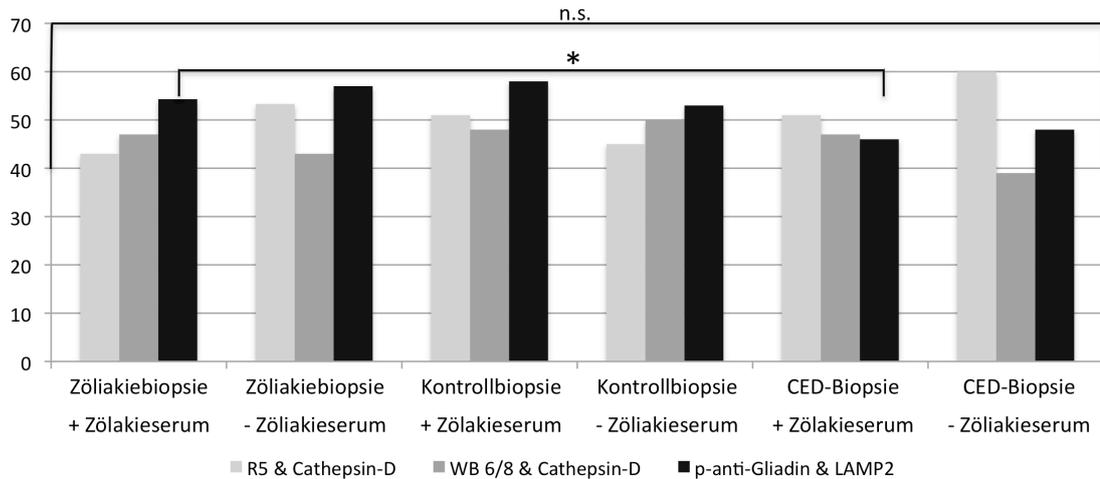


Abbildung 3.3 Säulendarstellung der medianen Anteile an Gliadin in EE (EM)

In den frühen Endosomen befand sich unabhängig von der Biopsieart (Zöliakie, gesunde Kontrollen oder CED) bei allen drei AK-Kombinationen etwa die Hälfte der detektierten Gliadinmenge.

[n.s. (nicht signifikant) = $p \geq 0,05$; * = $p \leq 0,05$]

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.2 Gliadin in späten Endosomen

Es wurden Goldpartikel markierend für die Gliadinantikörper (R5, WB 6/8, und p- α -Gliadin), die in einer Vakuole mit Markern der LE (LAMP-2 bzw. Cathepsin-D) lagen, zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen. Gemittelt über alle AK wurden bei Zöliakiebiopsien durch die Zöliakieseruminkubation 10 % des Gliadins bis in späte Endosomen transportiert und dort detektiert. Bei sämtlichen Vergleichsansätzen lag dieser Anteil im Mittel bei 2,95 % (CED mit Zöliakieserum 3,8 %, Kontrollen mit und ohne Zöliakieserum und CED ohne Serum <3 %). Die Abbildung 3.4 präsentiert Beispielbilder von Gliadin in LE, auf denen die Markierungen mit allen drei verschiedenen AK-Kombinationen durchgeführt wurden.

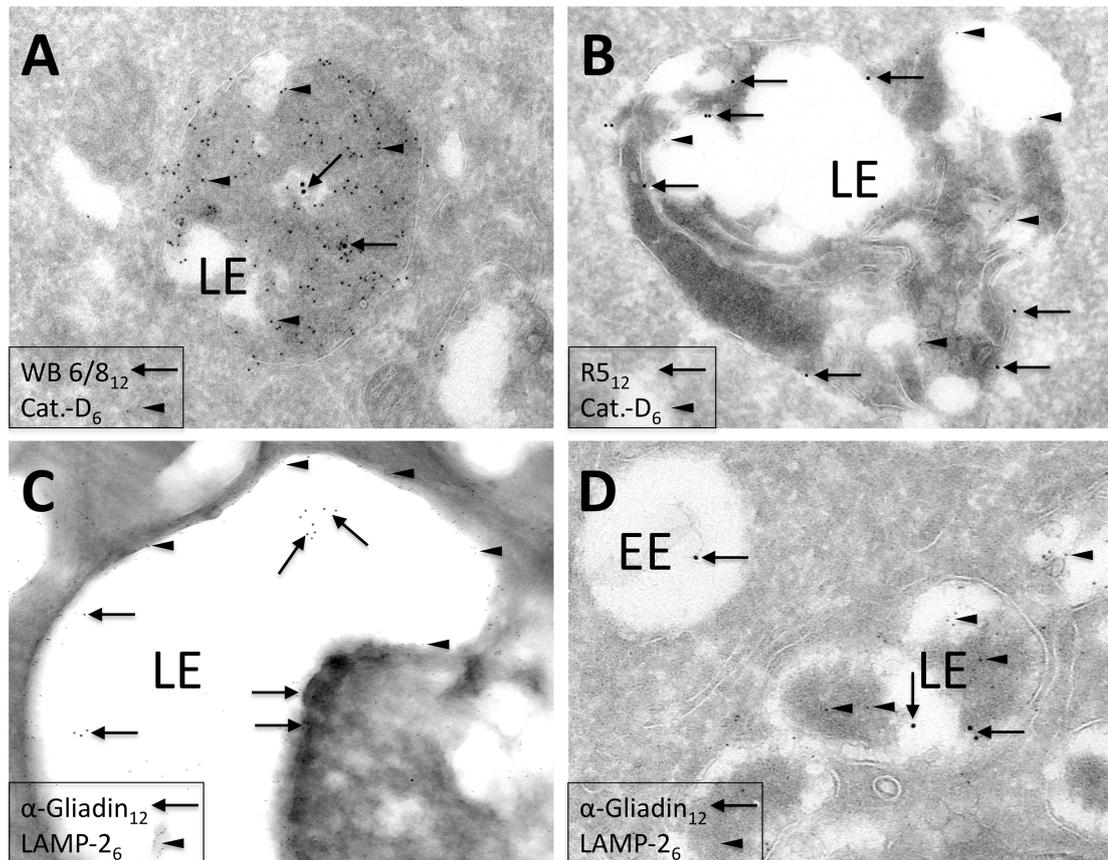


Abbildung 3.4 Beispiele von LE mit Gliadin (Kolokalisationen) (EM)

Die Bilder sind von Zöliakiebiopsien inkubiert mit Zöliakieserum. Die durch Cathepsin-D bzw. LAMP-2 markierten LE enthalten Gliadin. C und D zeigen zusätzlich Gliadin in EE (in Abwesenheit von LE-Markerproteinen). Beispielhaft sind Bilder von allen Antikörperkombinationen aufgeführt. Objektive: A x13.800; B x 24.400; C&D x17.700. Quelle: Eigene Darstellung

Im Gegensatz zu zöliakieseruminkubierten Zöliakiebiopsien waren in den Kontrollbiopsien keine Kolokalisationen von LE-Markern und Gliadin zu sehen (siehe Abbildung 3.5).

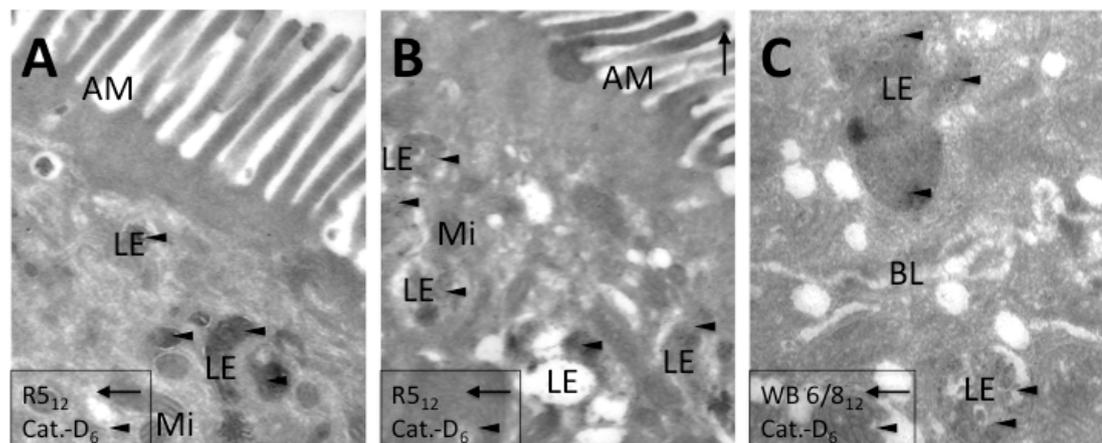


Abbildung 3.5 LE ohne Kolokalisationen in Kontrollansätzen (EM)

A: Zöliakiebiopsie ohne Zöliakieserum; B: Kontrollbiopsie mit Serum; C: Kontrollbiopsie ohne Serum. Alle Bilder zeigen mehrere LE, von denen keines Gliadin enthält. Es sind keine Kolokalisationen zwischen Gliadin und LE-Markerproteinen vorhanden. Objektive: x17.700. Quelle: Eigene Darstellung

Die Gliadinaufnahme in die LE wurde durch Seruminkubation signifikant gesteigert. Die drei AK-Kombinationen wichen in der markierten Gliadinmenge in LE leicht voneinander ab (Mittelwerte aus allen Biopsien: R5 & Cathepsin-D 4,8 % > p- α -Gliadin & LAMP-2 3,9 % > WB 6/8 & Cathepsin-D 3,8 %).

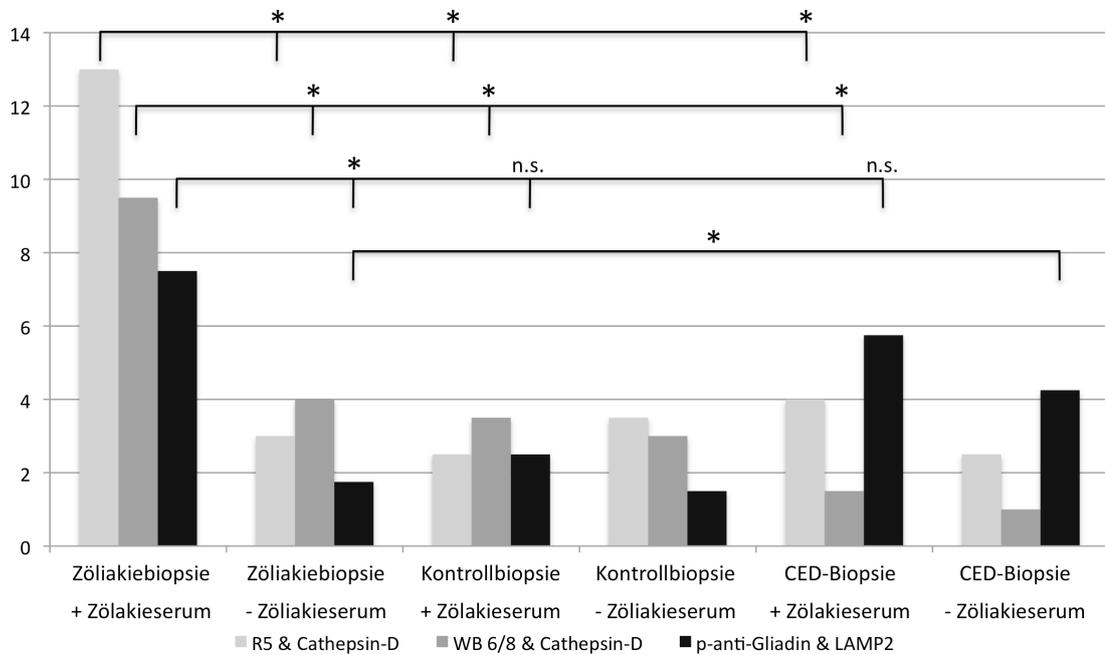


Abbildung 3.6 Säulendarstellung der medianen Anteile an Gliadin in LE (EM)

Zöliakiebiopsien mit Zöliakieserum inkubiert hatten signifikant höhere Anteile an Gliadin in LE als Zöliakiebiopsien ohne Serum oder Kontroll- oder CED-Biopsien mit und ohne Serum. Je nach betrachteter Antikörperkombination lag das Verhältnis im Mittel bei 3:1. Der p- α -Gliadin konnte zw. Zöliakiebiopsien mit Serum und gesunden und kranken Kontrollen (je mit Serum) keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Die CED-Biopsien hatten beim WB 6/8 sehr wenig und beim p- α -Gliadin relativ viel Gliadin in LE (signifikant mehr als in Zöliakiebiopsien ohne Serum). [n.s. (nicht signifikant) = $p \geq 0,05$; * = $p \leq 0,05$. Alle nicht aufgeführten Signifikanzniveaus waren n.s.]

Quelle: Eigene Darstellung

3.2.3 Gliadin in anderen Zellkompartimenten

Für Gliadin(-peptide) ist grundsätzlich jede intrazelluläre Lokalisation möglich, abgesehen von ZK und Mi, die ein unspezifisches Label anzeigen. Mehr als die Hälfte des Gliadins befand sich in Endosomen, fast ausschließlich in EE (siehe Abbildung 3.8). Lediglich in zöliakieseruminkubierten Zöliakiebiopsien war etwa ein Achtel der Gliadinmarker in LE. Bei diesen Ansätzen fand keine Mehraufnahme von Gliadin statt, sondern eine intrazelluläre Umverteilung zugunsten der LE, die kein Kompartiment in besonderem Ausmaß betraf.

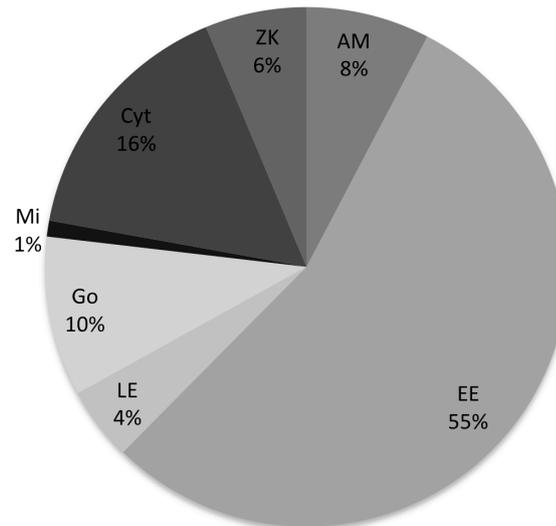


Abbildung 3.7 Kreisdiagrammdarstellung der gesamten intrazellulären Gliadinverteilung (EM)
 Mehr als die Hälfte des intrazellulären Gliadins befand sich in Endosomen. Als Berechnungsgrundlage dienten sämtliche Experimente, unabhängig vom Biopsietyp, der Zöliakieseruminkubation und der verwendeten AK.

Quelle: Eigene Darstellung

Im Mittel war 7 % des Gliadins an der AM. Während R5 und WB 6/8 geringe Anteile anzeigten (5,6 bzw. 4,3 %), war das Signal des p- α -Gliadin an der AM deutlich stärker (10,8 %; siehe Abb. 3.8/A). Besonders die Biopsien der CED zeigten mit dem p- α -Gliadin Anteile von 20 % mit Zöliakieserum und 14 % ohne Serum, während die Signale der anderen Gliadin-AK unterdurchschnittlich waren (3-5 %).

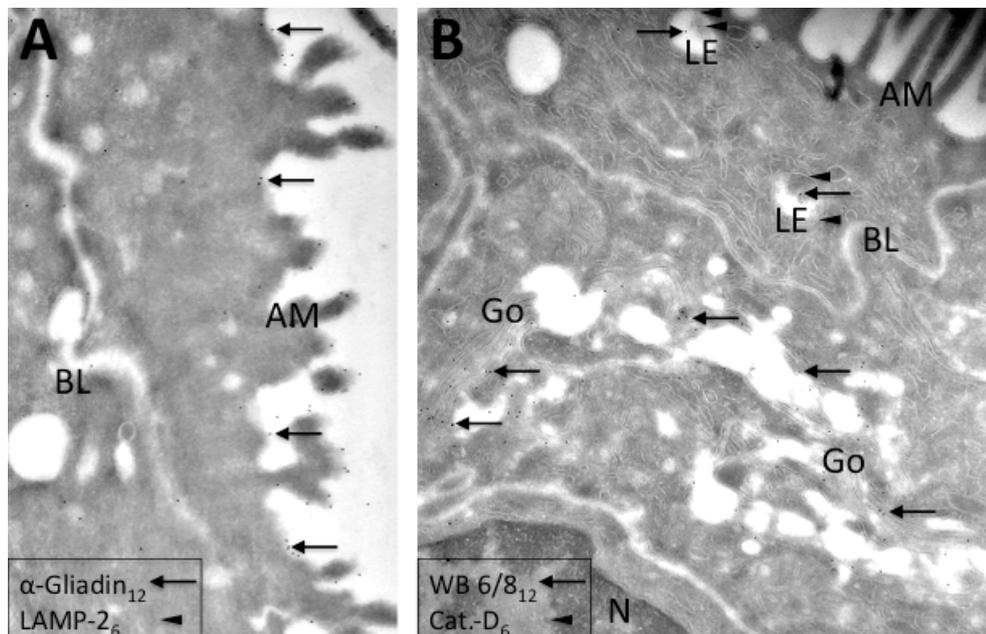


Abbildung 3.8 Gliadinlabel an der AM und auf dem Golgi-Apparat (EM)

A: Die schräg angeschnittene AM zeigt ein starkes Gliadinlabel; B: Der WB 6/8-AK erzeugte ein starkes Signal auf den Golgi-Apparaten. Außerdem ist nahe der AM ein LE mit enthaltendem Gliadin zu erkennen (atypische Lokalisation; Zöliakiebiopsie mit Zöliakieserum inkubiert). Objektive: A x13.700; Bx17.700.

Quelle: Eigene Darstellung

Insgesamt befanden sich 8 % des Gliadins an der BL. In Zöliakiebiopsien lag dieser Anteil mit 10 % etwas höher. CED-Biopsien hatten einen verringerten Anteil an 12 nm-Goldpartikeln an der BL (6 %). Die medianen Unterschiede zwischen den AK waren marginal (im Mittel bei R5 9,3 %, WB 6/8 6,8 % und p- α -Gliadin 8,1 %).

Bei Zöliakie- und gesunden Kontrollbiopsien waren im Mittel 9 % der Gliadinsignale auf Golgi Apparaten zu finden und auf Golgi Apparaten von CED-Biopsien über 40 % der Markierungen des WB 6/8 (siehe Abbildung 3.8). Die anderen AK waren vergleichsweise etwas unterdurchschnittlich vertreten. Bezüglich des Gliadins auf Golgi Apparaten gab es keine Unterschiede zwischen zöliakieseruminkubierten und serumfreien Biopsien.

Das Zytosol hatte den zweitstärksten Anteil mit 14,4 % des Gesamtgliadins. Bei Auswertungen das p- α -Gliadin war auf dem Zytosol weniger Gliadin vertreten als bei dem R5-AK (12 bzw. 16,6 %). Weiterhin hatten Zöliakiebiopsien mit 16,5 % mehr Gliadin zytosolisch deponiert als CED-Biopsien mit 11,5 %. Aufgrund der Größe dieses Kompartiments ist dieser Anteil nicht als unspezifisches Signal der AK zu werten, wie die Labeldichte belegt (siehe Tabelle 3.2). Im Gegensatz zu den in der Studie verwendeten Enterozyten ist für RACE-Zellen ein gesteigerter Anteil diverser Proteine im Zytosol beschrieben [Kersting, Bruewer, Schuermann, Klotz, Utech, Hansmerten, Krieglstein, Senninger, Schulzke, Naim and Zimmer 2004].

3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.3.1 Aufnahme von Gliadinpeptiden durch intestinale Zelllinien

In vitro können intestinale Zelllinien wie Enterozyten *in vivo* mit Nahrungsmittelantigenen interagieren. Gliadinpeptide werden physiologischerweise über Endozytose aufgenommen und transportiert. Die verwendeten Caco-2-Zellen exprimieren einen intestinalen Phänotyp mit Enzymen und Hydrolasen der Bürstensaummembran [Alfalah, Wetzel, Fischer, Busche, Sterchi, Zimmer, Sallmann and Naim 2005]. Sie sind zur Endozytose fähig und exprimieren auch das Zöliakierelevante Gen HLA-DQ8.

Die Abbildung 3.9 zeigt Gruppierungen aus wenigen Zellen nach einer Gliadinpeptidinkubation. Die dunkel ausgesparten Bereiche des Bildes sind

extrazellulär bzw. Nukleus, auf dem sich kein Peptid befindet. Im Zytoplasma befinden sich zahlreiche scharf abgrenzbare Vakuolen, die mit dem Peptid beladen sind. Es handelt sich um Kompartimente des endozytotischen Weges. Zwischen den verwendeten Gliadinpeptiden P31-43 und P57-68 gab es keine nennenswerten Unterschiede in der Peptidverteilung, wie der Vergleich der Teilbilder A und B zeigt.

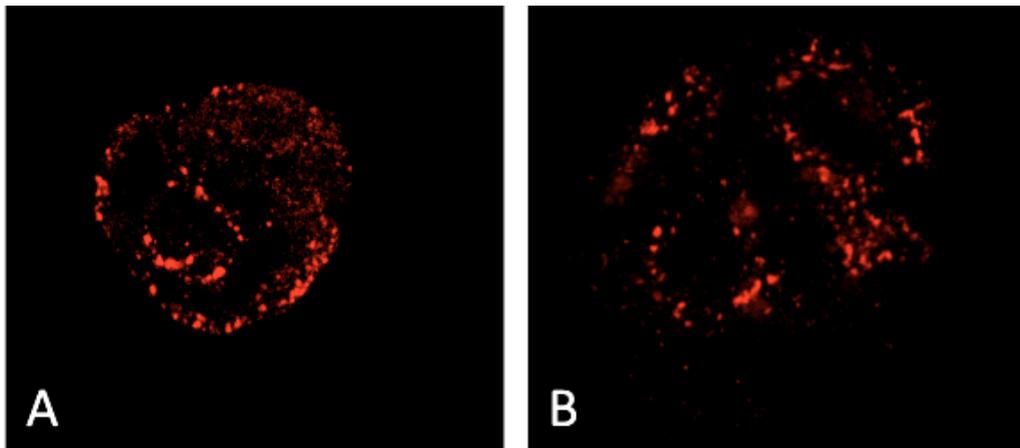


Abbildung 3.9 Endozytotische Vesikel (IF)

Die IF-Bilder zeigen Caco-2-Zellen nach 20-minütiger Gliadinpeptidinkubation. Die Peptide wurden durch gekoppeltes Lissamin-Rhodamin rot sichtbar gemacht. Die Zellen auf Bild A sind mit P31-49 und auf Bild B mit P57-68 inkubiert.

Quelle: Eigene Darstellung

Bei den intestinalen Zelllinien Caco-2 werden Gliadinpeptide ebenfalls über Endozytose aufgenommen. Ein Hinweis dafür ist die Temperaturabhängigkeit der Peptidaufnahme. Während die Abbildung 3.10-A das Resultat einer Gliadinpeptidinkubation bei 37°C zeigt, ist in der folgenden Abbildung 3.10-B ersichtlich, dass bei 4°C und sonst identischen Bedingungen keine Aufnahme von Gliadinpeptiden stattfindet.

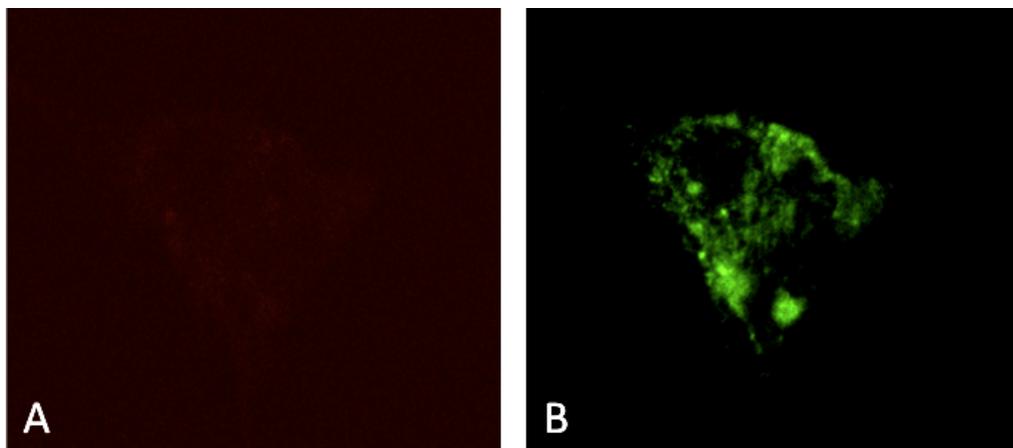


Abbildung 3.10 Blockade der Gliadinaufnahme bei 4°C (IF)

Das Teilbild A zeigt, dass die Gliadinaufnahme bei 4°C fast vollständig blockiert werden kann. Die rote Farbe des gekoppelten Lissamin-Rhodamin ist nur stellenweise zu erahnen. Im Vergleich dazu ist

die gleiche Region auf Teilbild B mit einem Grünfilter (AK gegen LAMP-2) zu sehen, um die Zellumrisse darzustellen.

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.2 Effekt einer Inkubation mit Kontrollserum

Um einen generell beeinflussenden Effekt des Kontrollserums auf die Inkubation der Gliadinpeptide auszuschließen, wurde DMEM für Vergleichsexperimente als neutrale Kontrolle gewählt. Sowohl in EE als auch in LE war keine signifikante Differenz der Kolokalisationskoeffizienten zwischen den beiden Inkubationszusätzen erkennbar, wie die Abbildung 3.11 verdeutlicht.

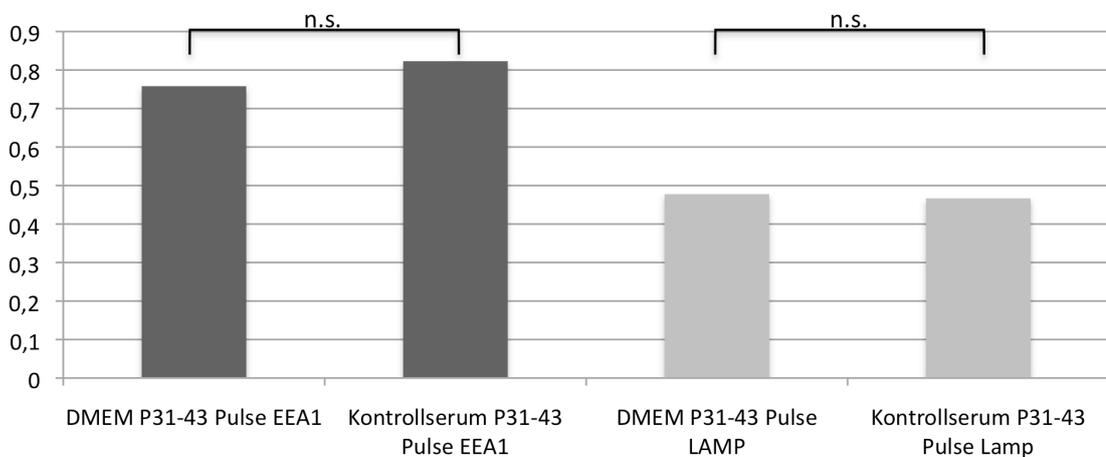


Abbildung 3.11 Vergleichende Inkubation von Zellkulturmedium und Kontrollserum (IF)

In diesem Diagramm sind die Mediane der Kolokalisationskoeffizienten von dem Signal des Gliadinpeptids P31-43 mit dem Signal der Endosomenmarker (EEA1 bzw. LAMP-2) aufgetragen. Es wurden jeweils Zellen mit Zellkulturmedium (DMEM) oder mit Kontrollserum inkubiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Inkubationszusätze Kontrollserum bzw. DMEM. [n.s. (nicht signifikant) = $p \geq 0,05$]

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.3 Intrazellulärer Transport von Gliadinpeptiden

3.3.3.1 Gliadinpeptide in frühen Endosomen

Nach der Aufnahme können Gliadinpeptide in frühen Endosomen nachgewiesen werden. EE können durch Antikörper gegen EEA1 markiert werden. Die Gliadinaufnahme in die Endosomen wurde mittels Pulse- und Chase-Inkubation überprüft, um gegebenenfalls einen weiteren Transport innerhalb der Enterozyten zu ermöglichen. Sowohl P31-43 als auch P57-68 werden in EE aufgenommen (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13).

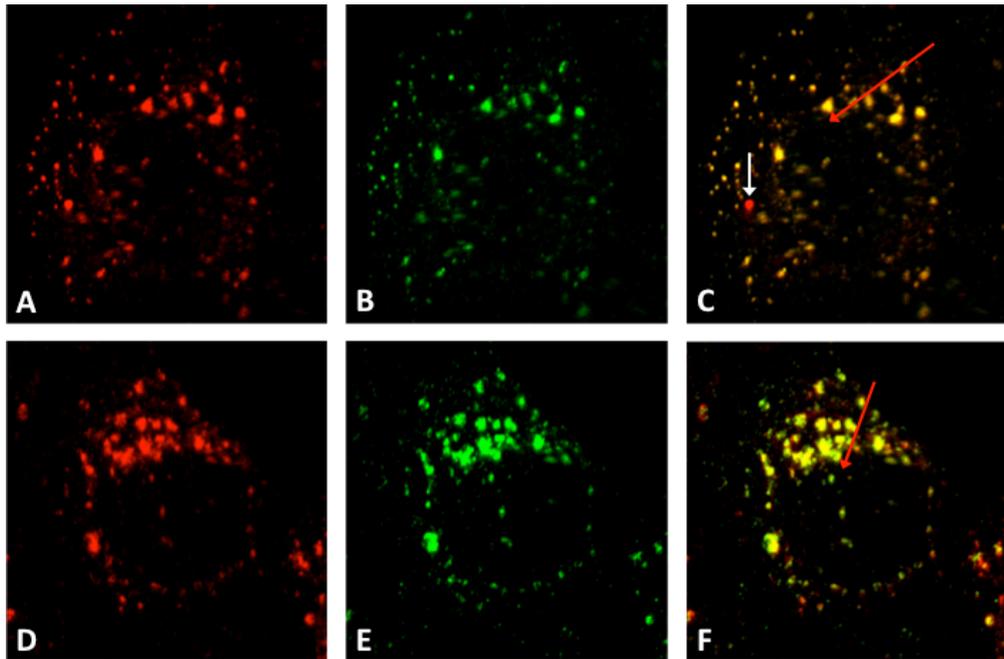


Abbildung 3.12 Gliadinpeptide in EE (IF)

Die Abbildungen zeigen die Kolokalisationen der Gliadinpeptide 57-68 (A-C) und 31-43 (D-F) mit EEA1. Die Peptide sind isoliert in Teilbild A&D (rot) und EEA1 isoliert in Teilbild B&E (grün) dargestellt. Die Überlagerungsabbildungen C&F erscheinen durch die hohen Kongruenzen als Konsequenz der Mischung von rot und grün gelblich. Der weiße Pfeil in C zeigt eine Ansammlung von P57-68, die nicht mit EEA1 überlagert. Es könnte sich beispielsweise um ein LE handeln.

Quelle: Eigene Darstellung

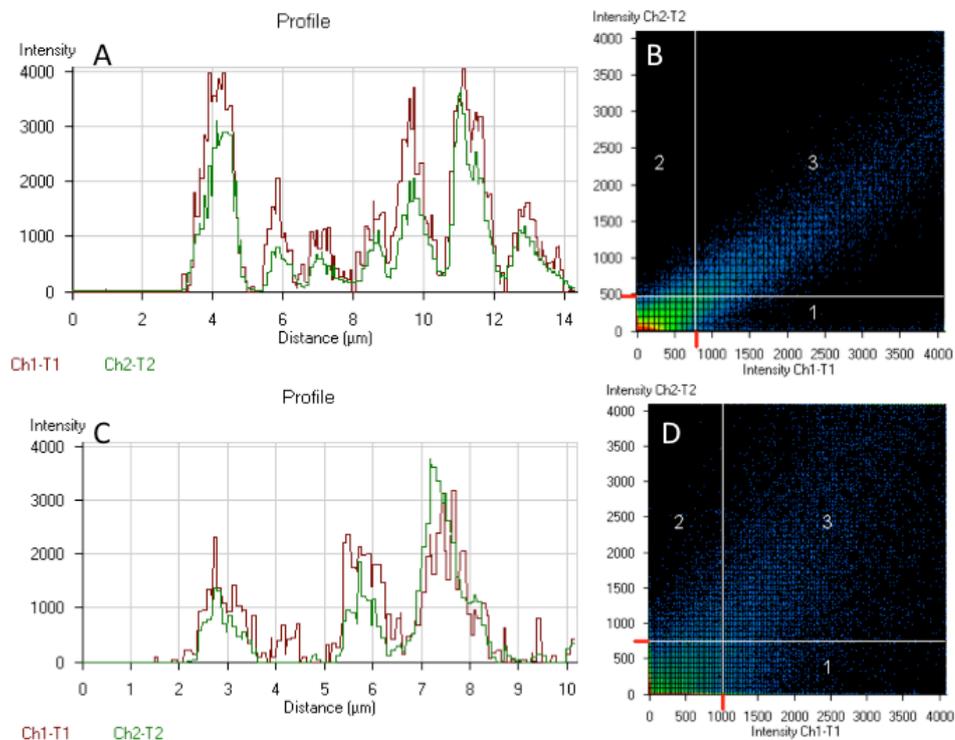


Abbildung 3.13 Gliadinpeptide in EE/Profil & Dot-Blot (IF)

Die Profile A&C veranschaulichen die Intensitäten der zwei Signale Rot (A: P57-68; C: P31-43) und Grün (EEA1) entlang des roten Pfeils in Abbildung 3.12-C bzw. F. Die Peaks der Farben sind nahezu kongruent, was ebenso ein Merkmal für Kolokalisationen ist wie der für Kolokalisationswerte typisch diagonale Verlauf der Dot-Wolke in den Abbildungen B (P57-68) & D (P31-43).

Quelle: Eigene Darstellung

Es hat sich gezeigt, dass nach der längeren Chase-Inkubation mit 180 Minuten-Intervall zwischen Peptidinkubation und Fixierung kein signifikant größerer Anteil der Gliadinpeptide in den EE enthalten war als nach der kürzeren Pulse-Inkubation ohne Intervall (siehe Abbildung 3.14). Die hohen Werte der Koeffizienten verdeutlichen, dass fast das gesamte Gliadinsignal deckungsgleich mit dem EEA1-Signal vorlag und nur wenige, anteilmäßig geringe Bereiche isoliert existierten.

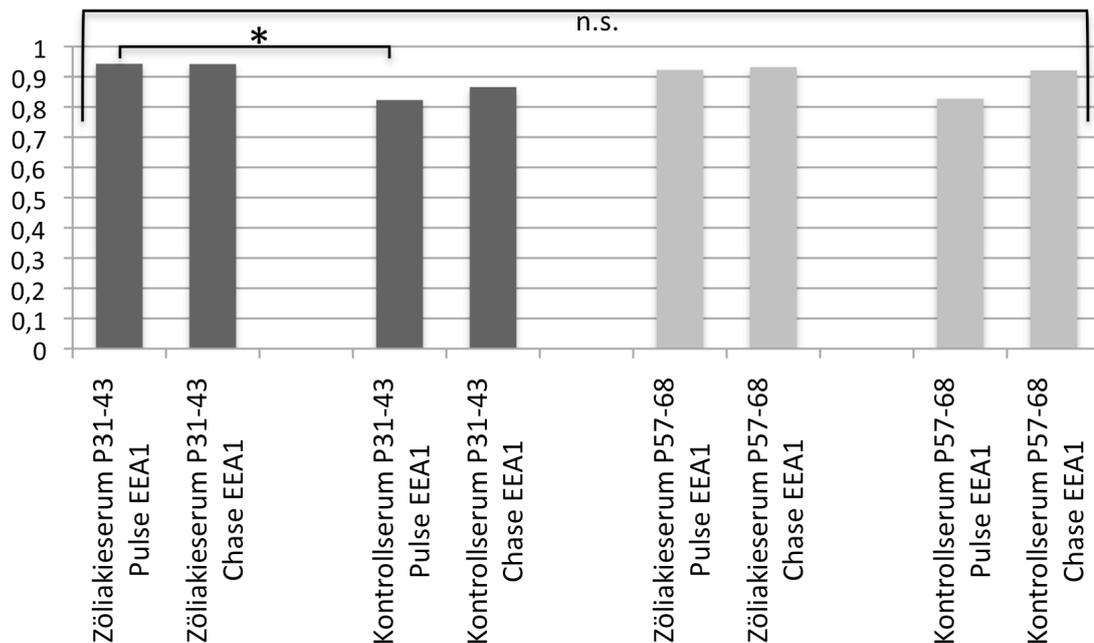


Abbildung 3.14 Säulendiagramm der Kolokalisationskoeffizienten der Peptide und EEA1 (IF)

Es sind die medianen Kolokalisationskoeffizienten von P31-43 (dunkel) bzw. P57-68 (hell) mit EEA1 dargestellt. Von den Doppelsäulen repräsentieren die linke die Pulse-Inkubation und die rechte die längere Chase-Inkubation, jeweils ohne signifikante Unterschiede der Koeffizienten. In Bezug auf die EE gab es keine Unterschiede zwischen der Zöliakie- und Kontrollseruminkubation, außer bei der Pulseinkubation von P31-43. [n.s. (nicht signifikant) = $p \geq 0,05$; * = $p \leq 0,05$]

Quelle: Eigene Darstellung

In Bezug auf die Aufnahme in die frühen Endosomen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem toxischem Peptid P31-43 und dem immunogenen Peptid P57-68. Beide Peptide erzielten nach den verschiedenen Inkubationszeiten hohe Kolokalisationskoeffizienten mit EEA1 als Marker für EE. Die Art des zugegebenen Serums (von Zöliakie- oder Kontrollpatienten) hatte regelhaft keinen signifikanten Einfluss auf die Kolokalisationskoeffizienten. Lediglich das Peptid 31-43 war nach der Pulseinkubation mit Kontrollserum zu einem geringeren Anteil in EE transportiert als mit Zöliakieserum, während sich bei der Chaseinkubation keine Unterschiede zeigten. Die beiden untersuchten Gliadinpeptide wurden unabhängig von den veränderten Versuchsvariablen in die frühen Endosomen aufgenommen.

3.3.3.2 Gliadinpeptide in späten Endosomen

3.3.3.2.1 Gliadinpeptid 31-43 / toxisches Peptid

Das Transportverhalten des toxischen Peptids 31-43 differierte deutlich von dem des Peptids 57-68. Letzteres wurde ohne Einfluss der mitinkubierten Seren oder DMEM in LE transportiert. P31-43 durchlief die EE und wurde unter normalen Bedingungen in nicht relevanten Mengen in LE aufgenommen. Dieser Transport ließ sich durch Inkubation mit Serum von Zöliakiepatienten beeinflussen. Abbildung 3.15 veranschaulicht vergleichend, dass es kaum Kolokalisationen nach Inkubation mit Serum von Kontrollpatienten und deutliche Kolokalisationen nach Inkubation mit Zöliakieserum gibt.

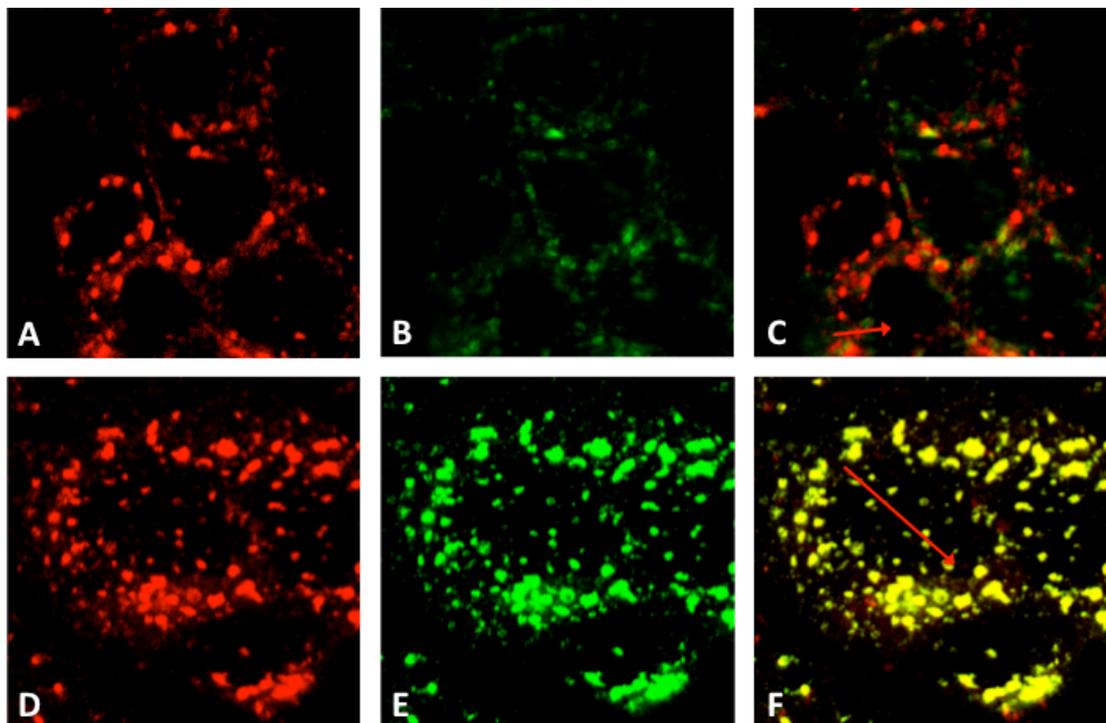


Abbildung 3.15 Gliadinpeptid 31-43 in LE (IF)

Die Bilder A-C sind von Zellen, die mit Serum von Kontrollpatienten inkubiert wurden und die Bilder D-F entsprechend mit Serum von Zöliakiepatienten. Das Peptid 31-43 ist mit roter und LAMP-2 mit grüner Fluoreszenzfarbe markiert. Mit Serum inkubiert bestand ein hoher Grad an Kolokalisation, d.h. das toxische Peptid befand sich an diesen Stellen in LE.

Quelle: Eigene Darstellung

Auch aus den Profil- und Punktwolkendarstellungen in Abbildung 3.16 geht ein deutlicher Unterschied zwischen kontrollseruminkubierten und mit zöliakieseruminkubierten Zellen hervor. Anhand der Teilbilder A und B ist ersichtlich, dass das Kontrollserum das P31-43 nicht in LE leiten konnte, wie es durch das Zöliakieserum ermöglicht wurde.

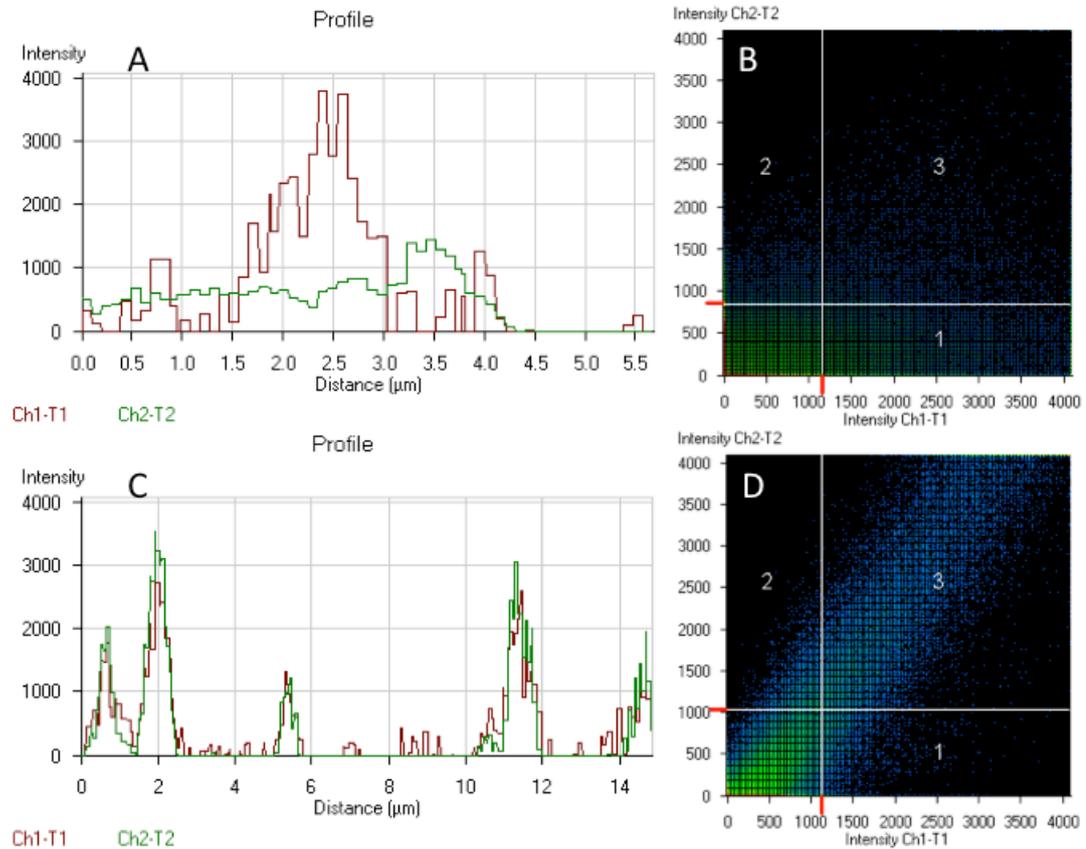


Abbildung 3.16 Gliadinpeptid 31-43 in LE/Profil & Dot-Blot (IF)

Die Bilder A&B zeigen Kolokalisationsparameter von Caco-2, inkubiert mit Kontrollserum, (Bild A ist bezogen auf den roten Pfeil in Abb. 3.16-C) und C&D entsprechend mit Zöliakieserum (Bezug für Bild C ist der rote Pfeil in Abb. 3.16-F). Die Farbintensitätsprofile in Bild A für rot und grün verhielten sich teilweise gegenläufig (Distanz 1,5-3 und 3-4 μm). Auch die Punktwolkendarstellung (Bild B) zeigt keine typische kolokalisationsweisende Diagonale, sondern eine eher diffuse Verteilung. Typisch für Kolokalisationen sind hingegen die Auswertungen der Bilder aus den Ansätzen mit Zöliakieserum, wie dies beispielsweise in Bild C&D ersichtlich ist.

Quelle: Eigene Darstellung

An Caco-2-Zellen traten nur geringe Kolokalisationskoeffizienten zwischen den Fluoreszenzsignalen für das Peptid 31-43 und LAMP-2 bei Inkubation mit dem Zellkulturmedium DMEM oder Serum von Kontrollpatienten auf. Folglich wurde unter diesen Bedingungen das Peptid nicht in wesentlichen Mengen in LE transportiert. Dieser intrazelluläre Transport war durch die Inkubation der Peptide mit Serum von Zöliakiepatienten mit hohen Antikörpertitern beeinflussbar. Auf diese Weise waren hohe Übereinstimmungsgrade der Signale zu erzeugen, wie die Abbildungen 3.15 d-f und 3.16 c, d veranschaulichen. Die Kolokalisationskoeffizienten sind signifikant gegenüber der Kontrollserum- (siehe Abbildungen 3.15 a-c, 3.17) und DMEM-Inkubation erhöht. Auch in diesem Zusammenhang bestand keine Differenz zwischen den verschiedenen

Inkubationsmodi Pulse und Chase. Die Abbildung 3.17 zeigt die durchschnittlichen Koeffizienten im Vergleich.

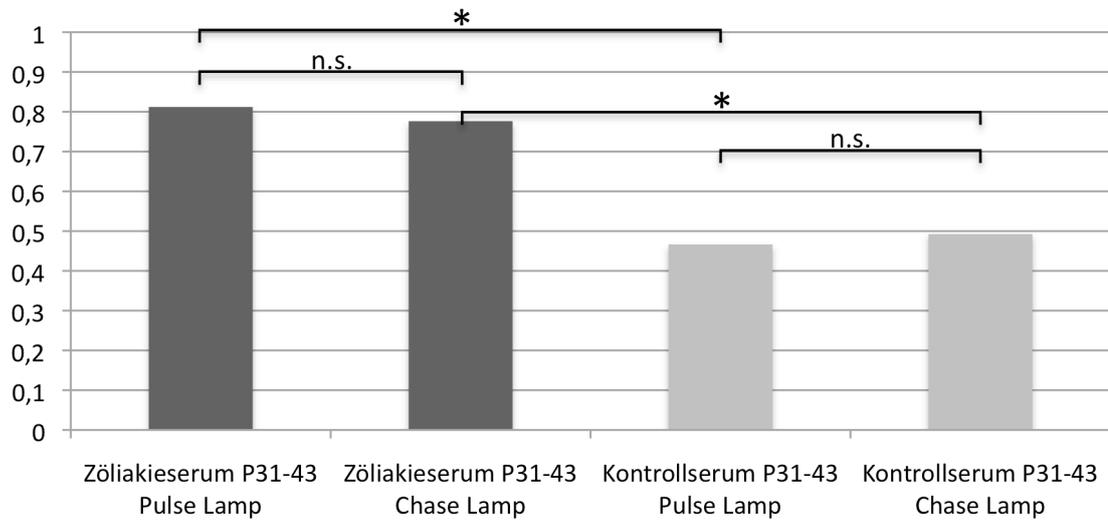


Abbildung 3.17 Darstellung der Kolokalisationskoeffizienten von P31-43 und LAMP-2 (IF)

Es zeigte sich durch höhere mediane Kolokalisationskoeffizienten, dass durch die Inkubation der Peptide zusammen mit Serum von Zöliakiepatienten deutlich mehr P31-43 in LE transportiert wurde als mit Serum von Kontrollpatienten. Die Inkubationszeit beeinflusste diesen Vorgang nicht signifikant. [n.s. (nicht signifikant) = $p \geq 0,05$; * = $p \leq 0,05$]

Quelle: Eigene Darstellung

3.3.3.2.2 Gliadinpeptid 57-68 / immunogenes Peptid

Das Peptid 57-68 erreichte die LE unabhängig von der Art der hier durchgeführten Inkubationen mit verschiedenen Seren oder Zellkulturmedium. Die Abbildungen 3.18 und 3.19 präsentieren Caco-2-Zellen, die mit dem immunogenen Gliadinpeptid 57-68 und Serum inkubiert wurden.

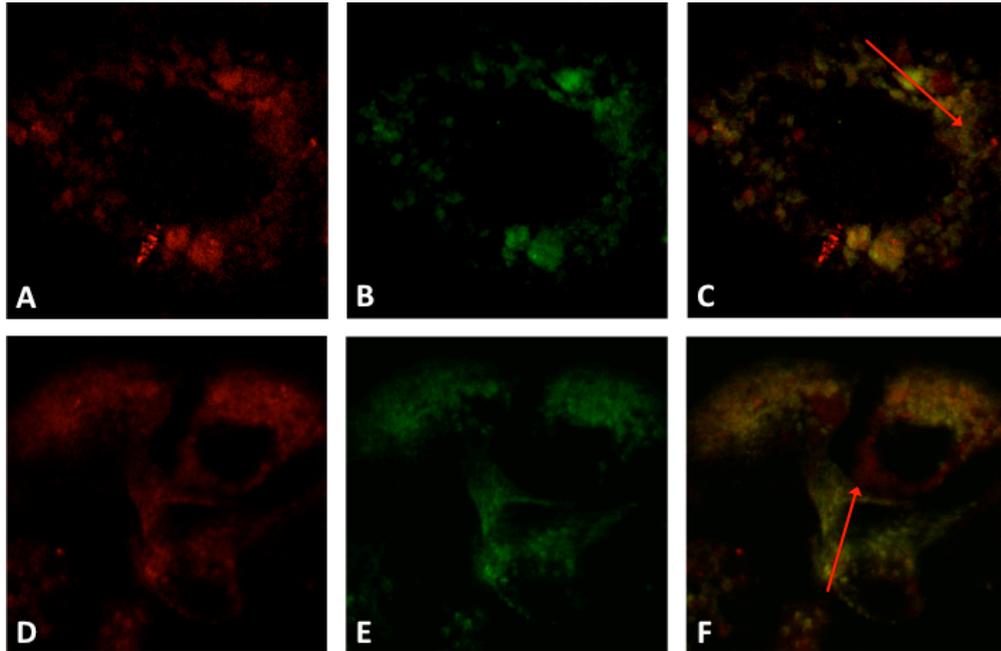


Abbildung 3.18 Gliadinpeptid 57-68 in LE (IF)

Dargestellt ist der Überlappungsgrad der Fluoreszenzsignale von P57-68 (rot; isoliert in A&D) mit LAMP-2 (grün; isoliert in B&E). Die Mergeabbildungen C&F zeigen durch die gelbe Farbe weitreichende Übereinstimmungen. A-C: Inkubation mit P57-68 und Kontrollserum; D-F: Inkubation mit Serum von Zöliakiepatienten.

Quelle: Eigene Darstellung

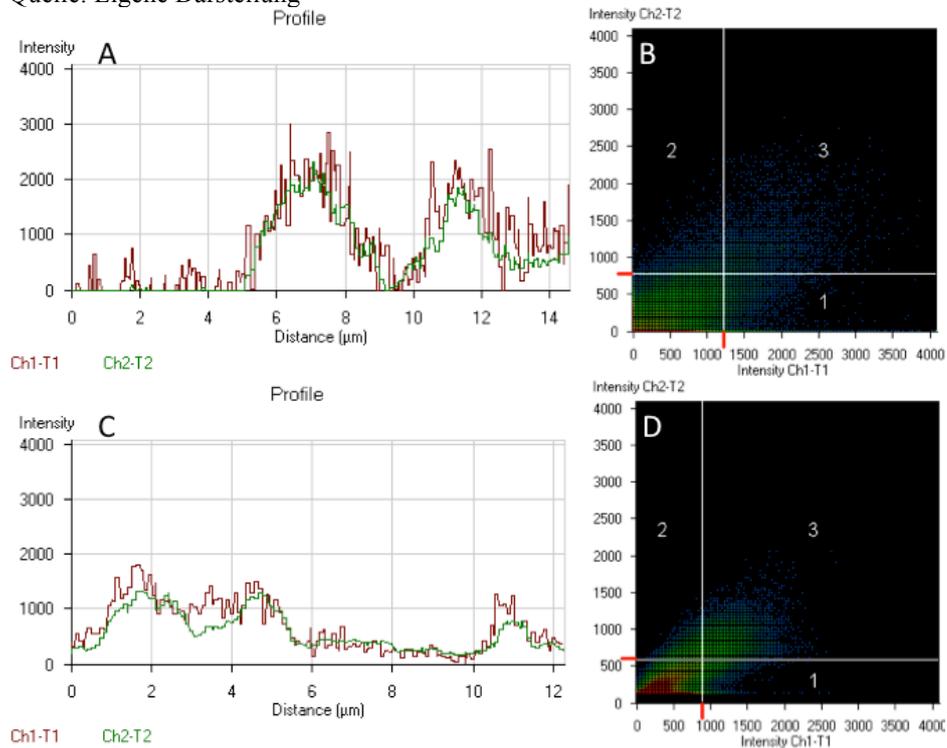


Abbildung 3.19 Gliadinpeptid 57-68 in LE/Profil & Dot-Blot (IF)

Die Intensitätsprofile A&C beziehen sich auf die roten Pfeile in Abbildung 3.18-C (Kontrollserum) bzw. -F (Zöliakieserum). Sie zeigen hohe Grade einer Kollaboration zwischen P57-68 (rot) und LAMP-2 (grün). Die Punktwolken Darstellungen B&D zeigen durch den diagonalen Verlauf, dass die Intensitäten des roten Fluoreszenzsignals größtenteils mit Intensitäten des grünen Signals einhergehen und bestätigen durch eine andere Darstellungsweise die Aussage der Teilbilder A&C.

Quelle: Eigene Darstellung

Auch bei der Inkubation von P57-68 waren die Inkubationsarten Pulse oder Chase nicht unterschiedlich in der resultierenden Gliadinmenge in LE. Es waren keine signifikante Zu- oder Abnahme des Kolokalisationskoeffizienten mit steigender Inkubationszeit feststellbar, wie die Abbildung 3.20 verdeutlicht.

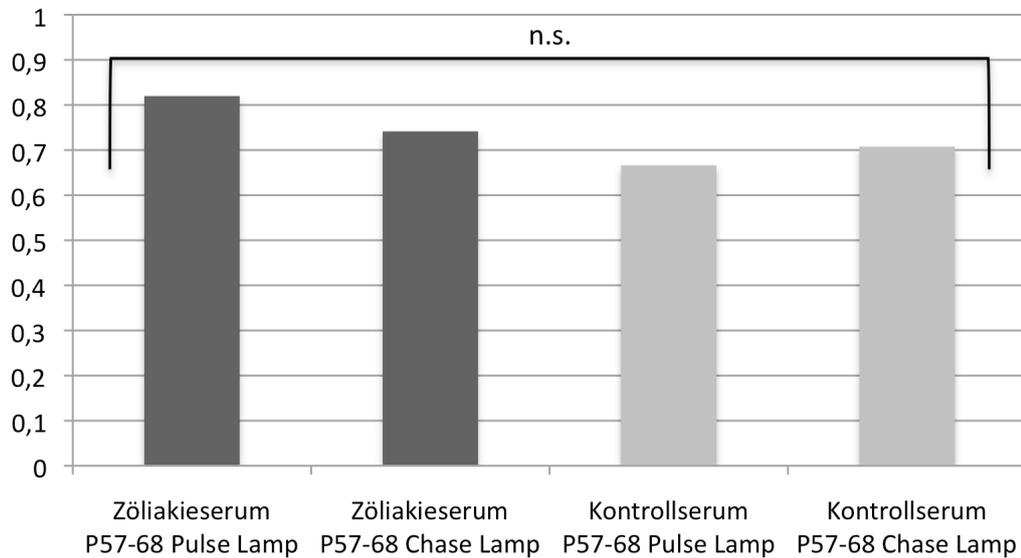


Abbildung 3.20 Darstellung der Kolokalisationskoeffizienten von P57-68 und LAMP-2 (IF)

In dem Säulendiagramm sind die Mediane der Kolokalisationskoeffizienten des Signals für das Peptid 57-68 und LAMP-2 aufgetragen. Die Auswahl des Inkubationsserums und/oder der Inkubationszeit zeigte keinen signifikanten Effekt. [n.s. (nicht signifikant) = $p \geq 0,05$]

Quelle: Eigene Darstellung

4 Diskussion

Mit dieser Studie sollte das pathogenetische Verständnis der Zöliakie vertieft werden. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den intrazellulären Transportprozessen von Gliadin und Gliadinpeptiden in Enterozyten. Der Hypothese nach lässt sich der Transport durch Inkubation mit Serum von Zöliakiepatienten mit hohen AK-Titern beeinflussen. Die toxischen Peptide sollen demnach nicht nur bis in die EE, sondern darüber hinaus auch bis in LE transportiert werden. Diese Modifikation kann von großer Bedeutung sein, da LE im Gegensatz zu EE HLA-DR-positiv sind. Dadurch ist eine Präsentation der Antigene über MHC-II an der BL möglich, was wiederum zu einer Induktion von supprimierenden Lymphozyten führen könnte.

4.1 Diskussion der Methodik

In dieser Studie wurden Experimente auf zwei verschiedenen Modellebenen durchgeführt. Es wurde *ex vivo* an Dünndarmbiopsien und *in vitro* an intestinalen Zelllinien gearbeitet. Jede dieser Arbeitsweisen hat spezifische Vor- und Nachteile. Biopsien erlauben eine möglichst physiologische und wenig verfälschte Bearbeitung von Fragestellungen. Die Enterozyten sind durch die rasche Verarbeitung und Inkubation im Nährmedium bei 37°C mehrere Stunden noch vital und werden anschließend schonend fixiert. Durch die Inkubation der Biopsien mit FF konnte der intrazelluläre Gliadinegehalt gegenüber den Nativansätzen effektiv gesteigert werden. Auf diesem Weg wurden eine höhere Labeldichte und eine zeitlich kontrollierte Gliadinaufnahme der Enterozyten sichergestellt. Es bestand grundsätzlich die Möglichkeit, dass die Patienten aufgrund ihrer Nüchternheit und Symptomatik vor der Biopsie keine großen Mengen an Gliadin aufgenommen haben. Durch die Inkubation wurden dieser potentielle Schwachpunkt ausgeglichen und die Vergleichbarkeit erhöht. Auf diese Weise entstehen nur geringe Unterschiede zu den direkten *in vivo*-Experimenten, die mit Risiken und Umständen für die Patienten verbunden sind [Sturgess *et al.* 1994]. Tierversuche könnten eine Alternative darstellen, jedoch ist nicht zwingend eine Vergleichbarkeit zwischen Tier und Mensch gegeben. Ein großer Nachteil ist die begrenzte Verfügbarkeit von Probenmaterial, wodurch einige Experimentendesigns nicht realisierbar sind.

Die Zellkulturversuche setzen auf einer abstrakteren Ebene an, sodass eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf humane Gewebe in weiteren Schritten überprüft werden muss. An Zellen können Experimente unter standardisierten Bedingungen durchgeführt und dabei Einflussgrößen bewusst variiert werden. Auf diese Weise ist das Modell auf eine vereinfachte Ebene mit wenigen Störgrößen reduziert. Für viele Erkrankungen gibt es etablierte Zellkulturmodelle. Für die Zöliakie werden intestinale Zellen der Linien HT-29, Caco-2 oder T-84 häufig verwendet. Zellkulturexperimente bieten den Vorteil, dass praktisch unbegrenzt Material zur Verfügung steht, was bei Biopsiearbeiten häufig der limitierende Faktor ist. Im Vergleich zu dem Versuchsaufbau der EM-Experimente konnte bei der Immunfluoreszenzmikroskopie exakt zwischen den toxischen und immunogenen Peptidsequenzen differenziert werden, da sie separat voneinander untersucht wurden. Diese methodische Trennung erlaubt noch präzisere Aussagen zu den unterschiedlichen Transporteigenschaften als die Verwendung von AK mit verschiedenen Epitopen in der EM-Arbeit. In der Elektronenmikroskopie wurde aus Kostengründen auf den Einsatz von Peptiden zugunsten von dem Gliadinanda FF verzichtet, da für die Versuchsdurchführung teilweise große Mengen benötigt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Methoden kombiniert eingesetzt. Da unabhängig von der Methode eine verstärkte Aufnahme der toxischen Gliadinpeptide in die LE von (Zöliakie-) Enterozyten nach Zöliakieseruminkubation festgestellt wurde, agieren die Methoden confirmatorisch. Die Slot-Blot-Untersuchungen dienen dazu, die Gliadinlösungen und Antikörper zu überprüfen und deren Interaktion durch eine weitere Technik zu beweisen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Slot-Blot

Diese Methode konnte sowohl den p- α -Gliadin-AK als auch Gliadin/Gluten und drei verschiedene Andaupräparate des Gliadins in Bezug zueinander stellen. Der AK reagierte erwartungsgemäß mit höheren Antigenkonzentrationen stärker als mit niedrigen. Als polyklonaler AK kann der p- α -Gliadin an viele verschiedene Epitope binden, weshalb er insgesamt die stärkste Reaktion mit Gliadin und Gluten zeigte,

die viele potentielle Zielsequenzen beinhalten. Jede der drei Andaulösungen trug Zielsequenzen. Die Peptidasen Pepsin und Trypsin, welche für die Herstellung von FF, PTC und PTG verwendet wurden, zeigten keine Reaktion. Jegliches Signal wäre als unspezifisch zu werten. So ist davon auszugehen, dass die Signale mit den drei Lösungen auf gliadinspezifische Sequenzen zurückzuführen sind, wie es für den AK beschrieben ist, und nicht unspezifisch auf die Peptidasen oder das Zellkulturmedium. Weiterhin ist zu schlussfolgern, dass das zur Biopsieinkubation eingesetzte FF ausreichend Epitope zur Detektion durch die verwendeten Ak enthält. Im Vergleich zu PT und PTC löste es eine mindestens gleichstarke Reaktion bei identischen Konzentrationen aus, wodurch es als Inkubationszusatz besonders geeignet scheint.

4.2.2 *Kryoimmuno-Elektronenmikroskopie*

Auf die Validität der verwendeten AK wurde in Kapitel 3.2 eingegangen. Es ist von korrekten Markierungen von Gliadin und LE auszugehen ist und die Rate an Fehlmarkierungen durch unspezifische Bindungen der AK ist nicht relevant. Im Mittel wurden in den nicht zöliakieseruminkubierten Biopsien weniger als drei Prozent des Gesamtgliadins in LE entdeckt. Zu beachten ist, dass davon auch ein geringer Anteil des Labels als unspezifisch zu werten war (siehe Tabelle 3.1 und 3.2). Vermutlich ist aus diesem Grund der reelle Gehalt an Gliadin in LE in nicht seruminkubierten Biopsien in den LE geringer, als anhand der durchgeführten Experimente abzuleiten ist. Da insgesamt nur wenig Gliadin in die Enterozyten aufgenommen wurde (im Median zehn 12 nm-Goldpartikel pro Enterozyt), war, absolut betrachtet, wenig Gliadin in LE zu erwarten, relativ gesehen, war es jedoch ein entscheidender, statistisch signifikanter Anteil.

Die AK erkennen jeweils unterschiedliche Gliadinepitope. Der polyklonale- α -Gliadin-AK hat ein ausgeprägtes Bindungsverhalten gegenüber einer Vielzahl an gliadin-spezifischen Epitopen. Im Vergleich dazu haben die monoklonalen AK R5 und WB 6/8 ein differenzierteres Bindungsverhalten. Der R5 reagiert vornehmlich mit aus fünf Aminosäuren bestehenden Sequenzen (QQPFP, QQQFP, LQPFP, QLFPF), während der WB 6/8 längere Sequenzen benötigt, jedoch nur eine geringe Variabilität toleriert (z.B. GQQQFPFPQ) [Kahlenberg, Sanchez, Lachmann, Ludmilla, Tlaskalova-Hogenova, Mendez and Mothes 2006, Osman, Uhlig, Valdes,

Amin, Mendez and Mothes 2001, Sanchez, Tuckova, Burkhard, Plicka, Mothes, Hoffmanova and Tlaskalova-Hogenova 2007]. Der R5 ist somit sensitiver und weniger spezifisch als der WB 6/8. Gliadin besitzt als inhomogenes Naturprodukt mehrere verschiedene Bestandteile (siehe Kapitel 1.1.5.1). Beide AK erkennen die toxische Sequenz 31-43, jedoch ausschließlich der R5 das immunogene Peptid 57-68. Die Deamidierung von Glutamin zu Glutaminsäure beeinflusst die Reaktionsstärke des WB 6/8 nicht. Im Vergleich dazu reagiert der R5 auf die deamidierten Peptide weniger ausgeprägt.

Bei der Inkubation mit und ohne Zöliakieserum mussten im Mittel neun bzw. zehn Enterozyten ausgezählt werden, um die Anzahl von 100 12 nm Goldpartikel zu erreichen, die in jedem EM-Netz ausgezählt wurden. Somit lag die Labeldichte nahezu unverändert bei knapp zehn Gliadinsignalen pro Enterozyt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das in den Inkubationsflüssigkeiten enthaltene Zöliakieserum die quantitative Gliadinaufnahme in diesem Versuchsetting nicht relevant verändert. Diese Erkenntnis ist eine wichtige Grundvoraussetzung für die Interpretation dieser Studie, da eine absolut gesteigerte Gliadinaufnahme bei Zöliakieseruminkubation vermutlich auch in einem erhöhten Gliadinanteil in LE resultieren würde. Doch dieser Effekt würde vermutlich nicht in ausreichendem Maße zu der gewünschten Gliadinpräsentation führen, da der Mukosaschaden sich proportional zu der aufgenommenen Gliadinmenge verhält. Zumindest die ersten zugeführten Gliadinmengen sollten gering sein, um das Risiko einer manifesten Zöliakie zu minimieren [Ivarsson, Hernell, Stenlund and Persson 2002].

Die Labelverteilung in EE lag bei etwa 50 % (unabhängig von einer eventuellen Zöliakieseruminkubation), je nach eingesetztem AK gegen Gliadin. Ein hoher Anteil in EE war zu erwarten, da für EE eine bedeutsame Rolle in endozytotischen Vorgängen postuliert wird. Sie dienen als frühe Sammelstelle, z.B. für aufgenommene Nahrungsmittelantigene. Von dort aus werden die Proteine auf unterschiedlichen Wege weitertransportiert. Bemerkenswert ist der extrem hohe Anteil von etwa der Hälfte aller Gliadinsignale, die in EE detektiert werden konnten. Zwischen den einzelnen Patientenarten (Zöliakie, gesunde und kranke Kontrollen) zeigten sich bei allen AK-Kombinationen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich der p- α -Gliadin-AK mit LAMP-2 konnte bei seruminkubierten Biopsien

signifikant mehr Gliadin in EE von Zöliakiepatienten als von CED-Patienten detektieren. Im Gegensatz dazu beinhaltete der serumfreie Ansatz von CED nicht signifikant weniger Gliadin in EE. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch eine Umverteilung des Gliadins von EE zu LE bei Zöliakieseruminkubation in CED-Biopsien erklären. Allerdings fand sich dieser Effekt lediglich bei dem polyklonalem Gliadinantikörper und ist aufgrund des geringen Stichprobenumfangs in dieser Probengruppe nicht sicher zu beurteilen. Grundsätzlich verläuft der intrazelluläre Transport luminal aufgenommener Antigene zum Beispiel OVA (Ovalbumin) in Morbus Crohn vergleichbar mit Enterozyten von gesunden oder zöliakieerkrankten Patienten [Hundorfean, Zimmer, Strobel, Gebert, Ludwig and Buning 2007], weiterhin ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen LAMP hochreguliert. Dennoch ist es denkbar, dass die qualitative Verteilung nach definierten Inkubationszeiten in CED verändert ist.

Toxische Gliadinpeptide erreichen LE in Enterozyten unter physiologischen Umständen nicht [Zimmer *et al.* 2010, Zimmer *et al.* 1995]. In Zöliakiebiopsien ohne Zöliakieserum, gesunden Kontrollbiopsien und CED-Biopsien lag der Anteil, gemittelt über alle AK, bei 2,95 % in LE. Dabei enthielten die CED den größten Anteil, was auf eine erhöhte LAMP-Expression oder möglicherweise auf entzündliche Prozesse (ähnlich der Zöliakie) zurückzuführen ist, welche die intrazellulären Transportvorgänge beeinflussen könnten. Jedoch enthielten Zöliakiebiopsien ohne Zöliakieserum, die ebenfalls als entzündliches Gewebe einzustufen sind, einen vergleichbar geringen Anteil an Gliadin in LE (2,92 %), sodass Inflammation keine alleinige Ursache sein kann. Die Inkubation von Zöliakiebiopsien mit Zöliakieserum bewirkte eine signifikant gesteigerte Aufnahme des Gliadins bis in LE (gemittelt 10 %, R5 & Cathepsin-D 13 %). Mit den AK-Kombinationen R5 bzw. WB 6/8 und Cathepsin-D war die in LE enthaltene Gliadinmenge der Zöliakiebiopsien, inkubiert mit Serum, signifikant höher als in allen Kontrollbiopsien. Durch den gesteigerten Gliadintransport in LE können mehr Gliadinpeptide über MHC-II an der Zelloberfläche an CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert werden. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, eine orale Toleranz gegen die toxischen Gliadinpeptide zu induzieren [Braciale and Braciale 1991, Desvignes, Bour, Nicolas and Kaiserlian 1996]. Kein Zellkompartiment hatte in

letzten genannten Ansätzen eine deutlich verringerte Gliadinmenge, sodass dass der Mehranteil in LE gleichmäßig umverteilt wurde.

Die AK-Kombination p- α -Gliadin und LAMP-2 konnte diesen Transportunterschied nur zwischen Zöliakiebiopsien mit und ohne Zöliakieserum aufzeigen. Im Vergleich dazu hatten gesunde Kontrollen und CED-Patienten nicht signifikant weniger Gliadin in LE als Zöliakiebiopsien mit Serum inkubiert. Das unterschiedliche Verhalten der AK erklärt sich durch die verschiedenen erkannten Epitope der AK. Während R5 P57-68 und P31-43 erkennt, reagiert der WB 6/8 nur auf Letzteres. Davon ausgehend, sind die durch diesen AK markierten Signale in LE zumindest anteilig durch P31-43 ausgelöst. Der polyklonale p- α -Gliadin reagiert mit vielen gliadintypischen Epitopen. Die Lücke der Erkennung in LE kann durch verhältnismäßig viel Gliadin in anderen Zellkompartimenten entstanden sein, da nur die relative und nicht die absolute Verteilung erfasst wurden. Durch das unspezifischere Labeling des polyklonalen AK wurden möglicherweise überdurchschnittlich viele Peptide in anderen Kompartimenten markiert. Daraus resultiert eine geringe Labelverteilung in LE.

Auffallend war der überaus große Gliadinanteil an der AM mit dem p- α -Gliadin-AK, dessen Signal an der AM deutlich stärker war als die Label der AK R5 und WB 6/8 (10,8 % gegen 5,6 bzw. 4,3 %). Das unterschiedliche Reaktionsverhalten der AK könnte diesen Sachverhalt erläutern, da der polyklonale AK mehrere verschiedene Epitope erkennt. Das Gegenteil könnte bei dem Label auf dem Golgi-Apparat der Fall sein: Hier erbringt der WB 6/8 die stärksten Signale. Dieser AK ist zwar am stärksten restringiert, jedoch hat er im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten AK die Fähigkeit, auch deamidierte Peptide zu markieren. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Golgi-Apparate vor allem deamidiertes Gliadin enthalten.

An der BL konnte bei Zöliakiebiopsien ein größerer Anteil an Gliadin als bei gesunden oder kranken Kontrollen gefunden werden. Diese Tatsache könnte den früheren Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe entsprechen, dass OVA nach Passage der EE an die BL transportiert werden [Zimmer *et al.* 2000].

Die Biopsien von CED-Patienten wichen in den Labelverteilungen von gesunden Kontrollen und Zöliakiepatienten häufig ab. So war an der AM

überdurchschnittlich viel Gliadin, während die BL eher schwach markiert wurde. Möglicherweise findet eine verzögerte Aufnahme der Gliadinfragmente in CED-Enterozyten statt, sodass die dargestellte Situation mit viel Gliadin an der AM und wenig an der BL einem zeitlich frühen Stadium entspricht. Für Zöliakieenterozyten ist beschrieben, dass OVA an der BL freigesetzt werden [Zimmer *et al.* 2000]. In CED-Enterozyten könnten ähnliche Vorgänge stattfinden, die nach den 60 Minuten der Inkubation der Biopsien lediglich nicht so weit fortgeschritten sind. Generell ist der Antigentransport in CED-Enterozyten mit normalen und Zöliakie-Enterozyten vergleichbar [Hundorfean *et al.* 2007]. Auch in Golgi-Apparaten bei CED-Biopsien findet sich bis zu vier Mal mehr Gliadin als der Durchschnitt bei Gliadinmarkierungen mit dem WB 6/8-AK. Dieser Sachverhalt trifft bei Inkubation mit und ohne Zöliakieserum zu. Die anderen Antikörperkombinationen zeigten keine Besonderheiten der Golgi-Apparate in CED-Biopsien. Der Vergleich der verschiedenen AK in diesem Zusammenhang lässt schlussfolgern, dass vor allem deamidierte toxische Gliadinpeptide auf den Golgi-Apparaten vorhanden sind. Die Markierung dieser Sequenzen unterscheidet den WB 6/8 von den anderen eingesetzten Gliadin-AK.

4.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten die Gliadinpeptide und deren intrazellulärer Transport in intestinalen Zellen untersucht werden. Unter standardisierten Bedingungen wurden Zellen mit P31-43 und P57-68 inkubiert. Der Effekt von humanem Zöliakieserum und Kontrollserum während der Inkubation wurde am IF-Mikroskop ausgewertet. Mithilfe der Mikroskopiesoftware ließen sich die Kollokalisationskoeffizienten der Signale der Peptide und der Marker für frühe und späte Endosomen berechnen.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Gliadin(-Peptide) über Endozytose absorbiert werden. Zum einen wurden die Peptide nach kurzen und langen Inkubationszeiten im endosomalen Kompartiment aufgefunden. Zum anderen war die Aufnahme temperaturabhängig. Experimente bei +4°C zeigten kein intrazelluläres Gliadin im Vergleich zu Experimenten bei Raumtemperatur und sonst identischen Bedingungen. Die Endozytose ist ein aktiver Prozess, der wie andere biochemische Reaktionen durch eine Temperatursenkung gemäß der Van't

Hoffschens-Regel verlangsamt bzw. blockiert werden kann. Eine niedrige Temperatur blockierte die Gliadinaufnahme vollständig, was auf einen aktiven Prozess hindeutet. Diese Eigenschaften deuten auf die Endozytose als Aufnahmemechanismus hin und bekräftigen die bisher aufgestellten Theorien [Mukherjee *et al.* 1997].

Allgemein beeinflusste die Inkubation der Zellen mit 20 % Serum im Inkubationsmedium weder die qualitative noch die quantitative Aufnahme und die Transportwege der Gliadinpeptide. Das Serum der Kontroll- und Zöliakiepatienten zeigte an den Caco-2-Zellen keine Mehr- oder Minderaufnahme der Peptide in EE. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die im Folgenden gezeigten Effekte nicht generell auf der Zugabe von Serum beruhen. Das Serum verhielt sich in diesem Versuchsaufbau allgemein neutral. Über die Gesamtaufnahme der Peptide lässt sich anhand des IF-Versuchaufbaus keine Aussage treffen, jedoch zeigte sich anhand der Biopsien kein signifikanter Unterschied. Auch die Gliadinaufnahme der Peptide in die LE war nicht signifikant durch Kontrollserum beeinflussbar, ebenso wenig wie das P57-68 durch Zöliakieserum. Im Gegensatz dazu gab es signifikante Veränderungen der Inkubation von P31-43 mit Zöliakieserum. Dieser Effekt ist folglich nicht auf Serum generell, sondern auf Zöliakieserum bzw. spezifische Inhaltsstoffe daraus zurückzuführen.

Die zwei verschiedenen Inkubationsarten Pulse und Chase hatten die Intention verschiedene Stadien des intrazellulären Peptidtransports darzustellen. Die Inkubationszeit war bei beiden Arten mit 20 Minuten identisch, jedoch wurden die Zellen bei der Chase-Stimulation nicht direkt im Anschluss, wie bei der Pulse-Stimulation, fixiert, sondern stattdessen für drei Stunden mit DMEM ohne Peptide weiter inkubiert. Auf diese Weise war die aufgenommene Menge der Peptide vergleichbar, jedoch konnten die Zellen bei der Chase-Stimulation die Peptide intrazellulär weitertransportieren. Zusammenfassend konstatiert, waren die Unterschiede zwischen den Inkubationsarten nicht signifikant, da die Kollokalisationskoeffizienten mit Markern von EE und LE in den Chase-Ansätzen lediglich marginal höher und teilweise sogar niedriger waren. Das bedeutet, dass der Transport in EE und LE in weniger als 20 Minuten nahezu vollständig abgeschlossen war. Diese Erkenntnisse entsprechen auch den früheren dieser und anderer

Arbeitsgruppen, in denen auch Zeiträume von zehn Minuten als ausreichend bewertet wurden [Buning *et al.* 2006, Zimmer *et al.* 2000].

Ähnlich der Elektronenmikroskopie zeigten sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie die meisten Gliadinpeptide in EE. Die EE sind möglicherweise für eine Antikörper-vermittelte Toleranz von entscheidender Bedeutung, da es denkbar ist, dass die Fc-Rezeptorbindung bzw. die Komplexbindung des Gliadins mit den AK dort stattfindet. Sowohl das toxische Peptid 31-43 als auch das immunogene Peptid 57-68 zeigten hohe Kolokalisationskoeffizienten mit EEA1 zwischen 0,8 und 0,95. Folglich waren die Signale der Peptide und von EEA1 fast kongruent. Die einzelnen Gruppen (Zöliakie-, Kontrollserum) unterschieden sich nicht signifikant in den Kolokalisationskoeffizienten. Ebenso waren beide untersuchten Peptide 31-43 und 57-68 mit jeweils sehr hohen, untereinander nicht signifikant abweichenden Koeffizienten vertreten. Die einzige, wenn auch geringe Signifikanz bestand in einem höheren Koeffizienten zwischen P31-43 und EEA1 in der Pulseinkubation bei Zöliakieserum im Vergleich zu Kontrollserum. Vergleichend dazu gab es in der Chaseinkubation keine signifikanten Unterschiede. Eine weitere Untersuchung mit unterschiedlichen Inkubationszeiten könnte dieses Ergebnis validieren. Da es im Allgemeinen keine signifikanten Unterschiede zwischen Pulse und Chase gab, scheint die Pulseinkubation über 20 Minuten mit sofortiger Fixierung zu lang zu sein.

Die Untersuchung der LE zeitigte bemerkenswerte Ergebnisse. Als Marker für LE wurde LAMP-2 eingesetzt. Das P57-68 zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Zöliakie- und Kontrollserum und hatte hohe Koeffizienten mit LAMP-2, was bedeutet, dass das Peptid zu großen Anteilen das LE erreicht hat. Diese Erkenntnisse bestätigen die von Zimmer *et al.* [Zimmer *et al.* 2010]. Im Gegensatz dazu zeigt das toxische Peptid 31-43 kleine Koeffizienten mit purem Zellkulturmedium von 0,48 und mit Zugabe von Kontrollserum im Mittel 0,47, jedoch sehr hohe Koeffizienten von durchschnittlich 0,81 nach Inkubation mit Zöliakieserum im Medium. Die aufgeführten Werte stammen jeweils von der Pulse-Stimulation, die Chase-Werte waren vergleichbar. Das Zöliakieserum erzielte eine Modifikation des intrazellulären Transports des P31-43 bis in LE. Kontrollserum und

Zellkulturmedium waren ohne Effekt. Die Experimente mit Zellkulturmedium dienten als neutrale Kontrolle.

4.3 Die Ergebnisse im Kontext anderer Studien

4.3.1 *Protektiver Effekt der Muttermilch*

Das Immunsystem eines Neugeborenen ist zunächst unreif und bedarf einiger Zeit zum Reifen. Für diesen Zeitraum besteht ein Schutz durch mütterliche Antikörper der Klasse IgG, die transplazentar auf das Kind übergegangen sind; der sogenannte Nestschutz. Ein weiterer Schutzmechanismus besteht durch IgA, Laktoferrin und Oligosaccharide, die das Kind über die Muttermilch aufnimmt. Durch ausreichendes Stillen eines Säuglings können Infektionen und möglicherweise auch Allergien und das Auftreten der Zöliakie gemindert werden [Hanson, Korotkova, Haversen, Mattsby-Baltzer, Hahn-Zoric, Silfverdal, Strandvik and Telemo 2002].

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass eine negative Korrelation zwischen dem Stillen von Säuglingen mit der Prävalenz der Zöliakie existiert. Wird ein Säugling zu dem Zeitpunkt gestillt, zu dem Gluten in seine Nahrung eingeführt wird, so ist das Risiko, eine manifeste Zöliakie zu entwickeln, signifikant gesenkt [Auricchio *et al.* 1983]. Eine Metaanalyse von Akobeng *et al.* über sechs verschiedene Fall-Kontrollstudien mit zusammen über 4600 Probanden zeigte, dass das Stillen während der Glutengewöhnung eine Riskoreduktion von 52 % bewirkte [Akobeng, Ramanan, Buchan and Heller 2006]. Ein noch geringeres Zöliakierisiko resultiert in einer Fortführung des Stillens über einen gewissen Zeitraum nach dem Einführen glutenhaltiger Kost hinaus. Weiterhin scheint es ratsam, zunächst geringe Mengen an Getreideproteinen zuzufüttern, um das Auftreten der Glutenunverträglichkeit noch weiter zu reduzieren [Ivarsson *et al.* 2002]. Aufgrund dieser Erkenntnisse werden Stillempfehlungen ausgesprochen [Sollid 2002]. Durch fehlende Follow-Up-Untersuchungen ist bisher nicht endgültig geklärt, ob Stillen tatsächlich einen langfristigen Schutz vor der Zöliakie bietet oder ob es lediglich zu einem späteren Auftreten der Symptome kommt.

Die Ursache für den protektiven Effekt der Muttermilch gegenüber der Glutenunverträglichkeit ist bisher nicht geklärt. Ein Bestandteil der Muttermilch

scheint in den Pathogenesemechanismus der Zöliakie einzugreifen. Die Analyse der Inhaltsstoffe der Muttermilch zeigt, dass neben anderen, von der Mutter oral aufgenommenen Antigenen auch Gliadin enthalten ist. Die enthaltene Menge an nicht-degradiertem Gliadin unterliegt großen Schwankungen. Im Mittel liegt sie bei normaler Muttermilch bei 178ng/ml und bei Kolostrum sind es 883ng/ml. Im Vergleich dazu liegt der Gliadinegehalt im Serum nur bei durchschnittlich 41ng/ml [Chirido, Rumbo, Anon and Fossati 1998]. Die Muttermilch enthält neben den Nahrungsantigenen auch entsprechende spezifische Antikörper. So enthält die Muttermilch eine bedeutende Menge an Anti-Gliadin-IgA, während Kolostrum eine noch höhere Konzentration aufweist. Der Antikörper-Gehalt der Muttermilch sinkt mit steigender Dauer der Laktation stetig ab [Ozkan *et al.* 2000, Rumbo *et al.* 1998].

4.3.2 Gliadinlokalisationen innerhalb der Enterozyten

Die meisten Nahrungsproteine werden bis zur Absorption mechanisch und chemisch unter Einfluss von Verdauungsenzymen degradiert. Gliadin kann dennoch nicht parazellulär aus dem Darmlumen zu der *Lamina propria* gelangen, da eine Molekülgröße von mehr als 5500kDa für diesen sogenannten Solvent Drag als limitierend gilt und Gliadinpeptide, wie auch die experimentell verwendeten, eine etwa fünffach größere Molekülgröße aufweisen [Pappenheimer and Reiss 1987]. Weiterhin finden sich Gliadinpeptide in zahlreichen Vesikeln der Endozytose als Zeichen der transzellulären Resorption. Die Endozytose ist ein aktiver und somit ATP- und temperaturabhängiger Prozess [Mukherjee *et al.* 1997]. Entsprechend der Van't Hoff'schen-Regel kann bei niedrigen Temperaturen die Endozytose blockiert werden, wie der Versuchsaufbau bei +4°C in der IF beweist. Gliadin und Gliadinpeptide werden von Enterozyten vermutlich wie viele andere Nahrungsmittelproteine unspezifisch endozytiert, da kein Rezeptor bekannt ist.

Wenige Minuten nach der Aufnahme von Gliadinbestandteilen durch Enterozyten befinden sich wesentliche Mengen in frühen Endosomen und im Zytosol. In EE sind HLA-Klasse-I-Moleküle, die von fast allen humanen Zellen konstitutiv exprimiert werden [Chiu, Davis and Strominger 1999, Gromme *et al.* 1999]. Durch Konjugation der Antigene an HLA-I ist eine Cross-Präsentation der Gliadinpeptide als exogenes Antigen über MHC-I an zytotoxische Lymphozyten möglich.

Zahlreiche Proteine werden nach Passage der EE in die LE transportiert. Dort sind Moleküle der Klasse MHC-II vorhanden, an die sich exogene Antigene binden können, wenn sie das LE erreichen. Diese Konjugation und ein nachfolgender Transport an die Zelloberfläche sind die Voraussetzungen für eine Präsentation der Antigene an CD4⁺-T-Lymphozyten [Bland and Whiting 1989, Hershberg, Framson, Cho, Lee, Kovats, Beitz, Blum and Nepom 1997, Mayrhofer and Spargo 1990, Peters, Neefjes, Oorschot, Ploegh and Geuze 1991]. Der Transport von exogenen Antigenen in LAMP-positive LE verstärkt die Präsentation derselben [Rowell, Ruff, Guarnieri, Staveley-O'Carroll, Lin, Tang, August and Siliciano 1995]. Es konnte gezeigt werden, dass Ovalbumin als Beispielprotein für ein Nahrungsmittelantigen in naiven BALB/c-Mäusen zunächst in LE und anschließend mittels Exosomen zum Parazellularraum transportiert wurde. Auf diese Weise konnten BALB/c-Mäuse eine orale Toleranz entwickeln [Zimmer *et al.* 2000]. In SCID-Mäusen (severe combined immune deficient) findet kein Transport bis in LE statt. Es kam auf diesem Weg nicht zu einer Toleranzentwicklung [Furrie, Turner and Strobel 1994].

Gliadin aus FF gelangt in frühe und teils in späte Endosomen. Werden jedoch toxische Peptide differenziert untersucht, lässt sich feststellen, dass deren Transport nicht die LE erreicht. Stattdessen umschiffen Peptide, wie z.B. P31-43, nach Passage der EE die LE und sind anschließend an der BL aufzufinden. Auf diesem Weg entgehen sie der Antigenpräsentation [Zimmer *et al.* 2010]. Diese auf ultrastruktureller Ebene gewonnenen Erkenntnisse lassen sich auch mit anderen Methoden bestätigen. Beispielsweise Zellkulturen mit Caco-2-Zellen mit einer geeigneten HLA-Konstellation eignen sich als Zöliakiemodell. In HPLC-Analysen (High performance liquid chromatography) konnte nachgewiesen werden, dass das toxische Gliadinpeptid 31-49 einem andersartigen intrazellulären Transport in Zöliakiepatienten unterliegt: Im Gegensatz zu P57-68 und P57-89 als Kontrollpeptide gelangte das Peptid etwa zur Hälfte, nicht degradiert von der Mukosa, zur Serosa in Zöliakiepatienten. Dieser Degradierungsdefekt findet sich in Kontrollpatienten nicht [Matysiak-Budnik, Candalh, Dugave, Namane, Cellier, Cerf-Bensussan and Heyman 2003]. In der vorliegenden Arbeit konnte verdeutlicht werden, dass toxische Peptide in Kontrollpatienten die LE unter physiologischen Umständen nicht erreichen, wo sich immunogene Peptide bereits nach wenigen Minuten Inkubationszeit ansammeln. Durch diese unvollständigen endosomale

Degradation gelangt übermäßig viel nicht degradiertes Gliadin an die BL, wo es darüber hinaus auch nicht an regulatorischen T-Zellen präsentiert wird, da es sich der Assoziation mit HLA-DR entzogen hat. Denkbar ist, dass epithelial transzytiertes P31-49 in der *Lamina propria* von klassischen APC aufgenommen und präsentiert wird. Vermutlich findet dieser Vorgang *in vivo* jedoch nicht statt, da das Peptid eher schlecht an HLA-DQ2/8 bindet und bisher noch kein spezifischer T-Zellklon ausfindig gemacht werden konnte [Brandtzaeg 2006, Shan *et al.* 2002]. Da diese klassische Antigenpräsentation ausbleibt, verursacht das intakte Peptid am ehesten eine unspezifische Immunreaktion. Beim Stillen von Säuglingen gelangt die Muttermilch in Kontakt mit nahezu naiver Dünndarmschleimhaut. Es besteht weiterer Untersuchungsbedarf um zu eruieren, ob der Transport von Gliadinpeptiden in Schleimhaut mit stattgehabten Gliadinkontakt von dem in naiver Schleimhaut differiert.

Eine italienische Arbeitsgruppe beschreibt das Vorliegen des P31-43 in LE in T-84-Zellen ohne besondere Vorbehandlung [Luciani, VILLELLA, Vasaturo, Giardino, Pettoello Mantovani, Guido, Cexus, Peake, Londei, Quaratino and Maiuri 2009]. Diese Beobachtung scheint in Kontrast zu den Erkenntnissen der vorliegenden und vergleichbaren Arbeiten zu stehen, die diese Lokalisierung als physiologisch nicht vorkommend anzusehen ist. Im Wesentlichen könnten drei verschiedene Ursachen für die Beschreibung von Luciani *et al.* verantwortlich sein, die auf das mit den Peptiden konjugierte Biotin zurückzuführen sind. Biotin verändert Endozytose- und Transportvorgänge, z.B. indem es eine über Biotin rezeptorvermittelte Endozytose absorbiert wird. Dadurch kann es als Nanocarrier z.B. für den Medikamententransport dienen [Yellepeddi, Kumar and Palakurthi 2009]. Caco-2-Zellen sind in der Lage, Biotin carriervermittelt transzellulär zu transportieren [Ng and Borchardt 1993]. Ein Stoff mit transportmodulierenden Eigenschaften, wie Biotin, eignet sich eher nicht als Marker, um native und veränderte Transportwege aufzuklären. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nicht das Biotin-Peptid-Konjugat, sondern das Biotin isoliert in die LE geleitet wurde, falls es sich vorher vom Peptid gelöst haben könnte. In der genannten Arbeit wurde nur der Weg des Biotins verfolgt. Als dritte Hypothese könnte das Biotin als aktives Co-Enzym (v.a. für Carboxylierungsreaktionen) ungeplante Effekte intrazellulär auslösen, die wiederum einen akzidentiellen Einfluss auf den Peptidtransport haben. Darüber hinaus werden

in der Arbeit von Luciani *et al.* unphysiologisch lange Inkubationszeiten von 24 Stunden verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde in der IF der biochemisch inerte Alexa-Farbstoff und für die EM-Experimente reine, unmarkierte Gliadinfragmente, die erst sekundär über Immunhistochemie darstellbar gemacht wurden, verwendet. Durch diese Vorgehensweisen konnte eine artifizielle Markierung vermieden werden.

4.3.3 Modifikation intrazellulärer Transportprozesse

Es gibt verschiedene Methoden, um experimentell auf die intrazellulären Transportprozesse Einfluss zu nehmen. Beispielsweise kann das transportierte Peptid durch steuernde Signalsequenzen ergänzt werden [Rowell *et al.* 1995]. Ein Protein, das transportmodulierende Eigenschaften besitzt, ist die Untereinheit B des Cholera-toxins (CTB). Konjugiert an Antigene, dient CTB als effizienter Transporter zur oralen Toleranzinduktion über den Gangliosidrezeptor GM-1 [Sun, Xiao, Lindblad, Li, Link, Czerkinsky and Holmgren 2000]. CTB ermöglicht es, weitaus geringere Antigendosen für Toleranzinduktionen als üblich zu verwenden und befördert Antigene vornehmlich in LE. Für Gliadin konnte bereits mit einem CTB-Konjugat der gewünschte Transport von toxischen Gliadinpeptiden in LE nachgewiesen werden [Zimmer *et al.* 2010].

Die Arbeitsgruppe um Ira Mellmann hat einen entscheidenden Effekt aufgedeckt: Fc-Rezeptoren, die durch monovalente Antikörper markiert sind, verfolgen einen anderen intrazellulären Weg als solche, die zu polyvalenten Immunkomplexen gebunden sind. Monovalente AK können an Fc-Rezeptoren keine benachbarten Rezeptoren quervernetzen. In den Experimenten sind nur wenige Antikörper in die Zellen eingedrungen, erreichten die frühen Endosomen und wurden rasch wieder an die Zellmembran recycelt [Mellman, Plutner and Ukkonen 1984]. Die Fc-Rezeptoren, die zu polyvalenten Komplexen gebunden wurden, wurden extrem schnell internalisiert ($t_{1/2} < 2$ min) und in Lysosomen transportiert, die durch die monovalenten Gebilde gar nicht erreicht wurden [Mellman and Plutner 1984]. Aus dieser Erkenntnis leitet sich die Hypothese ab, dass die Komplexierung von Gliadin und anti-Gliadin-AK den Antigentransport in LE ermöglicht.

4.3.4 Antigenpräsentierende Funktion von Enterozyten

Neben den klassischen, professionellen APC gibt es weitere Zellpopulationen mit der Fähigkeit, Antigene an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Zu dieser Gruppe gehören neben anderen Epithelzellen auch Enterozyten. Die M- bzw. Domepithel-Zellen, die oberhalb der Peyer-Plaques liegen, sind für diesen Vorgang bedeutend, da sie den Transport von Makromolekülen zu dem tiefer liegenden lymphatischen Gewebe ohne signifikante Modifizierung durchführen [Hershberg, Cho, Youakim, Bradley, Lee, Framson and Nepom 1998, Hershberg *et al.* 1997, Hershberg and Mayer 2000, Mayrhofer 1995, Mayrhofer and Spargo 1989].

Enterozyten sind oral aufgenommenen Antigenen direkt exponiert und durch die Expression vieler potentieller Antigenrezeptoren an der apikalen Zellmembran prädestiniert für die rezeptorvermittelte Endozytose. Sie produzieren eine Vielzahl an Zytokinen, z.B. IL-1, IL-6 und TGF- β , sie exprimieren MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle, nicht-klassische MHC-Moleküle, wie beispielsweise MICA, MICB und CD1d, sowie costimulatorische Moleküle, unter anderem CD58 und gp180 [Hershberg and Mayer 2000, Mayrhofer 1995]. Dies sind Hinweise für eine aktive immunogene Beteiligung. MHC-II wird von reifen Enterozyten in späten endozytotischen Kompartimenten, z.B. Multivesikularkörperchen und LY, konstitutiv exprimiert, es kann jedoch durch eine Interferon- γ -Stimulation oder im Entzündungsstadium vermehrt werden [Hershberg *et al.* 1997, Mayrhofer and Spargo 1989]. Eine Antigenpräsentation kann an IEL oder Lymphozyten in der *Lamina propria* erfolgen [Hershberg *et al.* 1998, Hershberg *et al.* 1997]. Es ist nicht gesichert, ob Enterozyten *in vivo* die Potenz haben, naive CD4⁺-T-Lymphozyten zu stimulieren. Gezeigt ist jedoch, dass sie costimulatorisch wirken können. Im entzündungsfreien Zustand exprimieren Enterozyten jedoch nicht die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Möglicherweise führt eine MHC-Peptid-Interaktion mit einem T-Zell-Rezeptor in Abwesenheit von CD86 zur Entwicklung einer oralen Toleranz [Hershberg and Mayer 2000]. Intestinale Zellen exprimieren mehr HLA-DR als HLA-DQ, was vermutlich ein Zeichen dafür ist, dass HLA-DR in diesem Zusammenhang für die Antigenpräsentation eher entscheidend ist [Bonamico, Mazzilli, Morellini, Vania, Carpino, Nicotra and Natali 1989, Hershberg *et al.* 1997]. Eine Arbeitsgruppe aus New York hat nachgewiesen, dass

HLA-DR in der T-Zell-Aktivierung durch Enterozyten beteiligt ist [Dotan, Allez, Nakazawa, Brimnes, Schulder-Katz and Mayer 2007].

4.3.5 *Orale Toleranz*

Das darmassoziierte-lymphatische-Gewebe (GALT) ist verantwortlich für die Diskriminierung zwischen pathogenen und harmlosen Antigenen, die über die insgesamt 400m² große Darmsurface Zugang zu dem Körper haben. Die physiologische orale Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen versagt bei etwa 5 % der Bevölkerung. Viele dieser Unverträglichkeiten sind im Kindesalter selbstlimitierend [Strobel and Mowat 1998].

Grundsätzlich werden sämtliche Stoffe aus dem Darm toleriert, es sei denn, sie lösen durch spezifische Signale eine Immunantwort aus. Viele potentielle Schadstoffe werden direkt im Lumen von sekretorischem IgA gebunden und können nicht resorbiert werden. Es werden permanent Antigene aus dem Darmlumen von dendritischen Zellen an T-Zellen der Peyer-Plaques oder der mesenterialen Lymphknoten präsentiert. Auf diese Weise werden regulatorische CD4⁺-T-Zellen generiert, denen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer oralen Toleranz zugesprochen wird [Rescigno, Urbano, Valzasina, Francolini, Rotta, Bonasio, Granucci, Kraehenbuhl and Ricciardi-Castagnoli 2001, Stepniak and Koning 2006]. Enterozyten sind weiterhin an der intestinalen Antigenpräsentation und möglicherweise auch an einer Toleranzentwicklung beteiligt. Neben der Antigenpräsentation sind sie befähigt, bereits geprägte CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten zu supprimieren und deren Proliferation zu hemmen. Dies geschieht durch Sekretion der immunsuppressiven Zytokinen IL-10 und TGF-β, die auch T-Helferzellen-2 oder regulatorische T-Zellen zum Ausdifferenzieren anzuregen vermögen [Cruickshank, McVay, Baumgart, Felsburg and Carding 2004, Galliaerde, Desvignes, Peyron and Kaiserlian 1995]. Enterozyten können zusätzlich in das basolaterale Kompartiment Antigene in Form von Exosomen abgeben, die von dort von professionellen APC präsentiert werden können.

Der genaue Mechanismus der oralen Toleranz ist nach aktuellem Literaturstand nicht vollständig verstanden. Die Erforschung dieses Phänomens hat bisher eine 100

Jahre lange Historie. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass $CD8^+$ -Suppressor-T-Zellen eine entscheidene Funktion tragen. Diese These wurde verworfen, da die Zerstörung (Deletion) und/oder Energielosigkeit (Anergie) von $CD4^+$ -T-Zellen und die Induktion von regulatorischen $CD4^+$ -T-Zellen für Toleranzereignisse verantwortlich sind [Dubois, Goubier, Joubert and Kaiserlian 2005, Mowat, Parker, Beacock-Sharp, Millington and Chirdo 2004].

Es gibt zwei Wege, eine orale Toleranz zu erzeugen, welche antigendosisabhängig eingeschlagen werden (siehe Abbildung 4.1). Niedrige, repetitive Dosen eines Antigens führen zu einer aktiven Suppression, die durch eine Induktion regulatorischer T-Zellen im GALT (vor allem in den Peyer-Plaques) vermittelt wird. Von dort aus migrieren die vorwiegend $CD4^+$ -T-Zellen in das systemische Immunsystem. Ein wichtiger Mechanismus der aktiven Suppression ist die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen als Reizantwort auf eine antigenspezifische Triggerung [Chen, Inobe, Marks, Gonnella, Kuchroo and Weiner 1995]. Die regulatorischen $CD4^+$ -T-Zellen sind in drei Klassen eingliederbar: TGF- β sezernierende Th3-Zellen, TR1-Zellen, die IL-10 freisetzen, und $CD4^+$ - $CD25^+$ -Zellen, die vermutlich gebundenes TGF- β tragen [Chehade and Mayer 2005].

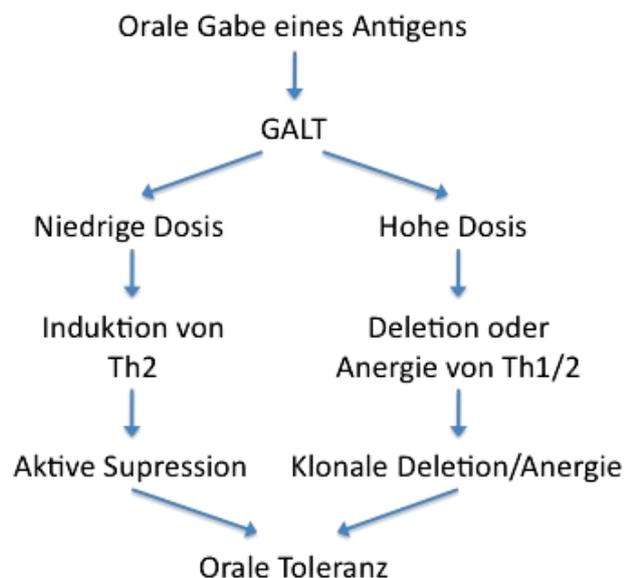


Abbildung 4.1 Die verschiedenen Mechanismen der oralen Toleranz

Die Abbildung zeigt die dosisabhängigen Prinzipien der Induktion einer oralen Toleranz.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [Weiner 1997]

Die Toleranzentwicklung nach der Hochdosisgabe eines Antigens entsteht bei Abwesenheit von costimulatorischen Signalen, z.B. dem proinflammatorischem

Zytokin IL-2 oder bei Interaktion von costimulatorischen Rezeptoren auf T-Zellen und APC, wie zum Beispiel CD28 bzw. CD80 und CD86 [Appleman and Boussiotis 2003]. Es kommt zu einer Anergie der Lymphozyten und dadurch zu einer Reduktion der Immunantwort (siehe Abbildung 4.1). Tierexperimentell ist darüber hinaus die antigenspezifische Deletion von T-Zellen beschrieben, die bei der physiologischen Toleranz nicht relevant ist, da unverhältnismäßig hohe Dosen der Antigene eingesetzt werden müssen [Strobel and Mowat 1998].

Die Entwicklung einer oralen Toleranz hängt von vielen Faktoren ab. Die Antigendosis, -häufigkeit und -form sind genauso wie die Eigenschaften des Organismus, zum Beispiel Genetik, Darmflora, Alter, bedeutend. Weiterhin gibt es zahlreiche immunmodulatorische Faktoren, die eine Toleranz begünstigen (z.B. IL-4, IL-10, TGF- β) oder behindern (u.a. IL-1, IL-2, IL-12, IL-18) [Chehade and Mayer 2005, Dubois *et al.* 2005].

Bei Patienten mit Zöliakie liegt ein Versagen der oralen Toleranz gegenüber Gluten vor. Die Ursache dafür ist ungeklärt, jedoch ist anzunehmen, dass für dieses Toleranzversagen gegenseitig ergänzende Mechanismen verantwortlich sind. So schwenkt die physiologische Toleranz gegenüber Gluten zu einer chronischen Inflammation um [Meresse *et al.* 2009, Stepniak and Koning 2006]. Die Erforschung dieser Hintergründe steht in Zentrum der derzeitigen Zöliakieforschung, ebenso wie mögliche Ansätze, die orale Toleranz wiederherzustellen. Ein potentieller Weg besteht in der Modifikation des intrazellulären Transports der Glutenpeptide, sodass sie in späte Endosomen transportiert werden. Neben anderen wichtigen Funktionen haben LE eine wesentliche immunologische Bedeutung, da sich in ihrem Lumen HLA-Moleküle der Klasse II befinden, die dort mit entsprechenden exogenen Antigenen assoziieren können. Antigene können von dieser Lokalisierung aus im weiteren Verlauf an der Zelloberfläche zum Beispiel an CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert werden [Geuze 1998, Peters *et al.* 1991, Rowell *et al.* 1995]. Für die Zöliakie ist eine Lokalisation von Gliadin(-Peptiden) in LE interessant, da auf diesem Weg eine orale Toleranz induziert werden könnte [Zimmer *et al.* 2000, Zimmer *et al.* 1998, Zimmer *et al.* 1995]. Intrazelluläre Transportwege lassen sich verändern, z.B. ist es möglich, Proteine gezielt in LE zu leiten. Eine derartige

Modifikation ist durch Konjugation der Gliadinpeptide mit Cholera toxin (Untereinheit B) bereits gelungen [Zimmer *et al.* 2010].

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte verdeutlicht werden, dass toxische und immunogene Gliadinpeptide innerhalb der Enterozyten unterschiedlich transportiert werden. Während toxische Peptide nach dem Erreichen der EE an der BL freigesetzt werden, erreichen immunogene Peptide auch die immunologisch bedeutsamen LE. Der Weg der toxischen Peptide hat sich durch Inkubation der Biopsien bzw. intestinalen Zellen mit Serum von Zöliakiepatienten als steuerbar herausgestellt: Damit inkubiert erreichen auch die toxischen Peptide die späten Endosomen. Dieser Effekt konnte *ex vivo* an Dünndarmbiopsien und *in vitro* an intestinalen Zelllinien reproduziert werden. Die Ergebnisse beider Methoden wirken konform und bestätigen sich dadurch auf unterschiedlichen Modellebenen.

Das Serum für die Inkubation stammte von Zöliakiepatienten und wies hohe Antikörpertiter gegen Gliadin auf. Die zugrunde liegende Hypothese besagt, dass sich die Gliadinpeptide mit den AK zu Komplexen zusammenlagern. Polyvalente Komplexe werden intrazellulär oftmals bis in LE geleitet, von wo aus eine orale Toleranz gegen diese eingeleitet werden kann. Die Ausgangssituation der Experimente wirft weitere Fragen auf. Welcher Inhaltsstoff im Serum sorgt für den beobachteten Effekt? Möglicherweise sind es nicht gliadinspezifische IgA, die auch für den protektiven Effekt der Muttermilch verantwortlich sein könnten. Es gibt in Serum eine Reihe von verschiedenen Proteinen, denen grundsätzlich eine Auswirkung zuzuschreiben wäre. In den Zellkulturexperimenten dieser Arbeit konnte jedoch veranschaulicht werden, dass Serum von gesunden Kontrollen keinen verstärkten Gliadintransport in LE veranlasst. Folglich muss die Transportveränderung auf einen spezifischen Unterschied der Zöliakieseren zurückzuführen sein. Denkbar ist auch ein Einfluss der AK gegen die tTG, deren Titer in Zöliakieseren regelhaft ebenfalls deutlich erhöht sind. Um mögliche Auslösefaktoren der Beobachtung differenzierter untersuchen zu können, müsste IgA gegen Gliadin und ggf. auch weitere Inhaltsstoffe des Serums isoliert und separat eingesetzt werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, ein Negativexperiment

durchzuführen, in dem mit Zöliakieserum mit entzogenem gliadinspezifischen IgA inkubiert wird.

Eine weitere Frage, die es in Zukunft zu beantworten gilt, ist der Effekt von weiteren Substanzen, welche die Potenz haben, toxische Gliadinpeptide zu polyvalenten Komplexen untereinander oder anderweitig zu binden. Im Rahmen der Zöliakiepathogenese kommt der tTG eine wichtige Bedeutung zu. Sie kann mittels Transamidierungsreaktion Proteine mit einer Isopeptidylbindung quervernetzen [Sollid 2002]. Interessant ist die Fragestellung, ob die tTG, ähnlich wie gliadinspezifisches IgA bzw. Serum, toxischen Gliadinpeptiden bis in LE verhelfen kann.

Weiterhin gilt es, am Tiermodell zu überprüfen, ob der auf Zell- und Gewebeebene festgestellte Mechanismus der intrazellulären Transportwegveränderung in Gesamtorganismen ebenfalls auftritt. Ein Modell am Jejunum infantiler Mäuse konnte eine verstärkte Aufnahme einer Peptid 31-49-CTB-Konjugates in LE verzeichnen (Melcher *et al.* 2010).

4.5 Schlussfolgerung und Perspektiven

Der Pathomechanismus der Zöliakie ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. Nur bei einem geringen Anteil der Menschen mit genetischer Disposition liegt ein Versagen der oralen Toleranz gegen einige Speicherproteine verschiedener Getreidesorten vor. Eine kausale Therapie existiert bislang nicht. Der Inhalt vieler Forschungsvorhaben ist es, eine Prävention der Zöliakie oder die Induktion einer oralen Toleranz gegenüber nicht tolerierten Proteinen zu entwickeln. Die Tatsache, dass toxische Peptide in Zöliakiepatienten nicht in späte Endosomen transportiert werden, könnte ein Grund für das Versagen der Toleranz sein. Die vorliegende Studie hat einen Mechanismus untersucht, der zu einer Toleranz führen kann. So konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Zöliakieseren den Transport toxischer Gliadinpeptide bis in LE ablaufen lässt. Dieser Prozess fördert die Antigenpräsentierung eines toxischen Antigens und ist möglicherweise für die Toleranzentwicklung gegenüber Gliadin in genetisch disponierten Säuglingen bzw. den protektiven Effekt der Muttermilch gegenüber der

Zöliakie verantwortlich. Das experimentell verwendete Serum enthält ebenso wie Muttermilch große Mengen an gegen Gliadin gerichtetes IgA.

Dieser Effekt lässt sich möglicherweise als neue Präventionsmöglichkeit gegen die Zöliakie ausbauen. Im Sinne einer primären Prävention könnten genetisch disponierten Kindern IgA-Gliadin-Komplexe verabreicht werden, um das Immunsystem zu adaptieren. Der Mechanismus wäre in diesem Fall ähnlich dem einer Impfung. Um dieses Ziel zu erreichen, bedarf es zunächst weiterer Vorversuche. Die spezifische Analyse der Zytokinmuster nach Peptidapplikation mit und ohne Zugabe von IgA/Serum sollte untersucht werden. Das Muster der Zytokinzusammensetzung lässt Aussagen über den Toleranzstatus zu: Hohe Mengen antiinflammatorischer Zytokine, z.B. IL-4, IL-10, TGF- β und geringe Mengen proinflammatorischer Zytokine, z.B. IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, können auf den Zustand der Anergie hinweisen.

Die Ursachen des Toleranzversagens gegenüber bestimmten Getreidespeicherproteine bei der Zöliakie sind heutzutage weitgehend unverstanden. Für Ovalbumin und zahlreiche weitere (Nahrungsmittel-)Proteine ist die orale Toleranz untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über den intrazellulären Transportweg verschiedener Gliadinpeptide gewonnen werden. Es konnte ein Weg aufgezeigt werden, eine mögliche orale Toleranz für toxische Gliadinpeptide zu induzieren.

5 Zusammenfassung

INTRAZELLULÄRE TRANSPORTPROZESSE VON GLIADIN IN ENTEROZYTEN UND DEREN MODULATION DURCH ZÖLIAKIESERUM

Der Zöliakie liegt ein Versagen der physiologischen oralen Toleranz gegenüber den Speicherproteinen von Weizen (Gliadin), Roggen, Gerste und Hafer zugrunde. Stillen während des ersten Zufütterns von Gluten in der Säuglingszeit scheint gegenüber der Zöliakie protektiv zu wirken. Dieser Effekt ist möglicherweise ausgelöst durch Gliadin und gliadinspezifische Antikörper (AK), die in der Muttermilch enthalten sind. Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass polyvalente Gliadin-AK-Komplexe bis in späte Endosomen (LE) von Enterozyten transportiert werden. LE sind HLA-DR positiv, d.h. dorthin endozytierte Nahrungsmittelantigene können z.B. zur Toleranzinduktion an der basolateralen Membran an supprimierende T-Lymphozyten präsentiert werden. Das toxische Gliadinpeptid 31-49 erreicht LE von Enterozyten nicht. Dünndarmbiopsien von Zöliakie- und Kontrollpatienten wurden mit Gliadin und mit Serum von Zöliakiepatienten als AK-Quelle für 1 h bei 37°C inkubiert. Eine Immunogoldfärbung wurde an ultradünnen Gefrierschnitten durchgeführt. Außerdem wurden intestinale Caco-2-Zellen mit lissamin-rhodamin-markierten Gliadinpeptiden und Serum von Zöliakie- und Kontrollpatienten inkubiert und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Mit Hilfe von AK gegen Gliadin und späte Endosomen (Cathepsin D) wurde jeweils deren Co-Lokalisierung in Enterozyten bestimmt. Der für eine orale Toleranzinduktion bedeutende Anteil von Gliadin in späten Endosomen in Biopsien ließ sich durch eine Inkubation mit Zöliakieseren in Zöliakiebiopsien um Faktor Vier steigern. Durch Inkubation der Caco-2-Zellen mit Zöliakieserum gelangte das Peptid 31-43 verstärkt in späte Endosomen. Der Koloalisationsfaktor ließ sich mit Zöliakieseren auf 0,8 steigern, während Kontrollseren und Zellkulturmedium Faktoren von unter 0,5 erzielten. Die Inkubation mit Zöliakie-Seren fördert *ex vivo* und *in vitro* die Aufnahme des toxischen Gliadinpeptids in späte Endosomen von Enterozyten. Dieser Prozess ist für die Antigenpräsentierung eines toxischen Antigens erforderlich und möglicherweise für die Toleranzentwicklung gegenüber Gliadin in genetisch disponierten Säuglingen verantwortlich. Der protektive Effekt des Stillens gegenüber der Zöliakie könnte über Gliadin-Antikörper der Muttermilch vermittelt werden.

6 Summary

CORRECTION OF GLIADIN TRANSPORT WITHIN ENTEROCYTES THROUGH CELIAC DISEASE SERUM

Celiac disease (CD) is caused by loss of tolerance towards gluten and related cereal products. The delivery of gliadin peptides (GP) to HLA-DR positive late endosomes (LE) of enterocytes is required for antigen presentation and tolerance generation. We hypothesized that anti-gliadin antibodies in CD serum modify gliadin transport into LE within enterocytes. CD and control duodenal biopsies were incubated with digests of gluten as well as with serum of CD patients. Lissamin-labeled GP AA31-43 and AA56-68 were endocytosed by Caco-2 cells with serum of CD- or control-patients. Co-localization of gliadin with the LE marker LAMP-2 and cathepsin D was determined and quantified on immunofluorescence and immunoelectron microscopical level. Up to 13 % of internalized gliadin was located in LE of CD biopsies incubated with CD serum compared to less than 4 % in CD biopsies without CD serum as well as in control biopsies. In Caco-2 cells the co-localization-coefficient of GP AA31-43 and LE was 0.82 with CD serum, 0.42 with control serum and 0.48 with culture medium. Incubation with CD serum can direct GP AA31-43 into LE of enterocytes which is requires for antigen presentation.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Publikationen

1. **Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF.** Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child.* 2006 Jan;91(1):39-43.
2. **Alfalah M, Wetzel G, Fischer I, Busche R, Sterchi EE, Zimmer KP, Sallmann HP, Naim HY.** A novel type of detergent-resistant membranes may contribute to an early protein sorting event in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):42636-43.
3. **Anderson LA, McMillan SA, Watson RG, Monaghan P, Gavin AT, Fox C, Murray LJ.** Malignancy and mortality in a population-based cohort of patients with coeliac disease or "gluten sensitivity". *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 7;13(1):146-51.
4. **Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV.** In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.* 2000 Mar;6(3):337-42.
5. **Appleman LJ, Boussiotis VA.** T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev.* 2003 Apr;192:161-80.
6. **Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, Roepstorff P, Lundin KE, Sollid LM.** The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med.* 2004 Oct;1(1):e1.
7. **Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN.** The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 2000 Feb 21;191(4):603-12.
8. **Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM.** Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology.* 2002 Sep;123(3):803-9.
9. **Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen TS, Ekstrom K, Ekblom A.** Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology.* 2002 Nov;123(5):1428-35.
10. **Auricchio S, Follo D, de Ritis G, Giunta A, Marzorati D, Prampolini L, Ansaldi N, Levi P, Dall'Olio D, Bossi A, Cortinovis I, Marubini E.** Does

- breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1983;2(3):428-33.
11. **Barone MV, Caputo I, Ribecco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, Troncone R, Auricchio S, Esposito C.** Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology.* 2007 Apr;132(4):1245-53.
 12. **Biagi F, Corazza GR.** Mortality in celiac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar;7(3):158-62.
 13. **Bland PW, Whiting CV.** Antigen processing by isolated rat intestinal villus enterocytes. *Immunology.* 1989 Dec;68(4):497-502.
 14. **Bonamico M, Mazzilli MC, Morellini M, Vania A, Carpino F, Nicotra MR, Natali PG.** Expression of class II MHC antigens in the intestinal epithelium of pediatric celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1989 Oct;9(3):269-75.
 15. **Braciale TJ, Braciale VL.** Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol Today.* 1991 Apr;12(4):124-9.
 16. **Brandtzaeg P.** The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett.* 2006 Jun 15;105(2):127-39.
 17. **Bronstein HD, Haeffner LJ, Kowlessar OD.** Enzymatic digestion of gliadin: the effect of the resultant peptides in adult celiac disease. *Clin Chim Acta.* 1966 Aug;14(2):141-55.
 18. **Buning J, Hundorfean G, Schmitz M, Zimmer KP, Strobel S, Gebert A, Ludwig D.** Antigen targeting to MHC class II-enriched late endosomes in colonic epithelial cells: trafficking of luminal antigens studied in vivo in Crohn's colitis patients. *FASEB J.* 2006 Feb;20(2):359-61.
 19. **Caillat-Zucman S.** Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens.* 2009 Jan;73(1):1-8.
 20. **Caputo I, Barone MV, Martucciello S, Lepretti M, Esposito C.** Tissue transglutaminase in celiac disease: role of autoantibodies. *Amino Acids.* 2009 Apr;36(4):693-9.
 21. **Card TR, West J, Holmes GK.** Risk of malignancy in diagnosed coeliac disease: a 24-year prospective, population-based, cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Oct 1;20(7):769-75.
 22. **Catassi C, Fabiani E, Corrao G, Barbato M, De Renzo A, Carella AM, Gabrielli A, Leoni P, Carroccio A, Baldassarre M, Bertolani P, Caramaschi P, Sozzi M, Guariso G, Volta U, Corazza GR.** Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease. *JAMA.* 2002 Mar 20;287(11):1413-9.

23. **Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A.** A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jan;85(1):160-6.
24. **Catassi C, Fasano A.** Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 Nov;24(6):687-91.
25. **Cellier C, Delabesse E, Helmer C, Patey N, Matuchansky C, Jabri B, Macintyre E, Cerf-Bensussan N, Brousse N.** Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet.* 2000 Jul 15;356(9225):203-8.
26. **Cehade M, Mayer L.** Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Jan;115(1):3-12; quiz 3.
27. **Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL.** Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):177-80.
28. **Chirido FG, Rumbo M, Anon MC, Fossati CA.** Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol.* 1998 Nov;33(11):1186-92.
29. **Chiu I, Davis DM, Strominger JL.** Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):13944-9.
30. **Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Ara C, Biagi F, Perilli M, Amicosante G, Cifone MG, Corazza GR.** Gliadin and tissue transglutaminase complexes in normal and coeliac duodenal mucosa. *Clin Exp Immunol.* 2003 Dec;134(3):516-24.
31. **Conner SD, Schmid SL.** Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):37-44.
32. **Corrao G, Corazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C, Cottone M, Sategna Guidetti C, Usai P, Cesari P, Pelli MA, Loperfido S, Volta U, Calabro A, Certo M.** Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet.* 2001 Aug 4;358(9279):356-61.
33. **Cronin CC, Shanahan F.** Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet.* 1997 Apr 12;349(9058):1096-7.
34. **Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR.** Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut.* 2004 May;53(5):678-84.

35. **Daum S, Cellier C, Mulder CJ.** Refractory coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Jun;19(3):413-24.
36. **Desvignes C, Bour H, Nicolas JF, Kaiserlian D.** Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4+ T cell-depleted mice. *Eur J Immunol.* 1996 Aug;26(8):1756-61.
37. **Dicke WK, Weijlers HA, van de Kramer JH.** The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr Stockh.* 1953;42:34-42.
38. **Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D.** Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):797-801.
39. **Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D.** Pathomechanisms in celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Oct;132(2):98-108.
40. **Dotan I, Allez M, Nakazawa A, Brimnes J, Schulder-Katz M, Mayer L.** Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+ T cells to proliferate and secrete interferon-gamma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jun;292(6):G1630-40.
41. **Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D.** Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Jun;62(12):1322-32.
42. **Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC.** Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science.* 2007 Jan 5;315(5808):107-11.
43. **Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K.** Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003 Feb 10;163(3):286-92.
44. **Fasano A, Catassi C.** Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Jun;19(3):467-78.
45. **Feighery C.** Fortnightly review: coeliac disease. *BMJ.* 1999 Jul 24;319(7204):236-9.
46. **Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S.** Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut.* 1993 Feb;34(2):150-1.

47. **Fraser JS, Engel W, Ellis HJ, Moodie SJ, Pollock EL, Wieser H, Ciclitira PJ.** Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut*. 2003 Dec;52(12):1698-702.
48. **Frazer AC, Fletcher RF, Ross CA, Shaw B, Sammons HG, Schneider R.** Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. *Lancet*. 1959 Sep 5;2(7097):252-5.
49. **Furrie E, Turner MW, Strobel S.** Failure of SCID mice to generate an oral tolerogen after a feed of ovalbumin: a role for a functioning gut-associated lymphoid system. *Immunology*. 1994 Dec;83(4):562-7.
50. **Galliaerde V, Desvignes C, Peyron E, Kaiserlian D.** Oral tolerance to haptens: intestinal epithelial cells from 2,4-dinitrochlorobenzene-fed mice inhibit hapten-specific T cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 1995 May;25(5):1385-90.
51. **Gee SJ.** The coeliac affection. *St Bartholomew's Hosp Rep*. 1888;24:17-20.
52. **Geuze HJ.** The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today*. 1998 Jun;19(6):282-7.
53. **Grant BD, Sato M.** Intracellular trafficking. *WormBook*. 2006:1-9.
54. **Greco L, Corazza G, Babron MC, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, Zavattari P, Bouguerra F, Dib C, Tosi R, Troncone R, Ventura A, Mantavoni W, Magazzu G, Gatti R, Lazzari R, Giunta A, Perri F, Iacono G, Cardi E, de Virgiliis S, Cataldo F, De Angelis G, Musumeci S, Clerget-Darpoux F, et al.** Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet*. 1998 Mar;62(3):669-75.
55. **Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA.** The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002 May;50(5):624-8.
56. **Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG, Goldstein SL, McMahon DJ, Absan H, Neugut AI.** Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *Am J Gastroenterol*. 2001 Jan;96(1):126-31.
57. **Griffiths G, Hoppeler H.** Quantitation in immunocytochemistry: correlation of immunogold labeling to absolute number of membrane antigens. *J Histochem Cytochem*. 1986 Nov;34(11):1389-98.
58. **Griffiths G, McDowall A, Back R, Dubochet J.** On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J Ultrastruct Res*. 1984 Oct;89(1):65-78.

59. **Gromme M, Uytdehaag FG, Janssen H, Calafat J, van Binnendijk RS, Kenter MJ, Tulp A, Verwoerd D, Neeffjes J.** Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 31;96(18):10326-31.
60. **Haboubi NY, Taylor S, Jones S.** Coeliac disease and oats: a systematic review. *Postgrad Med J.* 2006 Oct;82(972):672-8.
61. **Halstensen TS, Scott H, Fausa O, Brandtzaeg P.** Gluten stimulation of coeliac mucosa in vitro induces activation (CD25) of lamina propria CD4+ T cells and macrophages but no crypt-cell hyperplasia. *Scand J Immunol.* 1993 Dec;38(6):581-90.
62. **Halttunen T, Maki M.** Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology.* 1999 Mar;116(3):566-72.
63. **Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, Hahn-Zoric M, Silfverdal SA, Strandvik B, Telemo E.** Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr Int.* 2002 Aug;44(4):347-52.
64. **Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C.** Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Oct;283(4):G996-G1003.
65. **Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS, Framson PE, Nepom GT.** Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest.* 1998 Aug 15;102(4):792-803.
66. **Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J, Blum JS, Nepom GT.** Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):204-15.
67. **Hershberg RM, Mayer LF.** Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today.* 2000 Mar;21(3):123-8.
68. **Holmes GK.** Coeliac disease and malignancy. *Dig Liver Dis.* 2002 Mar;34(3):229-37.
69. **Holtmeier W, Caspary WF.** Celiac disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:3.
70. **Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S.** A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity.* 2004 Sep;21(3):367-77.

71. **Hundorfean G, Zimmer KP, Strobel S, Gebert A, Ludwig D, Buning J.** Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Oct;293(4):G798-808.
72. **Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA.** Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr.* 2002 May;75(5):914-21.
73. **Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, Mougnot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P, Colombel JF, Matuchansky C, Cugnenc H, Lopez-Botet M, Vivier E, Moretta A, Roberts AI, Ebert EC, Guy-Grand D, Brousse N, Schmitz J, Cerf-Bensussan N.** Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology.* 2000 May;118(5):867-79.
74. **Jabri B, Sollid LM.** Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Dec;9(12):858-70.
75. **Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Kemppainen TA, Kosma VM, Jarvinen RM, Uusitupa MI, Julkunen RJ.** A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med.* 1995 Oct 19;333(16):1033-7.
76. **Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S.** The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* 2010 Jan;25(1):99-112.
77. **Kagnoff MF.** Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology.* 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S10-8.
78. **Kahlenberg F, Sanchez D, Lachmann I, Ludmilla T, Tlaskalova-Hogenova H, Mendez E, Mothes T.** Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research and Technology.* 2006;222:78-82.
79. **Kersting S, Bruewer M, Schuermann G, Klotz A, Utech M, Hansmerten M, Krieglstein CF, Senninger N, Schulzke JD, Naim HY, Zimmer KP.** Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases. *Am J Pathol.* 2004 Aug;165(2):425-37.
80. **Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A.** Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* 2008 Jul;135(1):194-204 e3.

81. **Landsverk OJ, Bakke O, Gregers TF.** MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand J Immunol.* 2009 Sep;70(3):184-93.
82. **Litman GW, Rast JP, Shablott MJ, Haire RN, Hulst M, Roess W, Litman RT, Hinds-Frey KR, Zilch A, Amemiya CT.** Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol Biol Evol.* 1993 Jan;10(1):60-72.
83. **Losowsky MS.** A history of coeliac disease. *Dig Dis.* 2008;26(2):112-20.
84. **Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quaratino S, Maiuri L.** Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and Tissue Transglutaminase mediated PPAR{gamma} downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut.* 2009 Dec 1.
85. **Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, Skar V, Mendez E, Lovik A, Kett K.** Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut.* 2003 Nov;52(11):1649-52.
86. **Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM.** Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med.* 1993 Jul 1;178(1):187-96.
87. **MacGregor AJ, Snieder H, Schork NJ, Spector TD.** Twins. Novel uses to study complex traits and genetic diseases. *Trends Genet.* 2000 Mar;16(3):131-4.
88. **Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, Londei M.** Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003 Jul 5;362(9377):30-7.
89. **Maki M.** The humoral immune system in coeliac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1995 Jun;9(2):231-49.
90. **Maki M, Collin P.** Coeliac disease. *Lancet.* 1997 Jun 14;349(9067):1755-9.
91. **Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Hopfl P, Knip M.** Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med.* 2003 Jun 19;348(25):2517-24.
92. **Marsh MN, Crowe PT.** Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1995 Jun;9(2):273-93.
93. **Martin S.** Against the grain: an overview of celiac disease. *J Am Acad Nurse Pract.* 2008 May;20(5):243-50.

94. **Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Heyman M.** Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003 Sep;125(3):696-707.
95. **Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Menard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G, Bouhnik Y, Lamarque D, Chaussade S, Malamut G, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Monteiro RC, Heyman M.** Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):143-54.
96. **Mayrhofer G.** Absorption and presentation of antigens by epithelial cells of the small intestine: hypotheses and predictions relating to the pathogenesis of coeliac disease. *Immunol Cell Biol*. 1995 Oct;73(5):433-9.
97. **Mayrhofer G, Spargo LD.** Subcellular distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the human and rat small intestine. *Immunol Cell Biol*. 1989 Aug;67 (Pt 4):251-60.
98. **Mayrhofer G, Spargo LD.** Distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the rat jejunum and their association with organelles of the endocytic pathway. *Immunology*. 1990 May;70(1):11-9.
99. **Mearin ML, Biemond I, Pena AS, Polanco I, Vazquez C, Schreuder GT, de Vries RR, van Rood JJ.** HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. *Gut*. 1983 Jun;24(6):532-7.
100. **Mellman I.** Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:575-625.
101. **Mellman I, Plutner H.** Internalization and degradation of macrophage Fc receptors bound to polyvalent immune complexes. *J Cell Biol*. 1984 Apr;98(4):1170-7.
102. **Mellman I, Plutner H, Ukkonen P.** Internalization and rapid recycling of macrophage Fc receptors tagged with monovalent antireceptor antibody: possible role of a prelysosomal compartment. *J Cell Biol*. 1984 Apr;98(4):1163-9.
103. **Meresse B, Ripoche J, Heyman M, Cerf-Bensussan N.** Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol*. 2009 Jan;2(1):8-23.
104. **Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L, Koning F.** Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 2008 Jan;57(1):25-32.

105. **Molberg O, McAdam S, Lundin KE, Kristiansen C, Arentz-Hansen H, Kett K, Sollid LM.** T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol.* 2001 May;31(5):1317-23.
106. **Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjostrom H, Sollid LM.** Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.* 1998 Jun;4(6):713-7.
107. **Molberg O, Solheim Flaete N, Jensen T, Lundin KE, Arentz-Hansen H, Anderson OD, Kjersti Uhlen A, Sollid LM.** Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology.* 2003 Aug;125(2):337-44.
108. **Monsuur AJ, Wijmenga C.** Understanding the molecular basis of celiac disease: what genetic studies reveal. *Ann Med.* 2006;38(8):578-91.
109. **Mowat AM, Parker LA, Beacock-Sharp H, Millington OR, Chirido F.** Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1029:1-8.
110. **Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR.** Endocytosis. *Physiol Rev.* 1997 Jul;77(3):759-803.
111. **Myrsky E, Kaukinen K, Syrjanen M, Korponay-Szabo IR, Maki M, Lindfors K.** Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol.* 2008 Apr;152(1):111-9.
112. **Ng KY, Borchardt RT.** Biotin transport in a human intestinal epithelial cell line (Caco-2). *Life Sci.* 1993;53(14):1121-7.
113. **Okamoto CT.** Endocytosis and transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Feb 2;29(3):215-28.
114. **Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Mendez E, Mothes T.** A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001 Oct;13(10):1189-93.
115. **Ozkan T, Ozeke T, Meral A.** Gliadin-specific IgA antibodies in breast milk. *J Int Med Res.* 2000 Sep-Oct;28(5):234-40.
116. **Paparo F, Petrone E, Tosco A, Maglio M, Borrelli M, Salvati VM, Miele E, Greco L, Auricchio S, Troncione R.** Clinical, HLA, and small bowel immunohistochemical features of children with positive serum

- antiendomysium antibodies and architecturally normal small intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol.* 2005 Oct;100(10):2294-8.
117. **Pappenheimer JR, Reiss KZ.** Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol.* 1987;100(2):123-36.
118. **Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB.** The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Sep 1;26(5):757-66.
119. **Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ.** Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature.* 1991 Feb 21;349(6311):669-76.
120. **Polanco I.** Celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Aug;47 Suppl 1:S3-6.
121. **Prioult G, Fliss I, Pecquet S.** Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep;10(5):787-92.
122. **Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):361-7.
123. **Rowell JF, Ruff AL, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll K, Lin X, Tang J, August JT, Siliciano RF.** Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol.* 1995 Aug 15;155(4):1818-28.
124. **Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, Brantner TL, Kim WR, Phelps TK, Lahr BD, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd, Murray JA.** Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology.* 2009 Jul;137(1):88-93.
125. **Rumbo M, Chirido FG, Anon MC, Fossati CA.** Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clin Exp Immunol.* 1998 Jun;112(3):453-8.
126. **Russell MR, Nickerson DP, Odorizzi G.** Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Aug;18(4):422-8.

127. **Sadowski L, Pilecka I, Miaczynska M.** Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp Cell Res.* 2009 May 15;315(9):1601-9.
128. **Sanchez D, Tuckova L, Burkhard M, Plicka J, Mothes T, Hoffmanova I, Tlaskalova-Hogenova H.** Specificity analysis of anti-gliadin mouse monoclonal antibodies used for detection of gliadin in food for gluten-free diet. *J Agric Food Chem.* 2007 Apr 4;55(7):2627-32.
129. **Schnorrer P, Behrens GM, Wilson NS, Pooley JL, Smith CM, El-Sukkari D, Davey G, Kupresanin F, Li M, Maraskovsky E, Belz GT, Carbone FR, Shortman K, Heath WR, Villadangos JA.** The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 11;103(28):10729-34.
130. **Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C.** Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.
131. **Shiina T, Inoko H, Kulski JK.** An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens.* 2004 Dec;64(6):631-49.
132. **Sjostrom H, Lundin KE, Molberg O, Korner R, McAdam SN, Anthonsen D, Quarsten H, Noren O, Roepstorff P, Thorsby E, Sollid LM.** Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol.* 1998 Aug;48(2):111-5.
133. **Skovbjerg H, Koch C, Anthonsen D, Sjostrom H.** Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 5;1690(3):220-30.
134. **Sollid LM.** Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:53-81.
135. **Sollid LM.** Breast milk against coeliac disease. *Gut.* 2002 Dec;51(6):767-8.
136. **Sollid LM.** Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2002 Sep;2(9):647-55.
137. **Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, Taki I, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M.** Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol.* 2006 Oct;101(10):2333-40.
138. **Stepniak D, Koning F.** Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol.* 2006 Jun;67(6):460-8.

139. **Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F.** Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Oct;291(4):G621-9.
140. **Strobel S, Mowat AM.** Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today.* 1998 Apr;19(4):173-81.
141. **Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Lundin KE, Gjertsen HA, Kontakou M, Ciclitira PJ.** Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet.* 1994 Mar 26;343(8900):758-61.
142. **Sun JB, Xiao BG, Lindblad M, Li BL, Link H, Czerkinsky C, Holmgren J.** Oral administration of cholera toxin B subunit conjugated to myelin basic protein protects against experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing transforming growth factor-beta-secreting cells and suppressing chemokine expression. *Int Immunol.* 2000 Oct;12(10):1449-57.
143. **Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ.** The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Apr;7(4):204-13.
144. **Telega GW, Baumgart DC, Carding SR.** Uptake and presentation of antigen to T cells by primary colonic epithelial cells in normal and diseased states. *Gastroenterology.* 2000 Dec;119(6):1548-59.
145. **Tokuyasu KT.** A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol.* 1973 May;57(2):551-65.
146. **Tokuyasu KT.** A study of positive staining of ultrathin frozen sections. *J Ultrastruct Res.* 1978 Jun;63(3):287-307.
147. **Tosco A, Maglio M, Paparo F, Rapacciuolo L, Sannino A, Miele E, Barone MV, Auricchio R, Troncone R.** Immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Sep;47(3):293-8.
148. **Tosi R, Vismara D, Tanigaki N, Ferrara GB, Cicimarra F, Buffolano W, Follo D, Auricchio S.** Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1983 Sep;28(3):395-404.
149. **Troncone R, Ivarsson A, Szajewska H, Mearin ML.** Review article: future research on coeliac disease - a position report from the European multistakeholder platform on coeliac disease (CDEUSSA). *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Jun 1;27(11):1030-43.

150. **Underdown BJ, Schiff JM.** Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:389-417.
151. **van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F.** Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol.* 1998 Aug 15;161(4):1585-8.
152. **van de Wal Y, Kooy YM, van Veelen P, Vader W, August SA, Drijfhout JW, Pena SA, Koning F.** Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol.* 1999 Oct;29(10):3133-9.
153. **Watts C.** The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol.* 2004 Jul;5(7):685-92.
154. **Weiner HL.** Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1997 Jul;18(7):335-43.
155. **Wieser H.** Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007 Apr;24(2):115-9.
156. **Wieser H.** The Biochemical Basis of Celiac Disease. *Cereal Chemistry.* 2008;85(1):1-13.
157. **Woof JM, Burton DR.** Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol.* 2004 Feb;4(2):89-99.
158. **Yellepeddi VK, Kumar A, Palakurthi S.** Biotinylated poly(amido)amine (PAMAM) dendrimers as carriers for drug delivery to ovarian cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 2009 Aug;29(8):2933-43.
159. **Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, Beri R, Dolcino M, Valletta E, Corrocher R, Puccetti A.** In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med.* 2006 Sep;3(9):e358.
160. **Zimmer KP, Buning J, Weber P, Kaiserlian D, Strobel S.** Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. *Gastroenterology.* 2000 Jan;118(1):128-37.
161. **Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, Buning J, Lerch MM, Ciclitira PC, Weber P, Naim HY.** Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut.* 2010 Mar;59(3):300-10.
162. **Zimmer KP, Naim H, Weber P, Ellis HJ, Ciclitira PJ.** Targeting of gliadin peptides, CD8, alpha/beta-TCR, and gamma/delta-TCR to Golgi complexes

and vacuoles within celiac disease enterocytes. *FASEB J.* 1998 Oct;12(13):1349-57.

163. **Zimmer KP, Poremba C, Weber P, Ciclitira PJ, Harms E.** Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes. *Gut.* 1995 May;36(5):703-9.

7.2 Andere Printmedien

1. **Nava, Segev.** Trafficking Inside Cells: Pathway, Mechanisms and Regulation. 2010, Springer, First Edition
2. **Melcher CA, Schmitz M, Hildebrand R, Zimmer KP.** Targeting of Gliadin Peptide Alpha 31-49 to late Endosomes of Enterocytes of infantile Mice by conjugation to Cholera toxin subunit (CTB), *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, Volume 50, Supplement 2, E26, PD-G-082

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Der Zöliakie-Eisberg und das Spektrum der Gluten-Sensitivität	3
Abbildung 1.2 Die Taxonomie diverser Getreidesorten	7
Abbildung 1.3 HLA-DQ2 Zusammensetzung bei der Zöliakie	10
Abbildung 1.4 Das aktuelle Pathogenesemodell der Zöliakie	12
Abbildung 1.5 Der typische Dünndarmmukosaschaden der Zöliakie	14
Abbildung 1.6 Schema der intrazellulären Transportvorgänge von Makromolekülen.....	19
Abbildung 1.7 Der Weg von MHC-Klasse-II.....	23
Abbildung 1.8 IgA-Weg in der Dünndarmmukosa.....	25
Abbildung 1.9 Die Reaktionen der Gewebstransglutaminase II.....	26
Abbildung 1.10 Schematisches Modell der Hypothese	29
Abbildung 2.1 Mäanderförmige Präparateführung zum Quantifizieren	42
Abbildung 3.1 Foto der Slots (p- α -Gliadin-AK mit verschiedenen Antigenen)	51
Abbildung 3.2 Gliadin in EE neben LE ohne Gliadin (EM).....	53
Abbildung 3.3 Säulendarstellung der medianen Anteile an Gliadin in EE (EM).....	54
Abbildung 3.4 Beispiele von LE mit Gliadin (Kokalisationen) (EM).....	55
Abbildung 3.5 LE ohne Kokalisationen in Kontrollansätzen (EM)	55
Abbildung 3.6 Säulendarstellung der medianen Anteile an Gliadin in LE (EM).....	56
Abbildung 3.7 Kreisdiagrammdarstellung der gesamten intrazellulären Gliadinverteilung (EM).....	57
Abbildung 3.8 Gliadinlabel an der AM und auf dem Golgi-Apparat (EM)	57
Abbildung 3.9 Endozytotische Vesikel (IF)	59
Abbildung 3.10 Blockade der Gliadinaufnahme bei 4°C (IF)	59
Abbildung 3.11 Vergleichende Inkubation von Zellkulturmedium und Kontrollserum (IF)	60
Abbildung 3.12 Gliadinpeptide in EE (IF).....	61
Abbildung 3.13 Gliadinpeptide in EE/Profil & Dot-Blot (IF).....	61
Abbildung 3.14 Säulendiagramm der Kokaliskationskoeffizienten der Peptide und EEA1 (IF)	62
Abbildung 3.15 Gliadinpeptid 31-43 in LE (IF).....	63

Abbildung 3.16 Gliadinpeptid 31-43 in LE/Profil & Dot-Blot (IF)	64
Abbildung 3.17 Darstellung der Kollokalisationskoeffizienten von P31-43 und LAMP-2 (IF)	65
Abbildung 3.18 Gliadinpeptid 57-68 in LE (IF)	66
Abbildung 3.19 Gliadinpeptid 57-68 in LE/Profil & Dot-Blot (IF)	66
Abbildung 3.20 Darstellung der Kollokalisationskoeffizienten von P57-68 und LAMP-2 (IF)	67
Abbildung 4.1 Die verschiedenen Mechanismen der oralen Toleranz	84

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Manifestationen und Symptome der unbehandelten Zöliakie.....	4
Tabelle 1.2 Histologische und klinische Manifestationen der Zöliakie bei Kindern.....	6
Tabelle 1.3 Zöliakie-assoziierte Erkrankungen	6
Tabelle 1.4 Die Stadieneinteilung des Epithelschadens.....	14
Tabelle 2.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	31
Tabelle 2.2 Analysesubstanzen im Slot-Blot-Verfahren.....	34
Tabelle 2.3 Verwendete Antikörper für das Kryo-Immunolabeling.....	40
Tabelle 2.4 Verwendete Antikörperkombinationen für das Kryoimmunolabeling	41
Tabelle 2.5 Peptidstimulation der Caco-2-Zellen	48
Tabelle 2.6 Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenz an Kulturzellen	48
Tabelle 3.1 Mediane der prozentuellen Hintergrundmarkierungen (EM)	52
Tabelle 3.2 Labeldichten der Gliadinantikörper im Vergleich zur Spezifitätsbestimmung	52

8.3 Veröffentlichungen

Identische Exponenten (1-6) kennzeichnen zusammengehörige Veranstaltungen und Textveröffentlichungen.

Originalarbeiten:

Lübbing N, Barone MV, Rudloff S, Troncone R, Auricchio S, Zimmer KP. Correction of gliadin transport within enterocytes through celiac disease serum. *Pediatr Res.* 2011 Oct;70(4):357-62.

Abstracts:

- **Lübbing N, Rudloff S, Panzer I, Barone MV, Troncone R, Auricchio S, Zimmer KP.** Anti-Gliadin Antibodies direct Gliadin transport in Enterocytes towards tolerance induction. *Eur J Pediatr.* 2010 Mar;169(3):386¹
- **Lübbing N, Rudloff S, Panzer I, Barone MV, Troncone R, Auricchio S, Zimmer KP.** Anti-Gliadin Antibodies direct Gliadin transport in Enterocytes towards tolerance induction. *Klin Padiatr.* 2010 Mar;222:102²
- **Lübbing N, Rudloff S, Panzer I, Barone MV, Troncone R, Auricchio S, Zimmer KP.** Anti-Gliadin Antibodies direct Gliadin transport in Enterocytes towards tolerance induction. *Pädiatrie hautnah.* 2010 Apr;22(2):157³
- **Lübbing N, Scholand KA, Rudloff S, Panzer I, Barone MV, Troncone R, Auricchio S, Zimmer KP.** Celiac disease serum directs enzymatic digests of Gliadin as well as Gliadin-Peptide 31-43 into late endosomes of Enterocytes. *JPGN.* 2010 Jun;[Suppl. 2]50:E7⁴
- **Lübbing N, Rudloff S, Panzer I, Barone MV, Troncone R, Auricchio S, Zimmer KP.** Inrazelluläre Transportprozesse von Gliadin in Enterozyten und deren Modulation durch Zöliakieserum. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2010 Sep;[Suppl. 1] 158:41⁵
- **Scholand KA, Lübbing N, Rudloff S, Zimmer KP.** Transport of Gliadin Peptides into Late Endosomes – an Option to Induce Oral Tolerance in Celiac Disease? *Z Gastroenterol.* 2011 Nov;49:S21⁶

Vorträge

- Intrazelluläre Transportprozesse des Gliadins und deren Beeinflussung durch IgA. Postervortrag: Wissenschaftstag der Universitätskliniken Gießen und Marburg, 11. Juli 2009
- Anti-Gliadin Antikörper leiten den Gliadintransport in Enterozyten zur oralen Toleranzinduktion. Kongressvortrag: 46. Arbeitstagung für pädiatrische Forschung, Göttingen, 25.-26. Februar 2010¹
- Anti-Gliadin Antikörper leiten den Gliadintransport in Enterozyten zur oralen Toleranzinduktion. Kongressvortrag: 59. Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Marburg, 19.-21. März 2010²
- Intrazelluläre Transportprozesse von Gliadin und deren Beeinflussung zur Toleranzinduktion. Postervortrag: 25. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (GPGE), Bonn, 12.-14. Mai 2010³
- Celiac disease serum directs enzymatic digests of Gliadin as well as Gliadin-Peptide 31-43 into late endosomes of Enterocytes. Kongressvortrag: 43. Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Istanbul, 9.-25. Juni 2010⁴
- Transport of Gliadin Peptides into Late Endosomes – an Option to Induce Oral Tolerance in Celiac Disease? Vortrag: Nationales Meeting für Mukosafunktion, Lich, 10. Juli 2010⁶
- Intrazelluläre Transportprozesse von Gliadin und deren Beeinflussung zur Toleranzinduktion. Postervortrag: 106. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, Potsdam-Babelsberg, 16.-19. September 2010⁵
- Correction of gliadin transport within enterocytes through celiac disease serum. Postervortrag: 14th International Coeliac Disease Symposium, Oslo, 20.-22. Juni 2011

8.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Unterstützung, die Beratung und das Wissen, welches er mir vermittelt hat.

Für die zahlreichen Ideen, Hilfen und die Bereitschaft zur Diskussion danke ich Prof. Dr. Silvia Rudloff, Dr. Imke Panzer, Kristine-Anna Scholand und insbesondere Dr. Sigrid Disse für die Hilfe bei der Statistik.

Kristine-Anna Scholand danke ich weiterhin auch für ihre Unterstützung beim Korrekturlesen mit kritischen Augen und viel Geduld.

Ohne die tatkräftige und zuverlässige Unterstützung von Bettina Goritzka, Larissa Thiessen, Nadine Metz, Marcel Zoremba, Anna Spengler und Nelli Baal wäre dieses Projekt so nicht realisierbar gewesen.

Für die sehr lehrreiche, interessante und schöne Zeit in Neapel möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere bei Dott. Maria Vittoria Barone, Dott. Merlin Nanayakkara, Prof. Riccardo Troncone und Prof. Salvatore Auricchio bedanken. ‘Mille grazie per tutto!’

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie und meinem nahen Umfeld zu tiefstem Dank verpflichtet, die mich in jeder Lebenslage unterstützen und mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben.