

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik B
- Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke -

**Erhöhte Induzierbarkeit von IFN- γ in peripheren
CD8+ Lymphozyten durch Kokultur mit intestinalen
Epithelzellen bei Patienten mit chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Stefan Lütke Brintrup
aus
Münster in Westfalen

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: PD Dr. T. Kucharzik
2. Berichterstatter: PD Dr. Ch. Krieglstein

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik B
- Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke -
Referent: PD Dr. T. Kucharzik
Koreferent: PD Dr. Ch. Krieglstein

Zusammenfassung

Erhöhte Induzierbarkeit von IFN- γ in peripheren CD8⁺ Lymphozyten durch Kokultur mit intestinalen Epithelzellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Stefan Lütke Brintrup

In dieser Arbeit wurden die zellulären Wechselwirkungen zwischen intestinalen Epithelzellen und PBMCs (engl.: peripheral blood mononuclear cells) von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu denen von gesunden Kontrollen untersucht. Gearbeitet wurde mit einem Kokultur-Modell, in welchem neben einer Monokultur von PBMCs eine Koinkubation von PBMCs mit Zellen der Caco-2-Zelllinie in Multiwell-Kultur-Platten erfolgte. Mit dem Verfahren der Durchflußzytometrie wurde die intrazelluläre Zytokinexpression von IL-4 und IFN- γ in CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten erfasst. In die Arbeit wurden 12 Patienten mit Morbus Crohn, 15 Patienten mit Colitis ulcerosa und 10 gesunde Kontrollen eingeschlossen. Im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen wurde nach 24-stündiger Koinkubation mit Caco-2-Zellen ein signifikanter Anstieg IFN- γ -produzierender CD8⁺ Zellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt. Die beobachteten Wechselwirkungen zwischen PBMCs und intestinalen Epithelzellen scheinen dabei durch MHC-Oberflächenmoleküle der Klasse I vermittelt zu werden. Auf CD4⁺ Lymphozyten hatte der epitheliale Stimulus keinen Effekt. CD8⁺ Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen – auch in inaktiven Krankheitsstadien – zeigten eine erhöhte Induzierbarkeit für IFN- γ nach Kokultur mit intestinalen Epithelzellen.

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Zielsetzung der Arbeit
3. Material und Methoden
 - 3.1 Studienbevölkerung
 - 3.2 Zellkultur von Darmepithel Zell-Linie Caco-2
 - 3.2.1 Beschreibung der Caco-2 Zell-Linie
 - 3.2.2 Kultivieren und Umsetzen von Caco-2-Zellen
 - 3.2.3 Zellzählung mit der Neubauer-Kammer und definiertes Aussäen von Zellen
 - 3.2.4 Präparieren der Caco-2-Zellen für die Kokultur
 - 3.3 Präparation von Lymphozyten
 - 3.3.1 Präparation von PBMCs
 - 3.3.2 Reinigung der PBMCs von Monozyten
 - 3.3.3 Zellzählung nach Lymphozyten-Isolierung
 - 3.4 Kokultivierung von PBMCs und Caco-2 Zellen
 - 3.4.1 Anlegen der 4 Kultur-Ansätze
 - 3.4.2 Zellaufnahme, -stimulation und -fixierung aus den 4 Kultur-Ansätzen
 - 3.4.3 Ausschluss der IL-12 abhängigen Aktivierung durch Monozyten
 - 3.4.4 Untersuchung auf MHC I -abhängige Oberflächenaktivierung
 - 3.5 Flowzytometrische Bestimmung der Parameter CD4, CD8, IFN- γ , sowie IL-4
 - 3.5.1 Prinzip der Flowzytometrie
 - 3.5.2 Aufbau eines Durchflußzytometers
 - 3.5.3 Zellpräparation für die FACS-Analyse, Durchführung der FACS-Analyse
 - 3.5.4 Darstellung der Ergebnisse
 - 3.6 Statistische Methoden
 - 3.7 RT-PCR
 - 3.7.1 Prinzip der RT-PCR
 - 3.7.2 RNA-Isolierung
 - 3.7.3 cDNA-Synthese
 - 3.7.4 cDNA-Amplifizierung
 - 3.7.5 Agarose Gel-Elektrophorese

4. Ergebnisse
 - 4.1 Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IFN- γ - und IL-4-Expression in CD8⁺ und CD4⁺ Lymphozyten Populationen
 - 4.2 Zytotoxische T-Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen im Gegensatz zu denen gesunder Kontrollen eine starke Induzierbarkeit für IFN- γ nach Kokultur mit intestinalen Epithelzellen
 - 4.3 Die durch den epithelialen Stimulus vermittelte IFN- γ Induktion in peripheren zytotoxischen Lymphozyten verläuft unabhängig von Monozyten
 - 4.4 Die Blockierung MHC I-Molekül gebundener Transduktionsvorgänge durch anti-MHC I-Antikörper vermindert die IFN- γ Induzierbarkeit durch intestinale Epithelzellen.
 - 4.5 Transkriptionelle Aktivierung von IFN- γ in der Epithelzell/ Lymphozytenkultur
5. Diskussion
6. Zusammenfassung
7. Literaturverzeichnis

Lebenslauf

1. Einleitung

Der Oberbegriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (CED) umfasst die beiden Entitäten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Sie sind gekennzeichnet durch eine dauerhafte, sich selbst unterhaltende Entzündungsreaktion unbekannter Ursache, die, in der Regel schubweise auftretend, dauerhaft zu narbigen Destruktionen der Darmwand und zu einer erhöhten Inzidenz von Darmneoplasien führt. Des Weiteren ist bekannt, dass eine Vielzahl von extraintestinalen Krankheitsmanifestationen an den Organen Haut (z.B. Pyoderma gangraenosum, Erythema nodosum), Augen (Uveitis, Episkleritis), Gelenken (Arthritis, ankylosierende Spondylitis), Leber (z.B. primär sclerosierende Cholangitis) und Urogenitaltrakt (entzündliche Stenosen) mit dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert ist. Hinzu kommen Sekundärfolgen der Patienten, die mit dem Auftreten von Komplikationen wie Absorptionsstörungen, Darmfisteln, -stenosen, anorektalen Fisteln, Cholesterin-Gallensteinen und Oxalat-Nierensteinen vergesellschaftet sind. Einen Anspruch auf Vollständigkeit nicht erhebend soll an dieser Stelle lediglich auf die Vielgestaltigkeit der beiden Erkrankungen hingewiesen werden, die die Vermutung plausibel erscheinen lässt, es handele sich hierbei nicht nur um ein lokales Entzündungsgeschehen, sondern vielmehr um ein systemisches immunpathologisches Phänomen. Die Erstmanifestation beider Erkrankungen kann grundsätzlich in jedem Alter auftreten, am häufigsten ist sie jedoch zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Der Morbus Crohn ist dabei durch ein segmentales, diskontinuierliches Befallsmuster unter Einbeziehung der gesamten Darmwand gekennzeichnet. Er kann sich im gesamten Gastrointestinaltrakt manifestieren, wobei bevorzugt das terminale Ileum betroffen ist, eine Tatsache, die 1932 Crohn, Ginsberg und Oppenheimer veranlasste, die Erkrankung als Ileitis terminalis zu beschreiben. Histologisch finden sich hier massive Infiltrate mononukleärer Zellen in allen Schichten der Darmwand mit Auftreten von epitheloidzelligen Granulomen und mehrkernigen Riesenzellen sowie eine Hyperplasie angrenzender lymphatischer Strukturen. Typisch sind ferner auch gastrale Metaplasien im Dünndarm. Makroskopisch werden die Befunde als

aphtöse Schleimhautläsionen mit Strikturen und Stenosen des Darmrohres und als sogenanntes „Kopfsteinpflasterrelief“ (hervorgerufen durch fissurale Ulzerationen im Wechsel mit Vorwölbungen entzündeter Schleimhautareale) beschrieben. Im Gegensatz dazu befällt die Colitis ulcerosa ausschließlich das Kolon, und zwar unter kontinuierlicher Ausbreitung der Entzündung vom Anorektum aus nach proximal. Wilks und Moxon beschrieben 1875 erstmals die Colitis ulcerosa als ein eigenständiges Krankheitsbild, welches vorwiegend die Mukosa und Submukosa betraf. Auch das terminale Ileum kann, als sogenannte Back-wash-Ileitis, mit betroffen sein. Histologische Hauptmerkmale sind Kryptenabszesse und Epitheldysplasien sowie ein progredienter Verlust an Becherzellen. Eine Infiltration der Darmwand mit mononukleären Zellen bleibt bei der Colitis ulcerosa weitestgehend auf Mukosa und Submukosa beschränkt. Makroskopisch imponiert eine hyperämische, ödematöse Schleimhaut von gelockerter Struktur, die leicht zu Kontaktblutungen neigt. Es finden sich Erosionen und Ulzerationen der Schleimhaut die im Verlauf der Erkrankung zu einem Verlust des Schleimhautreliefs führen. Das Nebeneinander von Schleimhautulzerationen und stehen gebliebenen, ödematös geschwollenen Schleimhautinseln führt zum Bild der sogenannten Pseudopolypen. Der narbige Umbau des entzündeten Gewebes verursacht auf Dauer eine Zerstörung der Kryptenarchitektur und eine Verkürzung des Darmrohres mit Verlust der natürlichen Haustrierung.

Im Fokus wissenschaftlichen Interesses stehen derzeit vor allem genetische und immunologische Mechanismen sowie die Bedeutung von Umwelteinflüssen bei der Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dabei könnten eine Entzündung initiierende Faktoren bei Patienten mit gestörter Immunregulation die Voraussetzung für eine chronifizierende Entzündungsreaktion sein. Als solche initiierenden Faktoren werden so z.B. eine Infektion mit pathogenen Keimen (in Betracht gezogen werden *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, das Masernvirus sowie abnorme *E.coli*-Stämme), eine defekte Schrankenfunktion der Darmwand oder eine pathologische Immunantwort gegenüber der kommensalen Darmflora vermutet.

Hinweise für die Bedeutung von Umweltfaktoren lieferten epidemiologische Daten, die eine ansteigende Inzidenz dieser Erkrankungen im Zuge der zunehmenden Industrialisierung beschrieben (23). Auch konnte beobachtet werden, dass das Risiko, innerhalb einer Population an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa zu erkranken, sich mit dem Umzug in eine neue Umgebung ändert (86). Mehrfach beschrieben sind ebenso die Einflüsse des Rauchens und der Ernährung als Risikofaktoren für das Auftreten von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Die Rolle der genetischen Prädisposition unterstreichen Zwillingsuntersuchungen und Studien, die eine gehäufte Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen innerhalb von Familien aufzeigen (63, 101). Eine Anzahl von Arbeiten beschäftigte sich mit der Assoziation genetischer Marker mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. So konnten bisher teils negative, teils positive Korrelationen von HLA-Antigenen und Allelen von IL-1 receptor antagonist, TNF- α , ICAM-1 und Komplementfaktoren mit den beiden Krankheitsentitäten festgestellt werden. Bemühungen, für die Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Erkrankungen direkt oder indirekt verantwortliche Genloci zu identifizieren, blieben lange ohne nennenswerten Erfolg (2). Mit der Entdeckung des NOD2-Gens wurde erstmalig ein Genlocus identifiziert, dessen Mutation offenbar direkt mit der Entstehung eines Morbus Crohn-artigen Krankheitsbildes zusammenhängt (33). Das Produkt dieses Gens scheint dabei durch Vermittlung von Signalen bakterieller Produkte an die Wirtszelle die natürliche Immunantwort auf Bakterien zu verändern. Die NOD2-Mutation korreliert offensichtlich mit einem strikturierenden Phänotyp mit Befall des Dünndarms (1, 20, 47).

Neben epidemiologischen Befunden und den Ergebnissen genetischer Assoziationsstudien bestehen Hinweise auf eine gestörte Immunregulation bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Zum einen entdeckte man, dass in der Mukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Entzündung eine deutliche Zunahme von Plasmazellen vorlag. Insbesondere dominierte hierbei der Typ der Immunglobulin G produzierenden Zellen. Bei der Colitis ulcerosa herrschte dabei eine Zunahme der Immunglobulin-Klasse IgG1, bei dem Morbus

Crohn eine Zunahme der Immunglobulin-Klasse IgG2 vor. Andererseits konnte eine, durch die defizitäre Expression der J-Kette bedingte, verringerte Produktion von IgA, dem Hauptimmunglobulin der externen Sekretion, festgestellt werden. In aktiv entzündeten Herden lag dabei ein Überwiegen des IgA1-Subtyps vor. Die Bedeutung dieses Immunglobulin-Klassen-Shifts wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass IgG im Gegensatz zu IgA in der Lage ist, Komplement zu aktivieren, NK-Zellen zu besetzen und Phagozyten zu aktivieren. Ein weiteres immunologisches Phänomen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegt in dem Vorliegen spezifischer (Auto)-Antikörper, über deren Krankheits-auslösende Bedeutung allerdings gestritten wird, zumal eine positive Korrelation der entsprechenden Antikörper-Titer mit der Krankheits-Aktivität häufig fehlt. Die am häufigsten beschriebene Autoantikörper-Klasse bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist sicherlich die der anti-neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper (ANCA's), vor allem mit perinukleärem Verteilungsmuster (pANCA's). Die Prävalenz dieser Autoantikörper liegt bei der Colitis ulcerosa bei ca. 80 % und ist sogar noch höher bei Patienten mit einer primär sclerosierenden Cholangitis. Dabei scheinen Patienten mit nachweisbarem pANCA-Titer besonders schwere Verlaufsformen zu entwickeln. Eine Krankheits-Spezifität liegt bei den pANCA's allerdings ebenso wenig vor wie bei den ebenfalls bei der Colitis ulcerosa beschriebenen Autoantikörpern gegen das Kolonepithel-Protein gp 185 oder bestimmten Tropomyosin-Isoformen. Auch wurde über Fälle von antierythrozytären Autoantikörpern sowohl bei Morbus Crohn- als auch bei Colitis ulcerosa-Patienten berichtet. Spezifische Antikörperbildung wurde dagegen bei Morbus Crohn mit den Antikörpern gegen *Saccharomyces cerevisiae* und Antikörpern gegen Pankreassekret beschrieben (90). Ist eine direkt aggressive Wirkung der Antikörper auch nicht immer nachweisbar, so ist mit ihrem Auftreten doch eine Aktivierung des Komplementsystems verbunden. Ahrenstedt et al. konnten eine gesteigerte Produktion von Komplementfaktoren im Dünndarm von Morbus Crohn-Patienten feststellen. Zur Pathologie des humoralen Immunsystems treten offensichtlich auch pathologische Phänomene bezüglich der zellulären Immunität. Kontrovers diskutiert wird, ob Unterschiede im Verhältnis von CD4+

zu CD8+ Lymphozyten im peripheren Blut zwischen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und gesunden Kontrollen existieren. Hierbei widersprechen sich Arbeiten, die einen verminderten Anteil an CD4+ Zellen postulieren und Arbeiten, die keinen Unterschied im Verteilungsmuster unterschiedlicher Lymphozyten-Populationen feststellen konnten. Andererseits gilt als gesichert, dass eine Aktivierung der Lymphozyten des peripheren Blutes von Morbus Crohn-Patienten proportional zur Krankheitsaktivität vorliegt, wie an dem Anteil der T9-Antigen tragenden Lymphozyten und anderer früher Aktivierungs-Parameter ersichtlich (64, 77). Eine Anzahl von Studien dokumentiert ferner eine von der Norm abweichende Zusammensetzung der T-Lymphozyten im GALT (gut-associated lymphoid tissue), welches sich aus Peyer-Plaques, intraepithelialen Lymphozyten (IELs) und den diffus verteilten, primären Immunzellen der Lamina propria (Lamina-propria-Lymphozyten; LPLs) zusammensetzt (24). Zum einen weisen diese Zellen, ebenso wie die Lymphozyten aus dem peripheren Blut, erhöhte Aktivierungs-Parameter auf, zum anderen zeigen sie ein verändertes Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen und ein verändertes Rekrutierungsverhalten CD 8-assoziiierter T-Zell-Rezeptoren. Einer Arbeit von James et al. zufolge unterscheiden sich die Populationen der Lymphozyten in der Lamina propria von denen des peripheren Blutes durch einen erhöhten Anteil von CD4+ Leu-8- Lymphozyten unter den LPLs. Dieser Zelltyp zeichnet sich verantwortlich für eine Aktivierung von B-Lymphozyten (35). Ein weiterer zellgebundener Krankheits-auslösender Mechanismus besteht möglicherweise in der Aktivität zytotoxischer T-Zellen und natürlicher Killer (NK-) Zellen. Dabei existieren auf der einen Seite Arbeiten, die eine Konditionierung peripherer mononukleärer Zellen auf Kolon-Epithelzellen - sei es spontan, sei es durch Aktivierung mittels aus den Seren von Patienten gewonnener Lipopolysaccharide oder IgM-Fraktionen - beschreiben. Auf der anderen Seite wird über eine verminderte Aktivität von NK-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen berichtet. Auch die Zellen der unspezifischen Immunität, namentlich Makrophagen und neutrophile Granulozyten, weisen ein verändertes Verhalten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf. Sowohl Morbus Crohn- als auch Colitis ulcerosa-

Patienten weisen eine leichtgradige Monozytose auf. Diese Ergebnisse gehen mit der Beobachtung gehäuftem Auftreten frisch rekrutierter Monozyten in geschädigter Mukosa einher. Ebenso zeigten szintigraphische Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit radioaktiv markierten Monozyten und neutrophilen Granulozyten ein gesteigertes Migrationsverhalten dieser Zellen in die Darmwand. Dieses Phänomen könnte durch eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) auf Endothelzellen in der Darmmukosa und dessen korrespondierenden Rezeptor CD11a auf Monozyten, wie in einer Studie von Malizia et al. beschrieben, begründet sein. Diesen Beobachtungen stehen Arbeiten gegenüber, die über ein vermindertes Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten in der Haut von Patienten mit Morbus Crohn und über eine Malfunktion derselben bezüglich ihres Sauerstoff-Metabolismus und ihrer Konzentration an Superoxid-Dismutase berichten (einen Überblick über die Forschungsergebnisse der letzten Jahre vermitteln 12, 25, 85, 88).

Ein zunehmendes Augenmerk in der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gilt derzeit der Bedeutung der Zytokine. Insbesondere scheint eine Dysregulation in der Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zellen und den von ihnen produzierten löslichen Mediatoren ein wichtiges Element in der multifaktoriellen Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen darzustellen. Dabei entstand in den vergangenen Jahren das Konzept von Polaritäten einer Immunantwort, die sich durch das Vorliegen zweier Phänotypen von CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Tc-Zellen) unterscheiden. Demzufolge produzieren Th1/Tc1-Zellen proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon gamma (IFN- γ) und Tumor Necrosis Factor β (TNF- β), die Makrophagen und andere Antigen-präsentierende Zellen aktivieren und eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ initiieren. Im Gegensatz dazu produzieren Th2/Tc2-Zellen antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die für eine humorale Antikörper-Antwort, insbesondere durch IgE, verantwortlich sind und eine Aktivierung von Makrophagen inhibieren (80, 81).

Trotz widersprüchlicher Aussagen von Studien im Bezug auf die Expression dieser immunregulatorischen Zytokine in der entzündeten intestinalen Mukosa, scheint die Immunantwort bei Morbus Crohn von einer Th1-, und bei Colitis Ulcerosa von einer Th2-Reaktion geprägt zu sein. So finden sich im Falle des Morbus Crohn erhöhte Zytokin-Level von IFN- γ , IL-2, TNF- α und IL-12 und im Falle der Colitis Ulcerosa eine gesteigerte Sekretion von IL-4, IL-5, und IL-10 (68, 72, 84). Ferner deuten experimentelle Daten aus Maus-Modellen darauf hin, dass eine einzige Abweichung vom Gleichgewicht der pro- und antiinflammatorischen Zytokine zu erheblichen Veränderungen in der Immunantwort und somit zu entzündlichen Reaktionen führen kann (30, 34).

Eine Schlüsselrolle in der Unterscheidung zwischen Th/Tc1 und Th/Tc2 –Zellen kommt dabei der Produktion von den sich in reziproker Weise beeinflussenden Zytokinen IFN- γ und IL-4 zu, die sich in der Wirkung dieser beiden Zytokine widerspiegelt.

So steigert IFN- γ die Expression von Major Histocompatibility Complex - Molekülen der Klasse II (MHC II) auf Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritischen, endothelialen, mesenchymalen und epithelialen Zellen, was zu einer erhöhten Antigen-Präsentation durch eben diese führt (84). Auch an der monozytären Differenzierung promyelotischer Zellen scheint IFN- γ synergistisch mit anderen Faktoren beteiligt zu sein (21). Insbesondere scheint ein Effekt von IFN- γ auf intestinale Epithelzellen vorzuliegen; unter Einwirkung von IFN- γ kommt es zu einer vermehrten Expression von Rezeptoren für proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α (26 und 67), als auch zu einer gestörten epithelialen Transportfunktion. Zusammen mit TNF- α scheint IFN- γ sogar direkt eine zytotoxische Wirkung auf Epithelzellen auszuüben, welches sich u.a. durch eine gesteigerte Permeabilität der tight junctions des Epithelverbandes äußert (22, 26, 51, 54). Dies wäre beispielsweise durch eine Erhöhung der Sensibilität der Epithelzellen auf Apoptose induzierende Faktoren durch eine IFN- γ vermittelte Expressionssteigerung der proapoptotischen Protease Caspase-1 erklärbar, wie es O'Connell et al. zeigen konnten (61). Neueren Studienergebnissen zufolge sind möglicherweise reziproke Wirkungen

von IFN- γ und Transforming Growth Factor beta (TGF- β) für das Auftreten von Entzündungsreaktionen in der intestinalen Mukosa verantwortlich (93).

Als klassischer Vertreter der antiinflammatorischen Zytokine moduliert IL-4 das Wachstum und die Differenzierung einer Reihe von Zelltypen; so ist IL-4 im Sinne eines autokrinen Wachstumsfaktors in der Lage, die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten in die Richtung von IL-4 produzierenden Th2-Zellen zu beeinflussen (34, 59, 95), wohingegen Lymphozyten vom Th1-Phänotyp in Gegenwart von IL-4 in ihrer Proliferation gehemmt werden (69). Bei therapeutischer Anwendung im Maus-Modell senkt IL-4 die Konzentration von IFN- γ in Serum und Kolongewebe und die Aktivität der Myeloperoxidase sowie der induzierbaren Nitrit-Oxid Synthase II (NOS II) im distalen Kolon. Diese Enzymhemmung vermindert das Ausmaß von Gewebedestruktionen durch schädigende Agenzien wie freien Sauerstoffradikalen und Nitrit-Oxid (29). Ein negativer Effekt auf die IL-2 und IFN- γ -Produktion konnte auch in *in-vitro* Versuchen mit stimulierten T-Lymphozyten beobachtet werden (97). In peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) vermag IL-4 die gesteigerte Produktion von vascular endothelial growth factor (VEGF) bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu unterdrücken (28). Als potenter Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten wurde IL-4 zunächst als B-cell stimulating factor 1 (BSF-1) identifiziert (60), der sich an selbigen insbesondere für die IgE - und IgG1 - Produktion durch ein Switching der Immunglobulinklassen als auch für eine Induktion von MHC II-Molekülen verantwortlich zeigt. Ebenso nimmt IL-4 auch Einfluss auf Stromazellen und hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks (69). IL-4 inhibiert dosisabhängig die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α , steigert das Verhältnis von IL-1 Rezeptor Antagonist zu IL-1 β (IL-1ra/IL-1 β) und induziert die Expression des Mannose-Rezeptors auf Makrophagen - ein Molekül das für die Makrophagen-gebundene Immunabwehr von Bedeutung ist - wenngleich auch diese Wirkungen im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermindert erscheinen (45, 87). Bei intestinalen Epithelzellen reduziert das Hinzufügen von IL-4 die Produktion von monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1); ein Chemokin mit aktivierenden

und chemotaktischen Eigenschaften auf Monozyten, dem eine wesentliche Rolle im Entzündungsgeschehen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zugeschrieben wird (44).

Intestinale Epithelzellen dienen jedoch in dem Netzwerk immunologischer Interaktionen nicht nur als Ziel von durch Leukozyten exprimierten Effektoren; vielmehr zeigen neue Erkenntnisse, dass die Epithelzellen neben ihrer Schranken-, Sekretions- und Absorptionsfunktion eine Reihe immunologischer Eigenschaften besitzen, eine zentrale Rolle bei der Regulierung sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität einnehmen und ein wichtiges Moment im Bezug auf die Auslösung und Unterhaltung einer Entzündungsreaktion darstellen könnten (einen Überblick vermitteln 17 und 39). Neben der Produktion von MCP-1 sind intestinale Epithelzellen unter Einwirkung verschiedener Zytokine oder Lipopolysaccharide (LPS) ebenso eine Quelle von proinflammatorischen Chemo- und Zytokinen wie granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-1, IL-6 und IL-8 (31, 38, 50, 78, 83, 89 und 92). Insbesondere scheinen Epithelzellen unter dem Einfluss von invasiven Bakterien eine Reihe von Zytokinen zu exprimieren, was auf ihre Rolle als immunologische Schildwächter im Falle einer Infiltration der Darmwand durch Bakterien schließen lässt (38). Des Weiteren setzen Kolon-Epithelzellen Mediatoren wie Eicosanoide und TGF- β frei, die neben immunregulatorischen Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Karzinogenese von Darmepithel zu spielen scheinen. (3, 46, 75 und 79). Li Y et al. konnten zeigen, dass eine Kokultur von intestinalen Epithelzellen mit T-Zellen aus peripherem Blut von Gesunden zu einer T-Zell-Proliferation und Tyrosin-Phosphorylierung von p56lck, einer Proteinkinase, die mit dem CD8-Molekül auf T-Lymphozyten assoziiert ist, führt (48). Dass für diese T-Zell-Aktivierung hauptverantwortlich ein 180-kD Glykoprotein (gp 180), ein Ligand auf der Oberfläche von Darmepithelzellen, ist, demonstrierten Yio et al. (104). Weiterhin exprimieren Darmepithelzellen MHC II-Antigene, deren Produktion im entzündeten Darm hochreguliert wird (53 und 91). Konsequenterweise sind diese Zellen auch zum Antigen-Processing und deren Präsentation in der Lage und sind somit an der Regulation der Immunantwort durch mukosale T-Zellen

beteiligt (9, 65). Des weiteren beschreiben einige Studien einen Einfluss von Darmepithelzellen auf Proliferation und Zytokinproduktion von T-Lymphozyten, deren Aussagen sich bislang allerdings zum Teil noch erheblich widersprechen. So stellten Joseph et al. einen stimulierenden Effekt von Epithelzellen auf Lamina propria T-Lymphozyten (LPTs) fest, der allerdings bei Lymphozyten von an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erkrankten Patienten vermindert sei (36). Demgegenüber fanden andere Studien einen negativen Effekt von Darmepithelzellen auf die CD3-vermittelte Proliferation und Zytokinproduktion von T-Lymphozyten (53). Ob dieses Phänomen durch Zellmembran-Bestandteile der Epithelzellen oder durch lösliche Faktoren vermittelt wird, und ob es sich nur auf intestinale intraepitheliale Lymphozyten oder auch auf Lymphozyten des peripheren Blutes erstreckt, ist unter diesen Studien allerdings strittig (18 und 103).

T-Lymphozyten vermögen ihrerseits - neben der bereits erwähnten Einflussnahme durch die von ihnen produzierten Zytokine IL-4 und IFN- γ - eine Reihe von Wirkungen auf die Darmepithelzellen zu entfalten. So konnte nachgewiesen werden, dass Wechselwirkungen zwischen T-Lymphozyten und Monozyten zellphysiologische Eigenschaften wie Elektrolyttransport und Schrankenfunktion des Darmepithels verändern können (54). Es ist bekannt, dass T-Lymphozyten und deren Zytokine, die im Falle der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermehrt gebildet werden (74), die mukosale Immunantwort regulieren, in dem sie beispielsweise stimulierend auf die Epithelproliferation und die Expression von MHC-Antigenen wirken, und die sekretorische Aktivität von Epithelzellen zu verändern vermögen (25, 39, 50, 68, 72 und 84). Werden die aus Mukosa gewonnenen IELs in vitro zurück auf eine Monolayer-Kultur von Darmepithelzellen gegeben, verändern die durch die Kokulturbedingungen freigesetzten löslichen Faktoren den Elektrolyttransport und die Schrankenfunktion von Darmepithelzellen (40). Des weiteren fördern IELs, die den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor (TCR) tragen, das Wachstum von Darmepithelien, indem sie keratinocyte growth factor sezernieren (11).

Zusammenfassend scheint demzufolge also eine fein abgestimmte bidirektionale Einflussnahme von Epithelzellen auf T-Lymphozyten und vice versa von großer

Bedeutung für eine intakte Immunitätslage der Darmwand sowie für die Auslösung und Unterhaltung einer Entzündungsreaktion zu sein.

2. Zielsetzung der Arbeit

Intention dieser Arbeit war es, vier zum Teil aufeinander aufbauende Fragestellungen zu beantworten:

1. Gibt es eine wechselseitige Einflussnahme von T-Lymphozyten und Darmepithelzellen, die die T-Lymphozyten zu einer Veränderung in ihrem Zytokinprofil veranlasst ?
2. Wenn ja, besteht dieser Effekt in einer Verschiebung des Gleichgewichtes der T1/T2-Phänotypen bei Th- und/oder Tc-Zellen ?
3. Wird ein etwaiger Effekt durch lösliche Faktoren oder durch direkte Zell-Zell-Interaktionen vermittelt ?
4. Im Falle eines gegebenen Effektes auf das Zytokinprofil der T-Lymphozyten: Ist dieser physiologisch oder krankheitsspezifisch ?

Zur Klärung dieser Fragen wurde ein Modell entwickelt, welches ermöglichte,

1. den Effekt einer Kokultur von Darmepithelzellen und Lymphozyten auf die Produktion der Zytokine IL-4 und IFN- γ in ihrer Indikatorfunktion für die Unterscheidung von T1/T2-Lymphozyten zu messen und
2. festzustellen, ob eine Veränderung im Zytokinprofil der Lymphozyten durch lösliche Faktoren oder durch Zell-Zell- Interaktionen getragen wird.

Gleichzeitig wurde durch Bestimmung der CD-Moleküle 4 und 8 auf den Zelloberflächen der Lymphozyten eine Differenzierung zwischen Th- und Tc - Zellen durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

Für die Versuche wurden mononukleäre Zellen aus peripher-venösem Blut (PBMCs) verwendet, die aus dem Blut von einerseits gesunden Freiwilligen und andererseits von Patienten gewonnen wurden, bei denen ein Morbus Crohn oder eine Colitis ulcerosa vordiagnostiziert worden war. Bei diesen Patienten wurde die Krankheitsaktivität mittels des Rachmilewitz-Index bei Patienten mit Colitis ulcerosa (76) bzw. mittels des Cohn's disease activity index (CDAI) bei Patienten mit Morbus Crohn definiert (7); (siehe Tabelle 1). Insgesamt gingen in die Studie Daten von 15 Patienten mit Colitis ulcerosa, 12 Patienten mit Morbus Crohn und 10 gesunden Kontrollen ein.

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollen
Männlich	n = 6	n = 8	n = 9
Weiblich	n = 6	n = 7	n = 1
CDAI/CAI	133	4,83	neg.
Leukozyten; Ø	10.200/µl	8.430/µl	6.600/µl
Thrombozyten; Ø	380.000/µl	333.000/µl	280/000µl
Hämoglobin; Ø	13,2 g/dl	13,6 g/dl	13,8 g/dl
CRP; Ø	2,78 g/dl	1,4 g/dl	neg.
Fibrinogen; Ø	378 mg/dl	461 mg/dl	258 mg/dl
BSG nach 1 h; Ø	12,9 mm	14,9 mm	5 mm
extraintestinale Symptome	Arthritis: 2 von 12 Fisteln: 1 von 12 Stomatitis: 1 von 12	Arthritis: 1 von 15 Periostitis: 1 von 15	0 von 10
Mesalazin	10 von 12	15 von 15	0 von 10
Azathioprin	1 von 12	0 von 15	0 von 10
Kortikosteroide/Budenosid	8 von 12 Zwischen 4 und 60 mg	11 von 15 zwischen 7,5 und 35 mg	0 von 10

Tabelle 1: Patienten-Eigenschaften

3.2 Zellkultur von Darmepithel Zell-Linie Caco-2

Materialien :

Sterilbank (Laminarflow), Unterdruckpumpe, Inkubationsschrank (37°C, 5% (v/v) CO₂, H₂O-gesättigte Kammer), Zentrifuge (Beckmann: Radius: 254 mm), Eppendorf Zentrifuge für Microtubes, Wärmebad für Medien, Kulturflaschen (250/ 125 ml: Greiner), Zellkulturschalen (Greiner), Mikrotiterplatten, Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Multipipette, Autopipette (Eppendorf: Reference), Pasteurpipetten, Glaspipetten (10/20 ml: Greiner), Autopipetus, Cell Scraper (Costar), Mikroskop (Leica), Neubauer-Zählkammer mit Objektträgergläschen, Cellcounter, Sterilfilter, 1,5 ml Microtubes (Sarstedt), 15 ml und 50 ml Tubes (Greiner).

Medien :

Das für die Caco-2-Zellkultur verwendete Medium setzte sich zusammen aus MEM-Medium (Dulbecco), supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA, 1% Glutamin und 10% FCS. Das für die Kokultur verwendete Lymphozyten-Medium setzte sich zusammen aus RPMI 1640-Medium (Serva), supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA, 1% Glutamin und 10% AB-Serum (Serva). PBS-Lösung (w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺)(Dulbecco), EDTA-(Äthylendiamin-Tetraessigsäure) (Sigma)/Trypsin-Lösung 0,025 % (v/v)(Boehringer), Ethanol 70%, Trypanblau.

3.2.1 Beschreibung der Caco-2-Zelllinie

Bei der für die Kokulturen verwendeten Caco-2 Zell-Linie handelt es sich um menschliche Kolon-Adenokarzinom-Zellen, die primär von einem Kolon-Adenokarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes stammen. Die Zellen, bezogen von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Nr.: ACC 169), sind frei von Mycoplasma-Kontamination sowie

folgenden Viren: EBV, HBV, HLV, HIV, HTLV-1 und HTLV-2. Immunologisch sind sie Zytokeratin-positiv und negativ bezüglich Desmin, Endothel, GFAP, Neurofilament sowie Vimentin. Die Zellen weisen ein in der Multiplex PCR einheitliches DNA-Profil hinsichtlich D1S80, D2S44, D17S30 und ApoB auf.

Die Zell-Linie wurde 1974 von Jorgen Fogh entwickelt und gewann in den vergangenen Jahren zunehmende Bedeutung in *in-vitro* Studien über die enterozytäre Funktion und epitheliale Eigenschaften intestinaler Epithelzellen. Diese Tatsache verdanken sie ihrer Fähigkeit, sich in der Kultur unter Voraussetzung der Konfluenz (102) spontan und schnell in morphologischer und funktioneller Hinsicht homogen enterozytär zu differenzieren (37). Dabei wurden, abgesehen von morphologischen Charakteristika, die Expression von Bürstensaum-Hydrolasen, anderen Membran-Proteinen sowie sekretorischen Proteinen, Lipiden und Lipoproteinen untersucht. So zeigte sich, dass menschliche Kolonkarzinom Zell-Linien dieser Art u.a. TGF- α , TGF- β , EGF sowie damit verbundene Rezeptoren exprimieren. Neben der Eigenschaft von Caco-2-Zellen als Transportsystem zu fungieren, demonstrierten Studien diese Zell-Linien als wertvolles System zur Untersuchung der Mechanismen bei intestinaler parasitärer Infektion. Diese Eigenschaften sind umso bedeutsamer, als dass man sah, dass Versuche, Zell-Linien von normalem Darmepithel abzuleiten, fehlschlügen (71).

Insgesamt gesehen erschien die Verwendung dieser Zell-Linie als besonders geeignet zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Lymphozyten und Darmepithel.

3.2.2 Kultivieren und Umsetzen von Caco-2-Zellen

Alle Arbeiten im Bereich der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Caco-2-Zellen wuchsen als Monolayer in Zellkulturflaschen in dem oben beschriebenen Mediumansatz und wurden in H₂O gesättigter Umgebung bei 5% (v/v) CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert. Sie konditionierten ihr Medium und zeigten bei entsprechenden Kulturbedingungen

ein logarithmisches Wachstum (Verdopplungszeit ca. 80 Stunden). Das Wachstumsverhalten wurde täglich mikroskopisch kontrolliert, wobei die Farbe des Mediums, die Morphe der Einzelzellen und die Gesamtkonfluenz beurteilt wurden.

Vorgehen beim Umsetzen/Splitten der Zellen:

Das Medium aus der Kulturflasche wurde mithilfe der Unterdruckpumpe und Pasteurpipetten abgesaugt und verworfen. Durch Zugabe und anschließendem Absaugen von 5 ml steriler PBS-Lösung (w/o Ca^{++} , Mg^{++}) wurde der Zelldetritus abgespült. Die Zellen wurden nach erneuter Zugabe von 5ml EDTA-/Trypsin-Lösung 0,025% (v/v) für ca.15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dieser Arbeitsschritt diente einerseits der Komplexierung von Ca^{++} Ionen, die eine Desmosomenlockerung durch Ca^{++} -Entzug erzeugte, und andererseits der tryptischen Andauung und somit der Ablösung der Zellen. Unter dem Mikroskop wurde der Zeitpunkt der Ablösung der Zellen vom Flaschenboden und voneinander bestimmt, worauf die tryptischen Digestion durch Zugabe von 10-15 ml Medium limitiert wurde. Wenn notwendig, um eine kritische Zeitdauer des Andauungsprozesses von 15 Minuten nicht zu überschreiten, wurden die Zellen behutsam mechanisch unter Zuhilfenahme eines Cell Scrapers vom Flaschenboden gelöst. Es erfolgte die Aufnahme der Zellen in ein 15ml Tube und eine Sedimentierung der Zellen mittels der Zentrifuge über 5 Minuten bei 30g. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium, das auf 37°C vorgewärmt wurde, aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspension vereinzelt und in einer Verdünnung von 1:6 - 1:10 zur Ausgangszellzahl mit Medium in neue Kulturflaschen eingebracht, wobei eine Dichte von ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ 80 cm² in 10 ml Medium angestrebt wurde. Hierfür war zuvor eine Bestimmung der Zellzahl durch Zellzählung notwendig.

3.2.3 Zellzählung mit der Neubauer-Kammer und definiertes Aussäen von Zellen

Von den vereinzelt und resuspendierten Zellen wurde 1 ml in ein Reaktionsgefäß überführt mit Trypanblau 1:10 verdünnt. Von diesem Volumen

wurde nach erneuter Resuspension ein Tropfen unter ein Objektträgerglas gebracht, das der Neubauer-Kammer auflag. Es wurden 16er Felder ausgezählt. Die Summe der gezählten Zellen multipliziert mit Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) entsprach der Zellzahl/ml. Somit konnte durch Pipettieren eines bestimmten Volumens des Suspensionsansatzes eine definierte Zellzahl ausgesät werden.

3.2.4 Präparieren der Caco-2-Zellen für die Kokultur

Die Zell-Aufnahme, -Reinigung, und -Zählung erfolgte nach den in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Prinzipien. Für die Kokultur wurde die Konzentration der Zellen auf $4 \cdot 10^5$ /ml in Lymphozyten-Medium eingestellt.

3.3 Präparation von Lymphozyten

Materialien :

Sterilbank (Laminarflow), Unterdruckpumpe, Inkubationsschrank (37°C , 5% (v/v) CO_2 , H_2O -gesättigte Kammer), Zentrifuge (Beckmann: Radius: 254 mm), Eppendorf Zentrifuge für Microtubes, Wärmebad für Medien,, Kulturflaschen (250/ 125 ml: Greiner), Mikrotiterplatten, Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Multipipette, Autopipette (Eppendorf: Reference), Pasteurpipetten, Glaspipetten (10/20 ml: Greiner), 5 ml Einwegpipette (Sarstedt), Autopipetus, Mikroskop (Leica), Neubauer-Zählkammer mit Objektträgergläschen, Cellcounter, Sterilfilter, 1,5 ml Microtubes (Sarstedt), 15 ml und 50 ml Tubes (Greiner), EDTA-Vollblut von Probanden (aus in der Regel 3 EDTA Blutentnahme-Röhrchen) (Braun).

Medien :

Das verwendete Medium setzte sich zusammen aus RPMI 1640-Medium (Serva), supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA, 1%

Glutamin und 10% AB-Serum (Serva). PBS-Lösung (w/o Ca^{++} , Mg^{++})(Dulbecco), Ficoll-Lösung (Dulbecco), Ethanol 70%, Trypanblau.

3.3.1 Präparation von PBMCs

Nach einem Protokoll von Romeu et al. (82) wurden Lymphozyten durch Ficoll-hypaque Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dazu wurden zunächst 15 ml Ficoll-Lösung in einem 50 ml Tube vorgelegt, welche mit dem EDTA-Vollblut behutsam überschichtet wurde, so dass eine deutliche Trennung dieser 2 Phasen bestehen blieb. Anschließend wurden die verschlossenen Tubes für 40 Minuten bei 1400 rpm (= 1650 x g) zentrifugiert. Der mithilfe der Ficoll-Lösung so erzielte Dichte-Gradient bedingte die Auftrennung des Vollblutes in folgende Phasen: 1. Zell-Plasma-Suspension, 2. Lympho- und Monozyten (PBMC's = Interphase), 3. Ficoll-Lösung, 4. Erythrozyten und Neutrophile. Im Folgenden wurde dann – möglichst selektiv - die Interphase abgesaugt, in ein neues 50 ml Tube überführt und hier auf 50 ml mit PBS-Lösung aufgefüllt. Es schlossen sich nun 2 Wasch-Schritte an. Hierfür wurde jeweils 15 Minuten bei 1200 rpm (= 1500 x g) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die PBMCs wurden anschließend resuspendiert; beim erstenmal mit 20 ml PBS-Lösung und beim zweitenmal mit 20 ml Medium. Nach dem ersten Wasch-Schritt wurde die absolute Zellzahl in den 20 ml PBS bestimmt, so dass durch erneute Zentrifugation, Abnehmen des Überstandes und Resuspension der Zellen in einer adäquaten Menge Medium eine gewünschte Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt werden konnte.

3.3.2 Reinigung der PBMCs von Monozyten

Um einen störenden Einfluss von Monozyten auf die untersuchten wechselseitigen Beziehungen zwischen Lymphozyten und Epithelzellen weitestgehend zu unterbinden, wurden die PBMCs im Weiteren von Monozyten gereinigt. Dafür wurden die in Medium resuspendierten PBMCs in Kulturflaschen ausgesät und für drei Stunden in H_2O gesättigter Umgebung bei

5% (v/v) CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert. Die während dieser Zeit stattfindende Depletion und Adhärenz der Monozyten am Flaschenboden ermöglichte es, selektiv die nicht adhärierenden Lymphozyten zusammen mit dem Medium wieder aufzunehmen respektive mit weiterer PBS-Lösung abzuspülen. Beim Spülen des Flaschenbodens wurde darauf geachtet, dass die eingebrachte PBS-Lösung nicht direkt auf den Boden gespritzt wurde, um die nach dem Abnehmen des Mediums verbleibenden Lymphozyten nur durch Schwenken der Flüssigkeit in der Kulturflasche zu lösen und die adhärierenden Monozyten dort zu belassen. Die in Medium bzw. PBS aufgenommenen Lymphozyten wurden danach in einem weiteren 50 ml Tube 15 Minuten bei 1200 rpm (= 1500 x g) zentrifugiert und mit 20 ml Medium wieder resuspendiert. Nachdem die absolute Zellzahl in diesem Volumen durch Zellzählung ermittelt worden war, wurde die Zellkonzentration im Medium durch erneute Zentrifugation, Abnehmen des Überstandes und Resuspension in einer adäquaten Menge Medium auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die so aufgereinigten Lymphozyten hatten einen Reinheitsgrad von mindestens 95%, wie flowzytometrisch ermittelt werden konnte.

3.3.3 Zellzählung nach Lymphozyten-Isolierung

Von den resuspendierten Zellen wurden 100 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Trypanblau 1:10 verdünnt. Von diesem Volumen wurde nach erneuter Resuspension ein Tropfen unter ein Objektträgerglas gebracht, das der Neubauer-Kammer auflag. Es wurden 16er Felder ausgezählt. Die Summe der gezählten Zellen multipliziert mit Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) entsprach der Zellzahl/ml, die absolute Zellzahl somit dieser Konzentration multipliziert mit der Menge des Ausgangs-Volumens, nämlich 20 ml.

3.4 Kokultivierung von PBMCs und Caco-2 – Zellen

Materialien :

Sterilbank (Laminarflow), Unterdruckpumpe, Inkubationsschrank (37°C, 5% (v/v) CO₂, H₂O-gesättigte Kammer), Zentrifuge (Beckmann: Radius: 254 mm), Eppendorf Zentrifuge für Microtubes, Wärmebad für Medien, 24-Well-Platten (Falcon), Kühlschranks (Bosch), Transwell-Filter (0,4 µm, Falcon), Kulturflaschen (250/125ml: Greiner), Mikrotiterplatten, Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Multipipette, Autopipette (Eppendorf: Reference), Pasteurpipetten, Glaspipetten (10/20 ml: Greiner), 5 ml Einwegpipette (Sarstedt), Autopipetus, Mikroskop (Leica), Neubauer-Zählkammer mit Objektträgergläschen, Cellcounter, Sterilfilter, 1,5 ml Microtubes (Sarstedt), 15 ml und 50 ml Tubes (Greiner).

Medien :

Es wurde das Lymphozyten-Medium auf RPMI-Basis verwendet. Stimulationsmix, bestehend aus: 5 ml Medium, 5µl PMA-(Phorbol myristated acetate) Lösung (Serva), in einer Konzentration von 1µg/ml DMF, 5µl Monensin-Lösung (Fluka), in einer Konzentration von 1mM/ml DMF und 5 µl Ionomycin-Lösung (Serva), in einer Konzentration von 1mM/ml DMF. PFA-Lösung aus 8g PFA (Merck) ad 100 ml PBS, auf pH 7,2 eingestellt. PBS-Lösung (w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺)(Dulbecco), Ethanol 70%, Trypanblau.

3.4.1 Anlegen der 4 Kultur-Ansätze

Die in Medium resuspendierten PBMCs wurden zu 1ml, also $2 \cdot 10^6$ Zellen/Well in 24-Well-Platten ausgesät. Die Anzahl der belegten Wells wurde in vier Sektoren unterteilt, mit denen im einzelnen wie folgt verfahren wurde:

1. Sektor: Negativkontrolle; die Zellen verblieben unstimuliert in Monokultur.
2. Sektor: Positivkontrolle; Zugabe von 2 μ l Pokeweed (PW)-Mitogen/Well
3. Sektor: Indirekte Kokultur; getrennt durch einen Transwell-Filter wurden diesen Ansätzen $2 \cdot 10^5$ Caco-2-Zellen in 500 μ l Medium hinzugefügt.
4. Sektor: Direkte Kontaktkokultur; diesen Ansätzen wurden $2 \cdot 10^5$ Caco-2-Zellen in 500 μ l Medium ohne Transwell-Filter hinzugefügt.

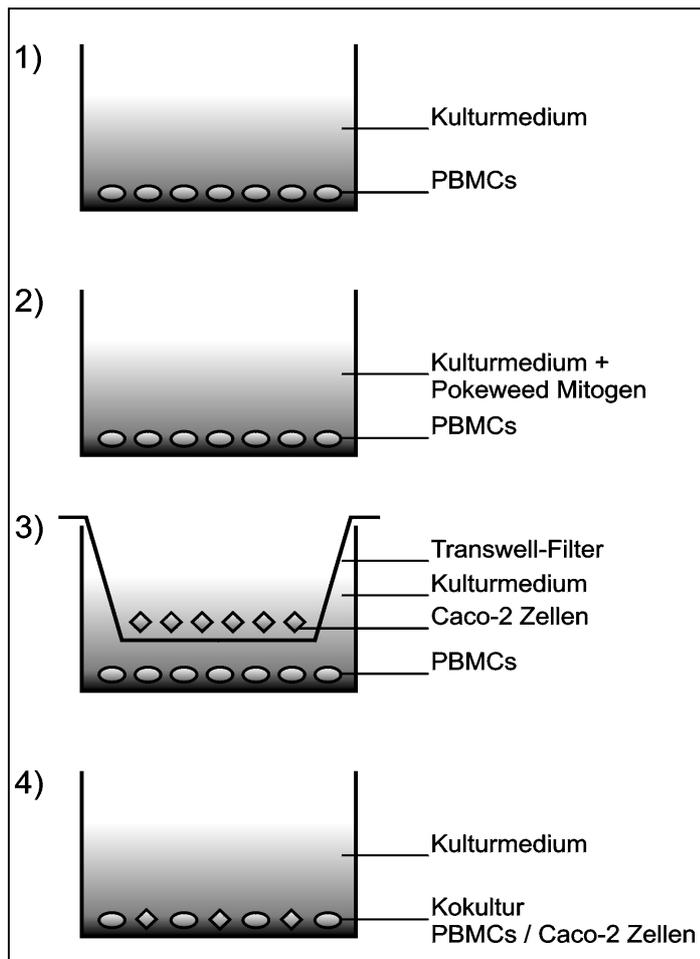


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Kokultur-Versuche

3.4.2 Zellaufnahme, -stimulation und -fixierung aus den 4 Kultur-Ansätzen

Nach 24 Stunden Inkubationszeit in H₂O gesättigter Umgebung bei 5% (v/v) CO₂ und 37°C im Brutschrank wurden die Transwell-Filter mitsamt den Caco-2-Zellen von den Ansätzen des 3. Sektors entfernt und verworfen. Die Zellen der 4 Sektoren wurden in vier 15 ml Tubes überführt. Dafür wurde zunächst das Medium mit den darin enthaltenen Zellen abgenommen und in die Tubes gegeben. Dann wurden die Wells mit 1 ml PBS-Lösung (w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) gespült und dieses Volumen ebenfalls in die Tubes gegeben. Anschließend wurde 15 Minuten bei 1200 rpm (= 1500 x g) zentrifugiert, dann der Überstand abgenommen und verworfen und schließlich die Zellen mit 500 µl Medium resuspendiert. Zu den 4 Ansätzen wurden nun je 500 µl Simulationsmix, der zuvor gevortext worden war, hinzugegeben. Die Ansätze wurden danach für 4 Stunden inkubiert und dabei alle 15 Minuten zum Schütteln aus dem Inkubator geholt. Nach den 4 Stunden wurden die Tubes für 15 Minuten bei 1200 rpm (= 1500 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und in 1,5 ml Microtubes überführt. Dort wurden ihnen 500 µl PFA-Lösung zugesetzt, so dass sich eine PFA-Endkonzentration von 4% ergab. Nachdem die Ansätze für 30 Minuten bei 4°C gekühlt gelegen hatten, wurde die PFA-Lösung nach einer Short-Spin Zentrifugation abgenommen und die Zellen in PBS resuspendiert. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurden die Zellen dann bei 4°C gelagert.

3.4.3 Ausschluss der IL-12 abhängigen Aktivierung durch Monozyten

Von Makrophagen produziertes IL-12 induziert bei T-Lymphozyten eine Differenzierung in Richtung einer Typ-1 Reaktion mit IFN- γ -Produktion. Um einen Einfluss von Makrophagen auf diesem Weg auf die Interaktion von T-Lymphozyten und Darmepithelzellen auszuschließen, führten wir Experimente unter Verwendung von anti-IL-12 Antikörpern durch. Dabei wurden den 4 Kultur-Ansätzen vor Beginn der Kokultivierung neutralisierende Maus IgG1 C8.6 anti-human IL-12 (p40/70) -Antikörper (Pharmingen) in Konzentrationen

von 10-1000 ng/ml hinzugegeben. Im übrigen wurde in diesen Experimenten wie in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben verfahren.

3.4.4 Untersuchung auf MHC I -abhängige Oberflächenaktivierung

Um unterscheiden zu können, ob stimulierende bzw. inhibierende Effekte bezüglich der Produktion von IL-4 oder IFN- γ von Lymphozyten durch lösliche Mediatoren oder durch zelluläre Oberflächenkontakte zwischen CD28+ zytotoxischen T-Lymphozyten mit Darmepithelzellen bedingt sind, führten wir Experimente unter Verwendung von anti-MHC I-Antikörpern durch. Dabei wurden den 4 Kultur-Ansätzen vor Beginn der Kokultivierung anti-MHC I-Antikörper (Maus IgG1kappa, Clone G-46-2.6 anti human HLA A/B/C, Pharmingen) in Konzentrationen zwischen 1 bis 5 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Im übrigen wurde in diesen Experimenten wie in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben verfahren.

3.5 Flowzytometrische Bestimmung der Parameter CD 4, CD 8, IFN- γ , sowie IL 4

Materialien:

Eppendorf Zentrifuge für Microtubes, Inkubationsschrank (37°C, 5% (v/v) CO₂, H₂O-gesättigte Kammer), Wärmebad für Medien, Kühlschrank (Bosch), Mikrotiterplatten, Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Multipipette, Autopipette (Eppendorf: Reference), Pasteurpipetten, Sterilfilter, 1,5 ml Microtubes (Sarstedt), FACS-Zellsorter (Becton Dickinson), FACS-Röhrchen (Sarstedt), gelabelte AK: anti-CD4 (Cytochrome®, clone RPA-T4 mouse IgG1), anti-CD8 (Cytochrome®, clone RPA-T8 mouse IgG1), anti-IFN- γ (FITC, clone 4S.B3 mouse IgG1), anti-IL-4 (PE, clone 8D4-8 mouse IgG1; alle Becton Dickinson)

Medien:

Lymphozyten-Medium auf RPMI-Basis, Permeabilisierungspuffer bestehend aus 80 Vol% Lymphozyten- Medium, 10 Vol% FCS-Serum (Dulbecco) und 10 Vol% einer 1%igen Saponin-Lösung, FACS-Solution (Becton Dickinson).

3.5.1 Prinzip der Flowzytometrie

Die Durchflußzytometrie als Verfahren zur multiparametrischen Analyse von Zellen beruht auf der Messung und Auswertung optischer Signale von unterschiedlicher Qualität, nämlich Fluoreszenz und Lichtstreuung.

Dabei werden die Partikel durch hydrodynamische Fokussierung in Reihe einzeln durch eine Messkammer geschleust, in der sie von einem fokussiertem Lichtstrahl beleuchtet werden. Gemessen werden dann zum einen das Streulicht in verschiedenen Raumwinkeln und zum anderen die Fluoreszenz der Partikel.

Zur Entstehung und quantitativen sowie qualitativen Detektion der Signale müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Die Zellen/Partikel müssen als Einzelzellen in Suspension vorliegen.
2. Zellbestandteile von Interesse müssen selektiv mit Farbstoffen versehen werden, deren Fluoreszenz mit dem fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle angeregt werden kann und deren Emission vom Detektionssystem gemessen werden kann.

Als Lichtquelle finden dabei Bogenlampen und Laser Verwendung, welche neben einer konstanten Strahlungsleistung von hoher Intensität ihr Emissionsspektrum im Bereich des Absorptionsmaximums der verwendeten Fluorochrome haben müssen. Während Bogenlampen ein breites Emissionsspektrum mit hoher Intensität im UV-Bereich aufweisen (mit dem Nachteil einer relativ unspezifischen Anregung der eingesetzten UV-anregbaren Fluorochrome) und vor allem zum Zwecke von DNA-Messungen verwandt werden, emittieren Laser definitionsgemäß monochromatisches Licht, sodass - je nach Gasfüllung des Gerätes (in Gebrauch sind Argon-, Helium-Neon-, Krypton-, Helium-Cadmium-, Mischgaslaser sowie kombinierte Systeme mit

mehreren Lasern) - ein nur relativ enges Spektrum an Fluorochromen, welche ihre Absorptionsmaxima im Bereich der jeweiligen Wellenlängen der Laser aufweisen, eingesetzt werden kann, mit dem Vorteil, dass die Anregung der Farbstoffe sehr spezifisch erfolgt.

Färbetechnisch können Protein-Fluorochrom-Konjugate wie z.B. Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper von direkt färbenden Affinitäts-gebundenen, sowie interkalierenden Fluorochromen unterschieden werden. Bei der zur Anwendung kommenden Mehrfarbenfluoreszenzanalyse eignen sich insbesondere Fluorochrome, die sich zwar hinsichtlich ihrer emittierten Fluoreszenzfarbe unterscheiden, jedoch über einen gemeinsamen Excitationsbereich verfügen, welcher sich mit den Emissionslinien der eingesetzten Lichtquelle deckt, d.h. einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes'schem Shift) aufweisen. Bei der Wahl der zu verwendenden Fluorochrome in der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse sind ferner deren relative Empfindlichkeiten sowie relative spektrale Überlappungen zu berücksichtigen. So ist es sinnvoll, schwächer exprimierte Antigene mit Fluoreszenzfarbstoffen von relativ hoher Sensitivität anzufärben und Fluorochrome miteinander zu kombinieren, deren relative spektrale Überlappung möglichst klein ist, um eine spätere Kompensation (Korrektur der Frequenzüberlappung) nach Möglichkeit zu vermeiden. Dabei wird, durch eine Elektronik gesteuert, jedem Signalimpuls derjenige Anteil subtrahiert, der theoretisch durch spektrale Frequenzüberlappung verursacht wurde, sodass im Idealfall eine mit Fluorochrom A angefärbte Zelle bezüglich einer weiteren mit A überlappenden Fluoreszenz B die selbe Klassenzahl (s.u.) zugeordnet wird wie einer gänzlich ungefärbten Zelle.

Die Analyse des im Kreuzungspunkt zwischen Lichtstrahl und Zelle entstehenden Streulichts in verschiedenen Raumwinkeln beruht auf der Kenntnis, dass die bestrahlten Partikel in starker Abhängigkeit ihrer physikalischen Eigenschaften das Licht in unterschiedlicher Quantität und Qualität streuen. Zur Analyse bedient man sich der Detektion in zwei Winkelbereichen, nämlich: 1. dem Engwinkelbereich von 0-10° des einfallenden

Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter, [FSC]), dem Bereich mit der größten Intensität des Streulichts und 2. dem Bereich des rechten Winkels zum einfallenden Lichtstrahl (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter [SSC]). Das für die Querschnittsfläche sensitive Vorwärtsstreulicht erlaubt somit eine Aussage über die Zellgröße, das für den Refraktionsindex des Partikels sensitive Seitwärtsstreulicht erteilt Information über die äußere Form (Membranfaltung) und Zellgranularität. Mithilfe dieser beiden Parameter lassen sich einzelne Leukozyten-Populationen relativ klar voneinander abgrenzen.

3.5.2 Aufbau eines Durchflußzytometers

Ein Durchflußzytometer lässt sich in die drei Elemente Flüssigkeitssystem, optisches System und Signalverarbeitung gliedern.

Im Flüssigkeitssystem vereinigen sich die Zuleitung aus dem Probenröhrchen, welche der Messkammer über ein Ansaugsystem die Zellsuspension zuführt, mit einer zweiten, Trägerflüssigkeit mit sich führenden, Leitung derart, dass das Probenvolumen aus der einen Leitung zentral in den Laminarstrom der Trägerflüssigkeit geleitet wird, wodurch das Probenvolumen eine Beschleunigung um mehrere Zehnerpotenzen erfährt. Diese „hydrodynamische Fokussierung“ gewährleistet, dass die zu erfassenden Partikel dem Detektionssystem einzeln – in Reihe – zugeführt werden.

Das optische System besteht zum einen aus einem Anregungsteil, in welchem prismatische Linsen bzw. Strahlexpander den Laserstrahl derart verformen, dass er einen horizontal-elliptischen Durchmesser erhält, und zum anderen aus einem Detektionsteil. In diesem wiederum wird in einem Element das Vorwärtsstreulicht gemessen, dessen zentrale Anteile von $0 - 2^\circ$ von einem Blockerstreifen abgefangen werden, sodass selektiv das Streulicht in den Raumwinkeln $3 - 10^\circ$ von einer Sammellinse gebündelt einer Photodiode zugeführt werden. Ein orthogonal dazu angeordnetes Element dient sowohl der Messung des Seitwärtsstreulichtes als auch der Fluoreszenz. Das im rechten Winkel über ein Mikroskopobjektiv eingesammelte Licht wird zu diesem Zwecke in einem System aus Teilerspiegeln, dichroitischen Filtern, Blenden,

Bandpass- und Kantenfiltern in Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzlicht getrennt, die Fluoreszenz in verschiedene Teilbereiche zerlegt und hernach sowohl das Seitwärtsstreulicht als auch die verschiedenen Komponenten des Fluoreszenzlichtes in Photoröhren quantitativ erfasst. Die Blenden in diesem Element dienen der Regulierung der Hintergrundfluoreszenz und der Vermeidung des Effektes der Koinzidenz (gleichzeitige Erfassung mehrerer Zellen).

Das System der Signalverarbeitung dient der Umwandlung der optischen Signale in elektrische Impulse, der Signalverstärkung, als Filter für Rausch- und Störsignale und digitalisiert und speichert schließlich die gewonnenen Daten. Zum Zwecke der Signalumwandlung werden für den FSC Photodioden, für den SSC und das Fluoreszenzlicht Photoröhren eingesetzt. Der wesentliche Unterschied dieser beiden Instrumente liegt darin, dass die zur Messung des vergleichsweise signalintensiven Vorwärtsstreulichts eingesetzten Photodioden durch die auf die Photokathode treffenden Photonen ohne Verstärkung elektrische Spannung erzeugt, wohingegen bei der Photoröhre durch eine externe Spannungsquelle das Signal über Sekundärelektronen (Dynodenelektronen) verstärkt wird. Schließlich muss im Element der Signalverstärkung je nach Dynamik des Messbereiches die Wahl getroffen werden zwischen linearer bzw. logarithmischer Signalverstärkung, um der Differenz von z.T. mehreren hunderttausend Fluoreszenzäquivalenten innerhalb eines Messbereiches gerecht zu werden. So ist also bei einer logarithmischen Verstärkung der Signalunterschied zwischen zwei benachbarten Klassen (s.u.) erheblich höher als bei einer linearen. Als Filter für Rausch- und Störsignale fungiert nun der Threshold, ein elektronischer Mindestwert bezüglich eines Trigger-Parameters (z.B. FSC), den es zu überschreiten gilt, bevor die dazugehörigen Werte der anderen Detektoren aufgezeichnet werden. Um zu gewährleisten, dass zusammengehörige Impulse, die jedoch nicht exakt zeitgleich detektiert werden, einander zugeordnet werden, priorisiert ein elektronisches Impuls-Koordinationssystem dasjenige Signal mit dem höchsten Signal-Rausch-Abstand und ordnet dann die Impulse der übrigen Detektoren, welche innerhalb einer fest eingestellten Koinzidenzzeit eintreffen, dem

Priorisierten zu. Nach Umrechnung der Spannungsbeträge im Analog-/Digitalwandler (ADC) in eine Klassen- bzw. Kanalzahl, die je nach Auflösung des eingebauten ADCs Werte zwischen 0 und 255 (256-Klassenauflösung) oder 0 und 1023 (1024-Klassenauflösung) annehmen kann. Die so gewonnenen Daten werden schließlich im Listendateiformat abgespeichert, um miteinander korrelierende Werte für die spätere Datenauswertung zugänglich zu machen.

3.5.3 Zellpräparation für die FACS-Analyse, Durchführung der FACS-Analyse

In Anlehnung an das von Prussin beschriebene Verfahren (73) wurde in dieser Studie mit einer 3-fach Immunfluoreszenz-Färbung gearbeitet. Dafür wurden die wie in 3.4.2 beschrieben fixierten Zellen mittels short spin in der Eppendorf-Zentrifuge zunächst pelletiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und verworfen, sowie das Pellet mit 1 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert. Danach wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Folgenden wurde aus jedem Ansatz nochmals das halbe Volumen abpipettiert und in ein neues Tube überführt, sodass für die anschließende Färbung mit gelabelten Antikörpern 2 parallele Pools bereit standen, die mit unterschiedlichen Färbelösungen inkubiert wurden:

- Im Pool A wurde jeder Ansatz mit einer Färbelösung bestehend aus 14 µl einer 1%igen Saponin-Lösung, 10µl CD4-Antikörper, 2 µl IL 4-Antikörper und 2µl IFN-γ - Antikörper versehen.
- Im Pool B wurde jeder Ansatz mit einer Färbelösung bestehend aus 14 µl einer 1%igen Saponin-Lösung, 10µl CD8-Antikörper, 2 µl IL 4-Antikörper und 2µl IFN-γ - Antikörper versehen.

Danach wurden die Proben 1 Stunde bei 4°C gelagert und dabei alle 15 Minuten gevortext. Nachdem die Ansätze anschließend 2-malig mit Permeabilisierungspuffer gewaschen worden waren um unspezifische, nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Proben abschließend in FACS-Lösung wieder aufgenommen, in FACS-Analyseröhrchen überführt und

schließlich im FACS-Analysegerät gemessen. Die Daten wurden auf Disketten gespeichert.

3.5.4 Darstellung der Messergebnisse

Um eine möglichst selektive Aufzeichnung der Lymphozytenpopulation zu erreichen, erfolgte eine Vorauswahl nach dem Prinzip des „Live-Gatings“, bei dem das Gerät nur solche Zellen aufzeichnet, die sich innerhalb eines zuvor festgelegten Auswertefensters (Gate) in einem dot plot mit den Parametern FSC gegen SSC befinden. Durch dieses Definieren von Auswertefenstern (Gating) ist es möglich, die interessierenden Zellen von Artefakten, Zellaggregaten und –trümmern sowie anderen Zellarten abzugrenzen und bei weiteren Analysen nur noch solche Ereignisse zu berücksichtigen, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches liegen. Ebenso ist es aber auch möglich, Gates zu definieren, deren Inhalt offensichtlich Artefakte enthält und diesen nachträglich aus anderen dot plots zu subtrahieren.

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt als Zweiparameter–Punkteplot (dot plot). In dieser Form der graphischen Darstellung, in welcher die Relation zweier verschiedener Parameter zueinander gezeigt wird, steht ein Punkt stellvertretend für eine Zelle mit ihren beiden Eigenschaften.

3.6 Statistische Methoden

Die erzielten Daten wurden graphisch als Dot Plot-Graphen dargestellt und mit dem Programm WinMDI analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Programme Sigma Plot und SPSS. Es wurden der Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben und der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ angenommen.

3.7 RT-PCR

3.7.1 Prinzip der RT-PCR

In einer zusätzlichen Testreihe wurde versucht, die mittels FACS-Analyse erzielten Daten durch das Verfahren der RT-PCR mit anschließender Agarose Gel-Elektrophorese zu visualisieren. Die „Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR) ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis in geringen Mengen vorkommender spezifischer mRNA – Moleküle, welche vor allem zum Einsatz kommt, wenn nur geringe Mengen an spezifischer mRNA vermutet werden oder wenn nur eine geringe Anzahl an Zellen zur Verfügung steht. Sie ist ein semiquantitatives Verfahren um die Transkriptionsstärke verschiedener Gene zu bestimmen. Dabei können immer nur die Mengen an mRNA eines Gens verschiedener Proben untereinander verglichen werden, nicht aber etwa die zweier Gene z.B. innerhalb eines Gewebes. Das Verfahren der RT-PCR kombiniert dabei zwei sequentielle enzymatische Schritte: Die Synthese von cDNA von einer mRNA-Matrize durch eine reverse Transkriptase, gefolgt von der Polymerase Kettenreaktion mithilfe einer DNA Polymerase (Taq-Polymerase). Dabei hybridisiert man einen Primer an die RNA-Matrize und erstellt mittels der reversen Transkriptase und einer anschließenden PCR eine cDNA-Kopie. Unter den grundsätzlich möglichen 3 verschiedenen Methoden des cDNA-Primings wurde hier mit dem oligo(dT)-Priming gearbeitet. Dabei werden oligo(dT) Oligonukleotide (mit Längen zwischen 12 und 18 Nukleotiden) an die Poly-A-Sequenz am 3`-Ende der mRNA angelagert, wobei die gesamte mRNA-Population als Matrize für die cDNA-Synthese dient. Die zu Einsatz gekommene Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) besitzt zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität, mit der sie in Gegenwart des Primers in 5`->3`-Richtung eine komplementäre DNA synthetisiert, ebenfalls eine (wenn auch im Vergleich zu derjenigen des Affen-Myeloblastosis-Virus verhältnismäßig geringe) RNA-DNA-Heteroduplexmoleküle spezifische Ribonuclease-H-Aktivität. Sie ist

dennoch verhältnismäßig gut in der Lage, auch große mRNA-Moleküle vollständig zu kopieren.

Um mehrere Proben miteinander vergleichen zu können, wird von jeder Probe die gleiche Menge Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Von dieser Reaktion wird anschließend überall das gleiche Volumen in eine PCR-Reaktion als Template-DNA eingesetzt. Die PCR erfolgt mit Primern, die spezifisch sind für cDNAs ausgewählter Marker-Gene. Man geht davon aus, dass die Bandenstärke des PCR-Produkts auf einem Agarosegel direkt proportional ist zu dem Anteil der entsprechenden mRNA an der Gesamt-RNA, falls die Zyklenzahl der PCR-Reaktion nicht im Sättigungsbereich liegt. Die Vergleichbarkeit der PCR-Produkte verschiedener Proben ist daran geknüpft, dass die als Matrix für die PCR dienende cDNA ähnliche Mengen an intakter Nukleinsäure enthält. Da die photometrische Vermessung der RNA-Isolate nicht zwischen intakter und degradierter Nukleinsäure differenzieren kann und da trotz größter Sorgfalt bei der Reversen Transkription Variationen zwischen den zu vergleichenden Proben auftreten können, gelten PCR-Amplifikate von verschiedenen Proben erst dann als direkt vergleichbar, wenn gezeigt wurde, dass ein sogenanntes Houskeeping-Gen der zu vergleichenden Proben in der PCR gleiche Mengen an Amplifikat liefert. In dieser Arbeit fungierte β -Aktin als ein solcher interner Standard (13, 15, 41).

3.7.2 RNA Isolierung

Materialien:

Zentrifuge (Beckmann: Radius: 254 mm), Eppendorf Zentrifuge für Microtubes, Wärmebad für Medien, Kühlschranks (Bosch), -80°C – Gefrierschranks (Sanyo), Photometer (Eppendorf: Bio Photometer), Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Autopipette (Eppendorf: Reference), 1,5 ml Microtubes (Eppendorf), 15 ml Tubes (Greiner) Photometrie-Gefäße (Eppendorf).

Medien:

PBS - Lösung (w/o $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$)(Dulbecco), Denaturierungslösung (20 mmol/l Natriumcitrat, pH 7,0, 4 mol/l Guanidinium Thiozyanat, 0,5% Sarcosyl, 0,1 mol/l β -Mercaptoethanol), β -Mercaptoethanol, Natrium-Acetat, Phenol, Chloroform-Isoamyl Alkohol, Isopropanol (Stratagene), Ethanol [75%(v/v)] in DEPC (diethylpyrocarbonate) behandeltem Wasser, DEPC behandeltes Wasser (Clontech).

Dem RNA Isolierungs-Verfahren lag ein Protokoll nach Chomczynski und Sacchi zugrunde (16).

Wie in 3.4.1 beschrieben wurden in diesem Versuch nochmalig jeweils 4 Kultur-Ansätze aus den PBMCs von zwei gesunden Kontrollen, eines Morbus Crohn Patienten und eines Colitis ulcerosa Patienten angelegt.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit in H_2O gesättigter Umgebung bei 5% (v/v) CO_2 und 37°C im Brutschrank wurden die Transwell-Filter mitsamt den Caco-2-Zellen von den Ansätzen des 3. Sektors entfernt und verworfen. Die Zellen der 4 Sektoren wurden in vier 15 ml Tubes überführt. Dafür wurde zunächst das Medium mit den darin enthaltenen Zellen abgenommen und in die Tubes gegeben. Dann wurden die Wells mit 1 ml PBS-Solution (w/o Ca^{++} , Mg^{++}) gespült und dieses Volumen ebenfalls in die Tubes gegeben. Anschließend wurde 15 Minuten bei 1200 rpm (= 1500 x g) zentrifugiert, dann der Überstand abgenommen und verworfen und schließlich die Zellen mit 500 μl PBS-Solution (w/o Ca^{++} , Mg^{++}) resuspendiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden dann unter strikt RNase-freien Bedingungen (Tragen von Handschuhen, Verwendung ausschließlich RNase-freier Materialien und Medien) durchgeführt. Zunächst wurden die Tubes für 15 Minuten bei 1200 rpm (= 1500 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in 500 μl Solution D resuspendiert und in 1,5 ml Microtubes überführt. Nach Verschließen der Caps wurden diese für 15 Sekunden gevortext. Im Anschluss wurden jeweils 50 μl Natriumacetat hinzugegeben, 15 Sekunden gevortext, 500 μl Phenol hinzugefügt, nochmalig gevortext, 150 μl Chloroform hinzu

pipettiert und abermals für 15 Sekunden gevortext. Die so behandelten Proben wurden dann bei -4°C 20 Minuten gelagert. Wurden die Proben danach bei 14.000 rpm (10.000 g) zentrifugiert, so ergab sich eine Trennung des Gemisches in 2 Phasen: Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, wohingegen die Proteine und die DNA in der unteren Phenol-Phase und Interphase angesiedelt waren. Die Oberphase wurde dann in ein neues 1,5 ml Tube überführt, die Unterphase verworfen. Zu dem gewonnenen Volumen aus der Oberphase wurde anschließend ein identisches Volumen Isopropanol (ca. 350 μl) hinzugefügt und durch Vortexen für 15 Sekunden mit derselben vermischt. Die so behandelten Proben wurden darauf hin für 1,5 Stunden bei -20°C gelagert, einer Temperatur, bei der die RNA aus der Lösung ausfällt. Nach dieser Zeit wurden die Proben 30 Minuten bei 14.000 rpm (=10.000 g) zentrifugiert und die daraus entstehenden Überstände aus den Caps entfernt und verworfen. Sodann wurden die Pellets mit 700 μl 70%igem Ethanol versetzt und abermals für 15 Sekunden gevortext. Im Anschluss daran wurde nochmals für 10 Minuten bei 14.000 rpm (= 10.000 g) zentrifugiert. Nachdem dann die Überstände wiederum entfernt worden waren, wurden die Caps mit den darin enthaltenen RNA-Pellets 20 Minuten zum Trocknen (zwecks Verdampfen des restlichen Ethanols) bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Pellets danach mit 20 μl Aqua dest. versetzt, darin für 15 Sekunden gevortext und bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der isolierten RNA im Eluat wurde spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurden 1 μl Eluat mit 49 μl RNase freiem Wasser in jeweils einem Photometrie-Gefäß gemischt. Eine Abschätzung der erzielten Menge an RNA konnte dabei durch Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm vorgenommen werden. Dabei gibt die Absorption bei 280 nm nur die Konzentration der Proteine wieder, wohingegen die Absorption bei 260 nm mit der Konzentration an Nukleinsäuren korrespondiert. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, wenn die RNA-Präparation frei von Proteinen ist. Die Konzentration ergibt sich dann aus der Berechnung: $A_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Extinktionskoeffizient}$ (für RNA: 44,19). Das

Verhältnis A_{260}/A_{280} der gemessenen Proben betrug dabei stets $> 1,60$, ein Wert, der eine für die weitere Verwendung genügend reine Präparation anzeigte.

3.7.3 cDNA Synthese

Materialien:

Thermocycler (Biometra: Trio-Thermoblock), Eppendorf Zentrifuge für Microtubes, Kühlschrank (Bosch), Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Autopipette (Eppendorf: Reference), 1,5 ml Microtubes (Eppendorf), 100ml-Becherglas (Schott), gecrashtes Eis.

Medien:

RNA-Eluat (gewonnen wie in 3.7.2 beschrieben), 5x Erststrangpuffer (Gibco), RNase-Inhibitor (Promega), DTT (0,1 M; Gibco), dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM; Pharmacia-Amersham), Oligo dt 18 (Gibco), Superscript MMLV Reverse Transkriptase (10.000 U/ μ l; Gibco), DEPC behandeltes Wasser (Clontech).

Um RNA in cDNA umzuschreiben wurden umgerechnet je 1 μ g Gesamt-RNA aus den gewonnenen Eluaten in ein 1,5 ml Tube überführt und mit DEPC behandeltem Wasser auf ein Volumen von 20 μ l aufgefüllt. Für 2 Minuten wurden die Probengefäße dann im Thermocycler auf 70 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Berechnet auf die Endkonzentration wurden nach und nach 1 mM eines jeden dNTP, 1x Erststrangpuffer, 0,01 M DTT, 170 pmol Oligo dt 18, 40 U/ μ l RNase Inhibitor und 200 U/ μ l Superscript MMLV Reverse Transkriptase hinzupipettiert, sodass durch Auffüllung mit DEPC behandeltem Wasser ein Endvolumen von 50 μ l erreicht wurde. Die Ansätze wurden dann für eine Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert und anschließend für 5 Minuten einer Temperatur von 95°C ausgesetzt, um restliches

Enzymmaterial zu denaturieren. Gelagert wurde die in Lösung befindliche cDNA bei -40°C .

3.7.4 cDNA Amplifizierung

Materialien:

Thermocycler (Biometra: Trio-Thermoblock), Kühlschrank (Bosch), Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Autopipette (Eppendorf: Reference), 1,5 ml Microtubes (Eppendorf), Mineralöl (Sigma).

Medien:

Für die Amplifizierung des gesuchten IFN- γ kodierenden cDNA-Abschnittes wurden spezifische Primer (Clontech) eingesetzt:

5' Primer: 5' GCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGC 3'

3' Primer: 5' CTCCTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCTGCTGG 3'

Die Länge des amplifizierten Abschnitts betrug 427 Basenpaare.

Zur Kontrolle wurde ein β -Actin Primer mitgeführt (Eurogentec: RT-QP73-BACTIN):

5' - Primer: 5' CAAGAGATGGCCACGGCTGCT 3'

3' - Primer: 5' TCCTTCTGCATCCTGTTCGGCA 3'

Die Länge des amplifizierten Abschnittes betrug 340 Basenpaare.

cDNA aus den Ansätzen (wie in 3.7.3 beschrieben), dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (20 mM; Pharmacia-Amersham), 10x Taq Puffer (Gibco), MgCl_2 (50mM; Gibco), Taq-DNA Polymerase (5U/ μl ; Gibco)

Für jeden PCR-Ansatz wurden 5 μl cDNA in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Berechnet auf die Endkonzentration wurden dann 0,1 mM je dNTP, 1x Taq Puffer, 1mM Mg Cl_2 , 2,5 U Taq Polymerase, 25 pmol IFN- γ - Antisenseprimer, 25 pmol IFN- γ - Senseprimer, 25 pm β -Actin – Antisenseprimer und 25 pm β -

Actin – Senseprimer hinzupipettiert, sodass sich durch Auffüllung mit DEPC-behandeltem Wasser ein Endvolumen von 50 µl ergab. Danach schloss sich die cDNA Amplifizierung an:

PCR-Protokoll:

1 min 95°C Denaturierung der DNA-Stränge

1 min 55°C Annealing-Temperatur

1 min 72°C Polymerase-Reaktion

Es wurden 30 Zyklen gefahren.

3.7.5 Agarose Gel-Elektrophorese

Materialien:

Pipettenspitzen verschiedener Volumina (Eppendorf), Autopipette (Eppendorf: Reference), 1,5 ml Microtubes (Eppendorf), 100 ml Becherglas (Schott), Analysenwaage (Kern: 770), Microwelle (Electrolux), Spatel, Glasstab, Gelschale, 12-zählige Elektrophorese-Taschenkäme, Elektrophorese-Kammer, Stromgeber (11,5 x 14 cm; Biometra), Ethidiumbromid-Färbekammer (Schott), UV-Schirm mit UV-Kamera (Polaroid: MP4+ instant camera system), Fotofilm (Polaroid).

Medien:

Agarose (Gibco), 10x TAE-Puffer (Serva), DNA-Ladungspuffer: 14% Ficoll-Lösung (Dulbecco), 1 % SDS (Serva), 50mM EDTA (Serva), 0,4% Bromphenolblau (Sigma), Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml; Sigma).

Die Auswertung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung von je 10 µl des Reaktionsproduktes der PCR auf einem 1,5 %igen Agarose-TAE-Gel. Das Gel wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, auf ca. 60°C abgekühlt und in die Gelschale gegossen. Anschließend wurde der Taschenkamm eingesetzt. Nach

dem Erstarren des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Es wurde so viel Puffer hinzugefügt bis das Gel komplett bedeckt war. Die PCR-Ansätze wurden mit 2 μ l des Ladungspuffers gemischt und luftfrei in die Taschen des Agarose Gels geladen. Nach einer Laufzeit von etwa 30 Minuten bei 80 Volt wurde das Gel entnommen und für 15 Minuten in die Ethidiumbromid-Lösung gelegt. Das Gel wurde daraufhin unter ultravioletter Beleuchtung fotografiert. Die Übereinstimmung der Molekülgröße des tatsächlich amplifizierten cDNA-Fragmentes mit dem für das Primerpaar erwarteten Wert wurde mit einer 100 Basenpaar-DNA-Leiter kontrolliert.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IFN- γ - und IL-4-Expression in CD8+ und CD4+ Lymphozyten Populationen

Untersucht wurden während der gesamten Studie IFN- γ - und IL-4-produzierende T-Lymphozyten. Von den gegateten 10.000 Zellen eines jeden Ansatzes wurden aus den Dot-Plot Diagrammen die Zellen der oberen Quadranten (d.h. die CD4+/CD8+ Zellen) ausgezählt und daraus folgender Quotient gebildet: Anzahl der Zellen im oberen rechten Quadranten (doppelt positiv für die Marker CD4+ bzw. CD8+ und IFN- γ bzw. IL-4) geteilt durch die Summe aller Zellen in den beiden oberen Quadranten. Somit wurde der Anteil der Zytokin produzierenden Zellen (IFN- γ bzw. IL-4) an der jeweiligen T-Lymphozyten-Population (CD4+ bzw. CD8+) in jedem Ansatz getrennt bestimmt. Beispielhaft für die so erzielten Daten sind in Abbildung 2 die vier Dot Plot – Diagramme einer CD8/IFN- γ Messung eines Morbus Crohn –Patienten dargestellt. Hier zeigte sich in der PBMC Monokultur eine Rate IFN- γ produzierender CD8+ Lymphozyten von 3,1 %. Diese wurde durch Pokeweed-Stimulation auf einen Betrag von 63 %, durch die Transwell Kokultur mit Epithelzellen auf 15,3 % und durch die direkte Kontaktkokultur mit Epithelzellen auf 44,3 % gesteigert.

Nach 24-stündiger direkter Koinkubation mit Caco-2-Zellen wurde, bei einem Verhältnis Caco-2 Zellen zu Lymphozyten von 1:10, eine deutlich signifikante Zunahme IFN- γ -produzierender CD8+ Zellen festgestellt. (21,7% + 6,95/-11,15 gegenüber 13,4% +10,8/-11,3; p=0,0001, n=37; direkte Kontaktkokultur gegenüber Kontrolle, Median +/- Interquartilsabstand = IQR)(Abbildung 3). Demgegenüber zeigte sich eine leichtgradige, nicht signifikante Abnahme IL-4 produzierender CD8+ Zellen (3,3 % +2,95/-1,25 gegenüber 2,7 % +2,65/-0,8; p>0,05, n=37; Kontrolle gegenüber direkter Kontaktkokultur, Median +/- IQR) (Abbildung 4).

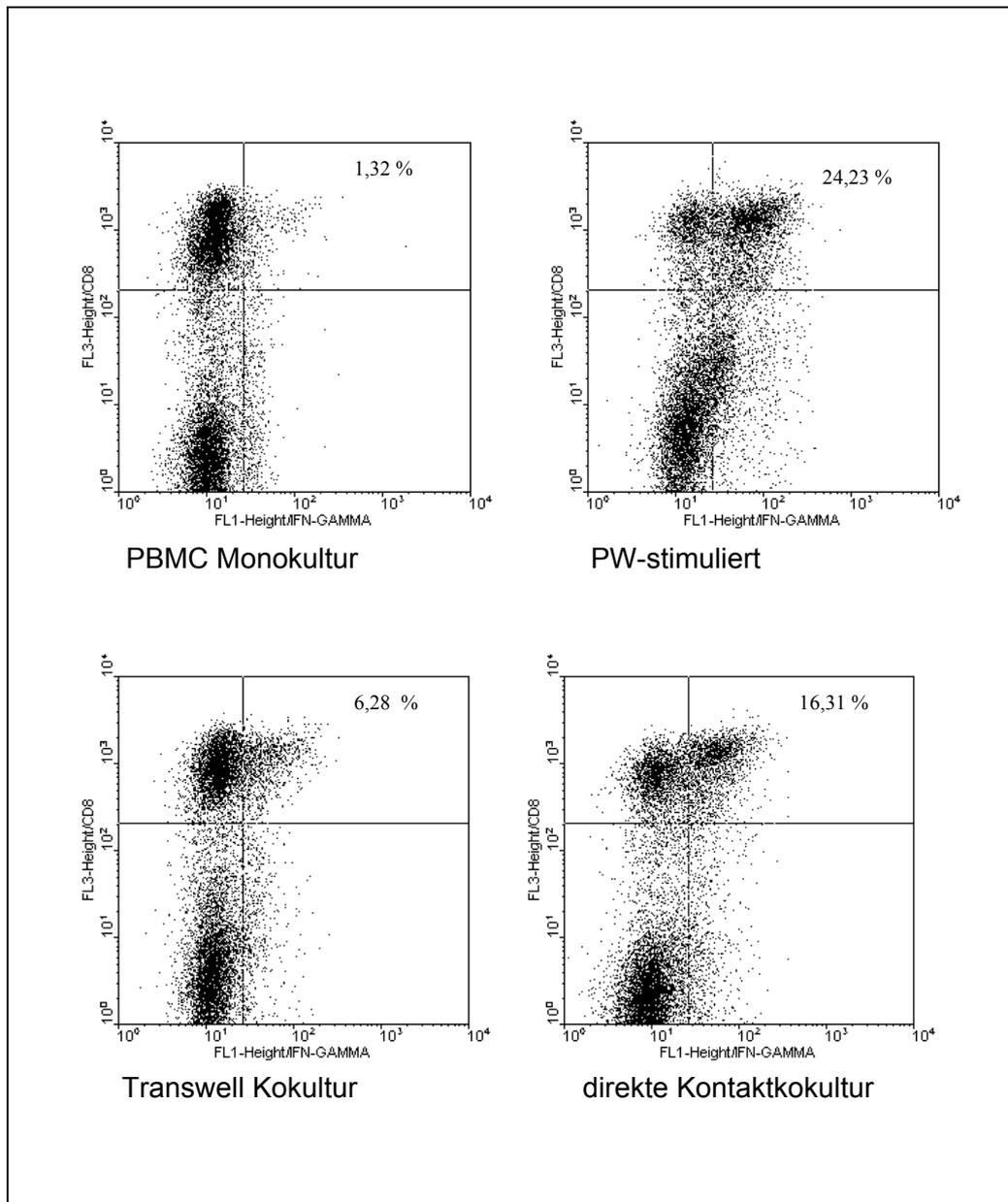


Abbildung 2: Dot Plot Diagramme aus flowzytometrischer Analyse der Marker CD8/ IFN- γ von Lymphozyten eines Morbus Crohn Patienten. Die Werte im oberen rechten Quadranten geben den Anteil der CD8+/IFN- γ + Zellen an der Gesamtzahl der (CD8+) gegateten Lymphozyten in den oberen Quadranten wieder.

Bei der Koinkubation von Caco-2-Zellen und Lymphozyten unter Einsatz eines Transwells konnte ebenso ein Anstieg, jedoch geringeren Ausmaßes, hinsichtlich IFN- γ produzierender CD8+ Zellen beobachtet werden. (15,65% +12,15/-11,85 gegenüber 13,4% +10,8/-11,3; $p=0,007$, $n=37$; Transwell-Kokultur gegenüber Kontrolle, Median +/- IQR) (Abbildung 5). Eine Abnahme IL-4 produzierender CD8+ Lymphozyten zeigte sich in der Kokultur unter Einsatz eines Transwells nicht.

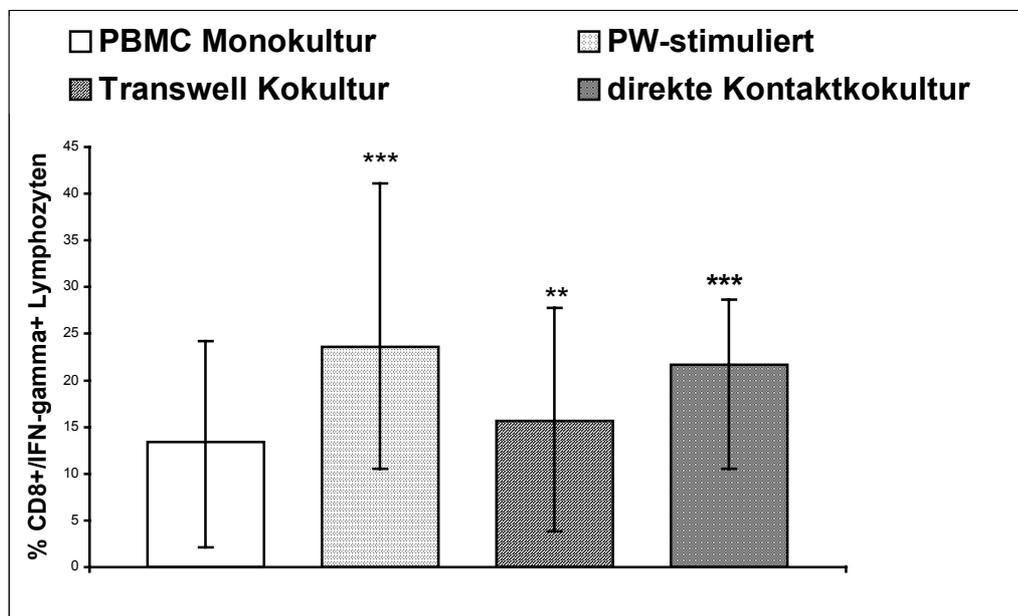


Abbildung 3: Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IFN- γ - Produktion

(Anteil CD8+/IFN- γ + Lymphozyten an allen CD8+Lymphozyten in %; Mediane \pm 1./3. Quartil; $n=37$). Gezeigt wird ein Anstieg IFN- γ produzierender CD8+ Lymphozyten von 13,4% in der PBMC-Monokultur auf 15,65% in der Transwell-Kokultur ($P=0,007$) und auf 21,7% in der direkten Kontaktkokultur ($P=0,0001$).

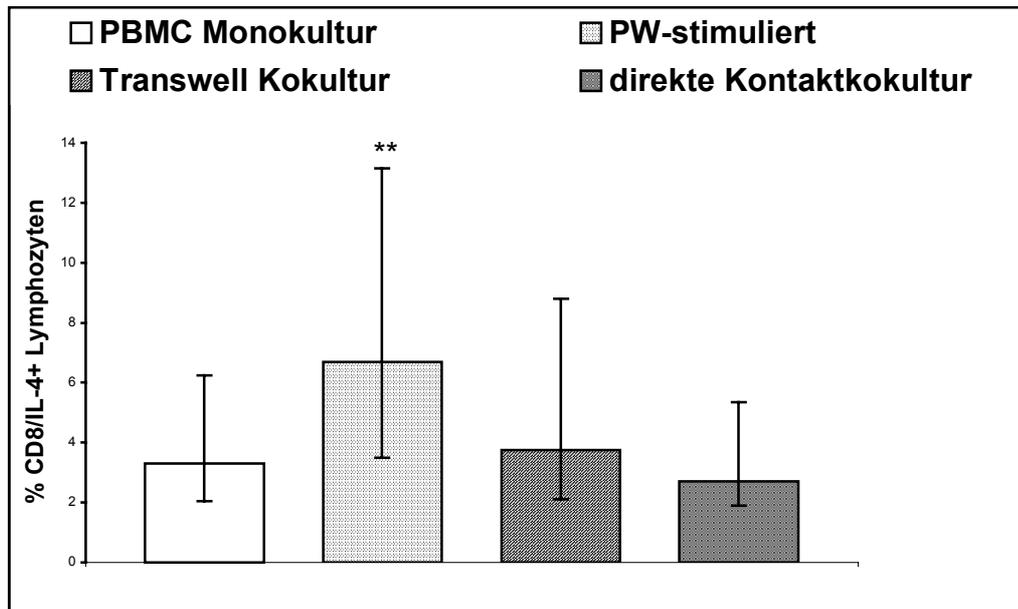


Abbildung 4: Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IL-4 - Produktion

(Anteil CD8+/IL-4+Lymphozyten an allen CD8+Lymphozyten in %; Mediane \pm 1./3. Quartil; n=37). Einer basalen IFN- γ Produktionsrate von 3,3 % in der PBMC Monokultur steht ein Anteil von 3,75 % in der Transwell Kokultur ($P>0,05$) und von 2,7 % in der direkten Kontaktkokultur ($P>0,05$) gegenüber.

Bezüglich der CD4+ Lymphozyten konnte weder ein fördernder noch ein hemmender Effekt der Kokultur mit Caco-2 Zellen auf die Zytokinproduktion von IFN- γ bzw. IL-4 festgestellt werden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur PBMC Monokultur konnten hier weder nach indirekter noch nach direkter (Kontakt-) Kokultur mit Epithelzellen festgestellt werden. (Abbildungen 5 und 6). Die bisher genannten Signifikanzniveaus wurden mithilfe des Wilcoxon-Testverfahrens ermittelt.

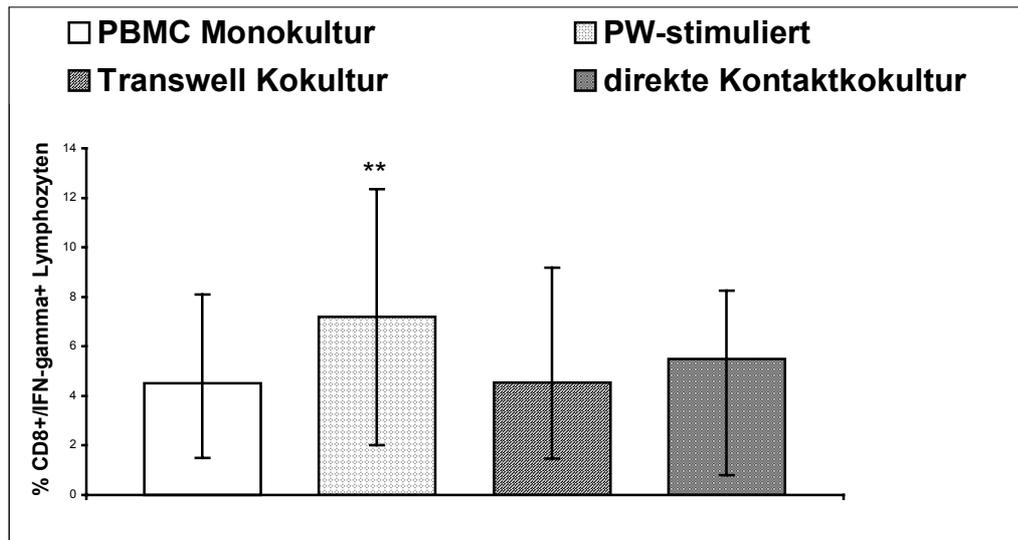


Abbildung 5: Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IFN- γ - Produktion

(Anteil CD4+/IFN- γ +Lymphozyten an allen CD8+Lymphozyten in %; Mediane \pm 1./3. Quartil; n=37). Eine signifikante Änderung der IFN- γ Produktionsrate CD4+ Lymphozyten zeigt sich weder nach Transwell Kokultur noch nach direkter Kontaktkokultur mit Epithelzellen im Vergleich zur PBMC Monokultur.

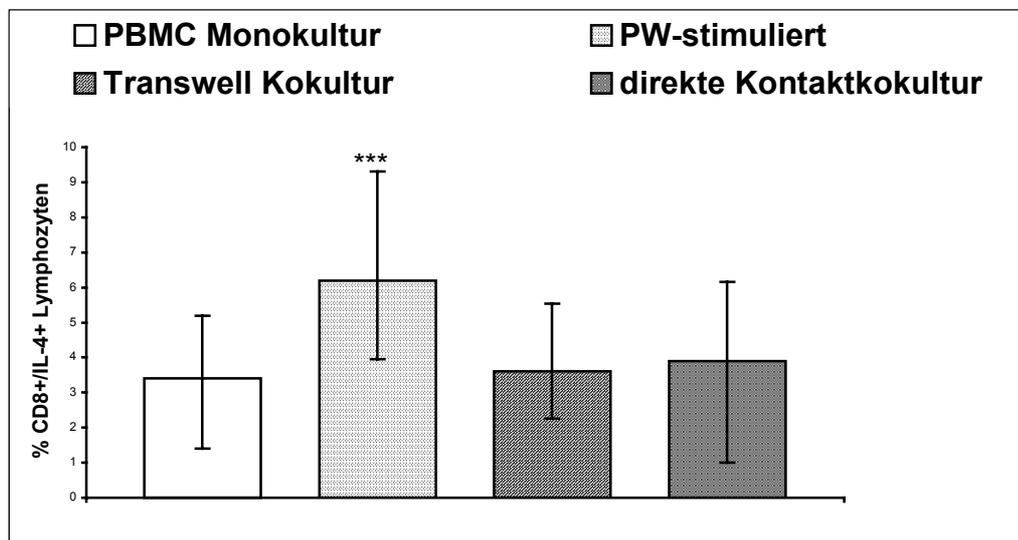


Abbildung 6: Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IL-4 - Produktion

(Anteil CD4+/IL-4+Lymphozyten an allen CD8+Lymphozyten in %; Mediane \pm 1./3. Quartil; n=37). Eine signifikante Änderung der IL-4 Produktionsrate CD4+ Lymphozyten lag im Vergleich zur PBMC Monokultur weder nach Transwell Kokultur noch nach direkter Kontaktkokultur mit Epithelzellen vor.

4.2 Zytotoxische T-Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen im Gegensatz zu denen von gesunden Kontrollen eine starke Induzierbarkeit für IFN- γ nach Kokultur mit intestinalen Epithelzellen

Wurde eine differenzierte Betrachtung der Zytokinproduktion der T-Lymphozyten von gesunden Kontrollen und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt, so zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der basalen IFN- γ -Expression und des Anstiegs der IFN- γ -Expression nach 24-stündiger Koinkubation mit Caco-2-Zellen. Der basale Anteil von CD8⁺ Lymphozyten mit intrazellulärer Expression von IFN- γ war bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen tendenziell größer (16,15% +11,05/-15,55; Median +/- IQR, Anteil CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen bei Morbus Crohn und 13,4% +12,3/-11,4; Median +/- IQR, Anteil CD8⁺/IFN- γ ⁺ Zellen bei Colitis ulcerosa gegenüber 10,35% +10,25/-5,22; Median +/- IQR, Anteil CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen bei gesunden Kontrollen, $p > 0,05$; Bestimmung der Signifikanz durch das Mann-Whitney-U Testverfahren).

Die intrazelluläre IFN- γ Produktion in CD8⁺ Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde durch Koinkubation mit intestinalen Epithelzellen um ein erhebliches mehr induziert als dies bei Lymphozyten von gesunden Kontrollen der Fall war. Bei Morbus Crohn Patienten wurde ein Anstieg der IFN- γ Expression von 16,15% in der Monokultur auf 18,45% +8,38/-16,8; Median +/- IQR in der Transwell Kokultur ($p > 0,05$) und einen weiteren Anstieg bis auf 24,35% +18/-23,62; Median +/- IQR in der direkten Kontaktkokultur ($p = 0,012$) beobachtet. Colitis ulcerosa Patienten demonstrierten eine ähnlich starke IFN- γ Induzierbarkeit von 13,4% in der Monokultur auf 19,1% +11,5/-15,3; Median +/- IQR in der Transwell Kokultur ($p = 0,015$) und 24,1% +6/-9,7; Median +/- IQR in der direkten Kontaktkokultur ($p = 0,006$) (Abbildung 7). Die zuletzt genannten Signifikanzniveaus wurden erneut mithilfe des Wilcoxon Testverfahrens bestimmt.

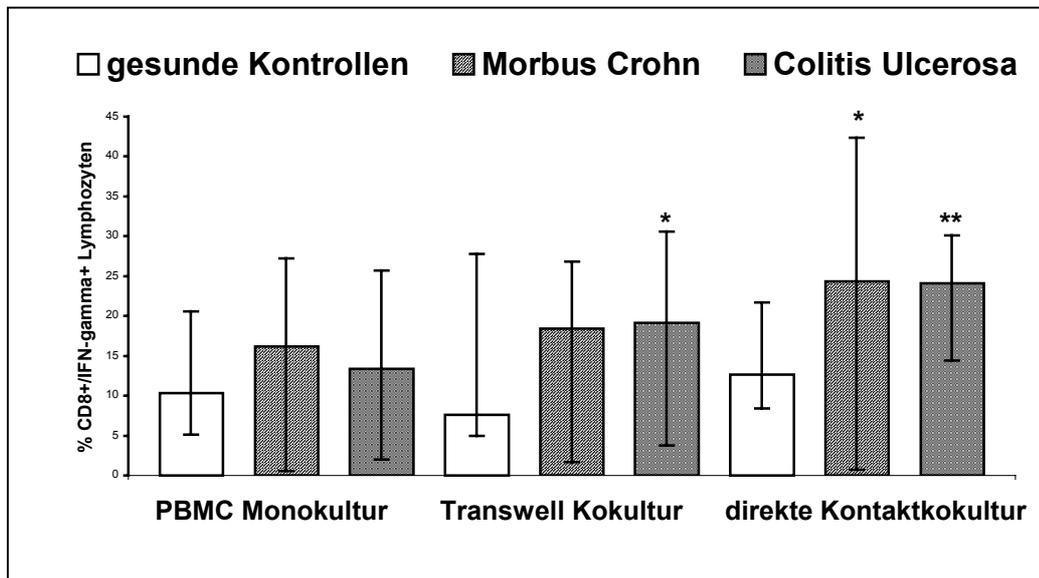


Abbildung 7: Einfluss intestinaler Epithelzellen auf die intrazelluläre IFN- γ - Produktion

(Anteil CD8+/IFN- γ +Lymphozyten an allen CD8+Lymphozyten in %; Mediane \pm 1./3. Quartil). Im Gegensatz zu gesunden Kontrollen weisen zytotoxische Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine starke Induzierbarkeit bezüglich IFN- γ durch den epithelialen Stimulus auf. Gezeigt wird ein Anstieg IFN- γ -produzierender CD8+ Lymphozyten von Morbus Crohn-Patienten von 16,15% in der Monokultur auf 18,45% in der Transwell Kokultur und auf 24,35% in der direkten Kontaktkokultur mit Caco-2-Epithelzellen (P=0,012); des weiteren ein Anstieg IFN- γ -produzierender CD8+ Lymphozyten von Colitis ulcerosa-Patienten von 13,4% in der Monokultur auf 19,1% in der Transwell Kokultur (P=0,015) und 24,1% in der direkten Kontaktkokultur mit Caco-2-Epithelzellen (P=0,006).

4.3 Die durch den epithelialen Stimulus vermittelte IFN- γ Induktion in peripheren zytotoxischen Lymphozyten verläuft unabhängig von Monozyten

Um einen etwaigen Einfluss von ebenfalls in der PBMC Fraktion des Blutes enthaltenen Monozyten auf die interzellulären Wechselwirkungen von Epithelzellen und Lymphozyten auszuschließen, wurden in einem Zusatzversuch Monozyten vor der Kokultur mit Caco-2 Zellen aus den PBMCs depletiert. Die daraus erzielten Ergebnisse zeigen, dass Monozyten keinen Einfluss auf die in 4.1 und 4.2 dargestellten Ergebnisse haben. Der Anteil IFN- γ produzierender CD8⁺ Zellen stieg von 7,02% in der Monokultur auf 11,55% in der Transwell-Kokultur und 13,21% in der direkten Kontaktkokultur. Die Kontamination mit Monozyten war kleiner als 5%.

Ebenfalls die Zugabe von neutralisierenden anti-IL-12 (p40/p70) Antikörpern zu Beginn der 24-stündigen Kokultur (mit verschiedenen Konzentrationen von 10ng/ml bis 1000ng/ml) ergab keinen Einfluss auf die IFN- γ Induktion in zytotoxischen Lymphozyten. In diesem Zusatzversuch, in dem ebenfalls nahezu eine Verdopplung des IFN-produzierenden Anteils CD8⁺ Zellen verzeichnet werden konnte, führte die Zugabe von neutralisierenden IL-12 Antikörpern in Konzentrationen von 10 ng/ml bis 1000 ng/ml zu keiner quantitativen Abnahme der IFN- γ +/CD8⁺ Zellen. Dementsprechend lässt sich schließen, dass die IFN- γ Induktion in zytotoxischen Lymphozyten auf einem von IL-12 unabhängigen Mechanismus basiert.

4.4 Die Blockierung MHC I-Molekül gebundener Transduktionsvorgänge durch anti MHC I Antikörper vermindert die IFN- γ Induzierbarkeit durch intestinale Epithelzellen

Ergebnisse von Zusatzversuchen unter Zugabe von anti-MHC I Antikörpern (mouse IgG1, kappa, clone G46-2.6) lassen die Vermutung zu, dass die durch die Koinkubation von Lymphozyten und Epithelzellen angestoßene IFN- γ Produktion – zumindest teilweise - durch an MHC Klasse I - Moleküle gebundene Transduktionsvorgänge vermittelt wird. Nach 24-stündiger Inkubation wurde in den mit anti-MHC I Antikörpern versetzten Ansätzen der direkten Kontaktkultur eine intrazelluläre IFN- γ Expression beobachtet, die niedriger war als die basale IFN- γ Expression in den Monokultur-Ansätzen. In den Ansätzen ohne Zugabe von anti-MHC I-Antikörper wurden 25,6% IFN- γ + /CD8+ Lymphozyten in der direkten Kontaktkultur gegenüber 19,7% IFN γ + /CD8+ Lymphozyten in der Monokultur gemessen. Durch die Zugabe der anti-MHC I-Antikörper wurde das intrazelluläre IFN- γ Signal deutlich verringert (17,2% IFN- γ /CD8+ Lymphozyten, 16,3 % IFN- γ /CD8+ Lymphozyten und 18,2% IFN- γ /CD8+ Lymphozyten unter Zugabe von 1, 2,5 und 5 μ g/ml anti-MHC I-Antikörpern) (Abbildung 8).

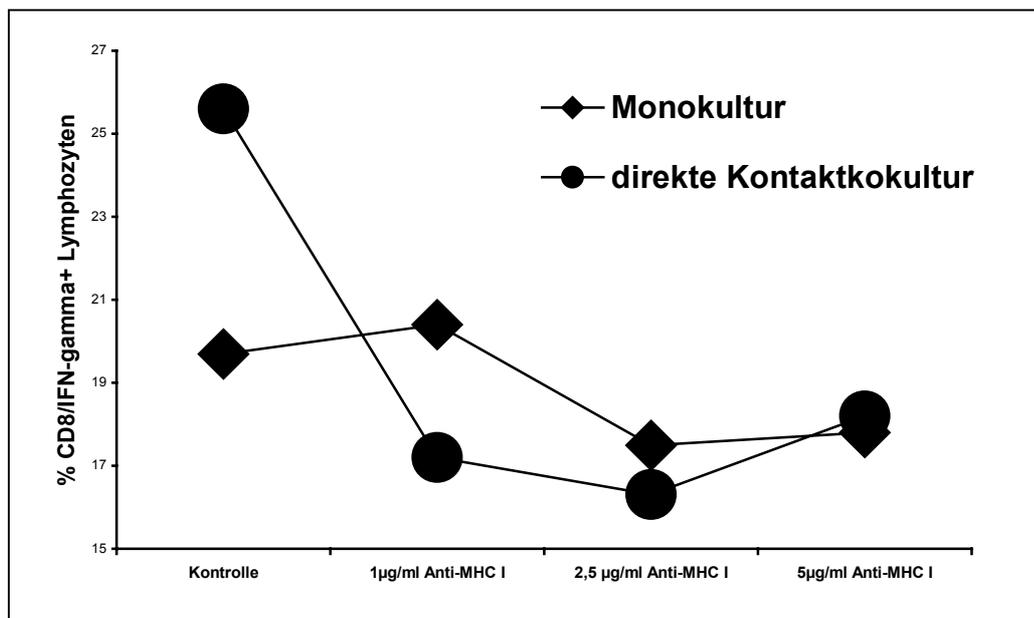


Abbildung 8: Interaktionen zwischen intestinalen Epithelzellen und CD8+ Lymphozyten werden durch MHC I-Oberflächenmoleküle vermittelt

(Anteil CD8+/IFN- γ +Lymphozyten an allen CD8+Lymphozyten in % in Abhängigkeit von ansteigenden Konzentrationen an anti-MHC I-Antikörpern). Gezeigt wird eine Absenkung des intrazellulären IFN- γ -Signals unter den Wert der basalen Expression von IFN- γ in der Monokultur durch Inkubation mit anti-MHC I Antikörpern.

4.5 Transkriptionelle Aktivierung von IFN- γ in der Epithelzell/Lymphozytenkultur

Ziel dieses Zusatzversuches war es, die auf Proteinebene demonstrierte Regulation von IFN- γ in Lymphozyten-Subpopulationen bei CED auch auf transkriptioneller Ebene durch das Verfahren der RT-PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese zu analysieren. Die Verteilung und Stärke der Banden innerhalb der Proben zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IFN- γ -Expression von Lymphozyten zwischen den untersuchten Untergruppen. Da eine Zunahme der IFN- γ - Expression der Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen somit auf transkriptioneller Ebene nicht nachgewiesen werden konnte, wurde das RT-PCR-Verfahren in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

5. Diskussion

Die in dieser Studie gewonnenen Daten zeigen - statistisch signifikant - dass intestinale Epithelzellen in Kokulturbedingungen mit Lymphozyten in der Lage sind, IFN- γ in deren CD8⁺ Subpopulation zu induzieren. Diesbezüglich verweise ich an dieser Stelle auf unsere kürzlich erschienene Arbeit (8).

Mit dem Einfluss von Epithelzellen auf T-Lymphozyten beschäftigten sich bereits eine Reihe von vorhergehenden Studien: So beobachteten Panja et al., dass Lamina propria T-Lymphozyten (LP T-Zellen) in Gegenwart von intestinalen Epithelzellen proliferieren (65). Auf der Suche nach dafür verantwortlichen Effektoren fanden sie, dass anti-CD 1d Antikörper die Proliferation der Lymphozyten, vor allem der CD8⁺ Zellen, in diesem gemischten allogenen Kokulturmodell zu inhibieren vermögen; was auf die mögliche Bedeutung des CD 1d – Liganden auf den Epithelzellen in diesem Zusammenhang hinweisen könnte (66). Diese Ergebnisse werden gestützt durch Arbeiten, die ebenfalls eine CD1-vermittelte Stimulation von T-Lymphozyten beschreiben (5, 6). Die Bedeutung dieses nicht-klassischen MHC I – Moleküls im Bezug auf Wechselwirkungen mit Lymphozyten wird unterstrichen durch die Induzierbarkeit desselben durch IFN- γ (19). Einen anderen Weg der Lymphozytenaktivierung im Kokulturmodell von Epithelzellen und Lymphozyten beschreiben Studien mit Focus auf die Aktivierung der CD8 – assoziierten Tyrosinkinase p56lck durch das 180 kD Membranprotein auf Epithelzellen, gp180 (104). Des weiteren gibt es Hinweise, die darauf hin deuten, dass eine Stimulation von Lymphozyten durch Epithelzellen von MHC II – Molekülen getragen wird. Bland und Warren konnten zeigen, dass Ia⁺ (MHC-Klasse II) tragende Epithelzellen, die sie aus dem Dünndarm von Ratten isoliert hatten, ein Protein-Antigen *in vitro* präsentieren und dadurch eine T-Zell-Proliferation induzieren können (9). Diese offensichtlich Klasse II-vermittelte Immunreaktion führte zu einer Antigen spezifischen Suppressions-Reaktion (10). Auch Hoang et al. arbeiteten mit einem gemischtem allogenen Kulturmodell, in dem sie eine Simulation von intraepithelialen Lymphozyten

durch Epithelzellen beobachten konnten, die mit dem Grad der Expression von MHC Klasse II – Molekülen auf den Epithelzellen korrelierte (32).

Unter den Kokulturbedingungen dieser Studie demonstrierten CD8+ Lymphozyten eine Induzierbarkeit für IFN- γ in Anwesenheit von Darmepithelzellen, die in direkter Kontaktkokultur stärker ausgeprägt war als in indirekter Kokultur unter Einsatz eines Transwell-Filters. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass die epitheliale Stimulation von CD8+ Lymphozyten, die sich in einer erhöhten Expression von IFN- γ äußert, größtenteils durch direkte Zell-Zell-Interaktionen in Form von Zellmembran-Antigenen vermittelt wird. Somit scheinen Wechselwirkungen dieser Art denen, die durch lösliche Faktoren getragen werden, überlegen zu sein, oder zumindest letztere in ihrem Effekt zu verstärken. Als möglicher Mechanismus mit stimulierendem Effekt auf CD8+ Lymphozyten wurde in dieser Arbeit der Signalweg über den MHC I-Komplex untersucht. Die Ergebnisse der Experimente unter Blockierung dieses Signalweges durch anti-MHC I-Antikörper, die eine mit der Konzentration der verwendeten Antikörper korrelierende Senkung der induzierbaren IFN- γ Expression besagen, sprechen für eine Beteiligung des MHC I Komplexes an der Induktion von IFN- γ durch Epithelzellen in CD8+ Lymphozyten.

Im Vergleich zwischen gesunden Kontrollen und CED-Patienten stellte sich in dieser Studie heraus, dass sowohl die basale IFN- γ -Produktion als auch die Induzierbarkeit von IFN- γ durch 24-stündige Kokultur mit Caco-2 Zellen in CD8+ Zellen von IBD Patienten - selbst im inaktiven Krankheitsstadium - erhöht ist. Der Anteil an IL-4 produzierenden CD8+ Lymphozyten war nach Kokultivierung mit Darmepithelzellen zwar vermindert, eine statistische Signifikanz für diesen Trend bestand jedoch nicht. Auf das Zytokin-Expressionsmuster von IL-4 und IFN- γ in CD4+ Zellen hatten die in dieser Studie gegebenen Kokulturbedingungen keine Auswirkungen. Demzufolge scheint die IFN- γ Expression in CD8+ Lymphozyten nicht nur eine physiologische Reaktion auf Kontakt mit Darmepithelzellen, sondern im Falle von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dabei auch pathologisch gesteigert und somit von pathogenetischer Relevanz zu sein. Von untergeordneter Bedeutung und ohne krankheitsspezifische Relevanz scheint die

suppressiv Wirkung der Darmepithelien auf die IL-4 Produktion in CD8+ Lymphozyten zu sein. Denkbar wäre auch, dass im Falle des Zusammentreffens von Lymphozyten und Darmepithelzellen sich allgemein das Gleichgewicht zwischen den Polaritäten der Immunantwort in Richtung eines Th/Tc-1 Geschehens mit dominierender Rolle des IFN- γ verschiebt.

In Betracht gezogen werden musste auch, dass in dieser Studie mit PBMCs und nicht mit komplett gereinigten Lymphozyten gearbeitet wurde und somit von Monozyten produziertes IL-12 als Stimulus für die IFN- γ -Induktion in Erwägung zu ziehen ist. Die stärkste und physiologisch vermutlich bedeutsamste Wirkung dieses Zytokins besteht nämlich darin, in NK- und T-Zellen die Produktion von einigen Zytokinen, insbesondere jedoch die von IFN- γ zu induzieren. (Einen Überblick über die diesbezügliche Literatur vermittelt 100). Da gezeigt werden konnte, dass IL-12 in den aus Darmgewebe von Morbus Crohn Patienten gewonnenen mononukleären Zellen vermehrt gebildet wird (56), war es somit denkbar, dass die stärkere Expression von IFN- γ in CD8+ Lymphozyten von CED-Patienten auf den Effekt des monozytären IL-12 zurückzuführen war. Dieser Effekt konnte jedoch durch Verwendung eines IL-12 Antikörpers in einem, sowie durch Depletion von Monozyten aus der PBMC-Population in einem weiteren Ergänzungsversuch andererseits ausgeschlossen werden: Weder die Abwesenheit von Monozyten noch die Neutralisierung des IL-12 hatten eine Auswirkung auf die beobachtete Stimulation von CD8+ Lymphozyten.

Ebenso jedoch, wie IL-12 in der Lage ist, IFN- γ zu induzieren, ist dieses auch in reziproker Weise der Fall; offensichtlich wirkt Letzteres wiederum verstärkend auf die IL-12 Produktion in Antigen präsentierenden Zellen (49). IL-12 vermag, neben der Fähigkeit weitere Zytokine in T- Lymphozyten und NK-Zellen zu induzieren, als Wachstumsfaktor für präaktivierte T-Lymphozyten und NK-Zellen und als die Zytotoxizität von CD8+ und NK-Zellen verstärkender Faktor zu fungieren (42, 57). Des Weiteren ist IL 12 an der Differenzierung vom Th1 – Phänotyp der Lymphozyten sowie zytotoxischen T-Lymphozyten beteiligt (27, 99). In diesem Zusammenhang mag die Bedeutung von IFN- γ in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen deutlich werden: Als

typischer Vertreter aus der Klasse proinflammatorischer Zytokine verfügt IFN- γ über eine Reihe von Wirkungen, die - wie bereits in der Einleitung beschrieben - sowohl eine Entzündungsreaktion in Gang zu setzen als auch zu unterhalten vermögen. Der Ausbau an Kapazitäten zur Antigenpräsentation, die Stimulation einer vornehmlich zellvermittelten Immunreaktion, die in erster Instanz von zytotoxischen T-Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen getragen wird, sowie Auswirkungen auf zellphysiologische Eigenschaften der Epithelzellen, impliziert, dass diese Reaktion in pathologisch gesteigerter Form eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa einnimmt. So wäre es denkbar, dass eine überschießende IFN- γ Produktion in den CD8⁺ T-Lymphozyten selbst, oder eine vermehrte Induktion von IFN- γ durch Faktoren weiter proximal einer Kaskade von Zytokinen – beispielsweise durch eine erhöhte Expression von IFN-gamma-inducing factor (IGIF = IL 18) in intestinalen Epithelzellen (43, 96) - dazu führt, dass dieses IFN- γ durch eine Aktivierung mononukleärer Zellen – insbesondere von CD8⁺ Zellen eine zytotoxische Reaktion gegen Darmepithelzellen induziert oder zumindestens mitbedingt. In diesem Szenario mag es dazu kommen, dass Darmepithelzellen zum Target für zytotoxische Lymphozyten werden. Dieses ist umso wahrscheinlicher, als dass im Falle einer Entzündung die Permeabilität der Darmmukosa, u.a. durch IFN- γ vermittelt, durch Lockerung der tight junctions erhöht ist und somit eine Durchwanderung des Epithels mit direkten Zellkontakten zwischen Enterozyten und Lymphozyten ermöglicht wird. Dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere bei Morbus Crohn, die Darmschleimhaut, auch bei Abwesenheit von morphologischen, endoskopischen oder klinischen Symptomen einer Entzündung diffus von Immunzellen, einschließlich T-Lymphozyten, durchsetzt sein kann, verdeutlichen Ergebnisse aus dem Vergleich von Histologien aus der Magenschleimhaut von Morbus Crohn Patienten mit der von Gesunden (62).

Die Tatsache, dass unter den Bedingungen dieser Studie nur CD8⁺ Lymphozyten eine Stimulation hinsichtlich vermehrter IFN- γ Produktion erfuhren und bei CD4⁺ Lymphozyten keine signifikante Änderung des Zytokinprofils gemessen werden konnte, scheint im Widerspruch zu Ergebnissen

vorangehender Studien zu stehen. So beschreiben Mayer und Eisenhardt, wie in ihrem allogenen Kokulturmodell Enterozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Gegensatz zu denen von Gesunden nicht in der Lage sind, CD8⁺ T-Suppressorzellen zu stimulieren, sondern CD4⁺ Lymphozyten mit ausgeprägter T – Helfer Aktivität aktivieren (52). Als Korrelat dieser verminderten Aktivierung von T-Suppressorzellen könnte laut Toy et al. eine defekte Expression von gp180 auf intestinalen Epithelzellen von CED-Patienten stehen (98). Im Gegensatz zu dieser Studie wurde in jenen Arbeiten jedoch nicht auf die Expression von Zytokinen eingegangen. Auf der anderen Seite konnten Mayer und Shlien zeigen, dass frisch isolierte Ia⁺ Darmepithelzellen selektiv Lymphozyten vom Suppressor/Zytotoxischen Phänotyp stimulieren (53). Diese durch einen Komplex von CD1d und gp180 auf intestinalen Epithelzellen hervorgerufene Stimulation einer Subpopulation von CD8⁺ Zellen scheint sich funktionell von einer durch klassische Klasse I – Moleküle hervorgerufenen Aktivierung zu unterscheiden (14). Dass es sich bei den Zytokin-produzierenden Zellen in der Darmwand in erster Linie um CD8⁺ Zellen handelt, fanden auch Taguchi et al. heraus. Allerdings wird in ihrer Arbeit ein Anstieg sowohl von IFN- γ - als auch IL-5 - produzierenden Zellen nach Stimulation durch Con A beschrieben (94).

Zytotoxisches Verhalten von peripheren Lymphozyten gegenüber menschlichen fetalen Kolonzellen konnte bereits durch eine in-vitro- Studie von Broberger und Perlmann gezeigt werden (70). Da es sich gezeigt hat, dass zytotoxische CD8⁺ Lymphozyten in größerer Anzahl im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorkommen (58) und intestinale intraepitheliale Lymphozyten vornehmlich vom CD8⁺ CD28⁻ Phänotyp sind (4), ist es denkbar, dass durch Zell-Zell-Kontakte mit Darmepithelzellen eine vermehrte Induktion von IFN- γ produzierenden CD8⁺ Lymphozyten stattfindet, welche sich für die permanente entzündliche Aktivität in der Darmmukosa verantwortlich zeigen. Dass in den iIELs vom CD8⁺ CD28⁻ Phänotyp unter anderem erhöhte Level an IFN- γ zu messen sind demonstrierten Arosa et al. ebenfalls in ihrer Studie (4). Die Tatsache, dass die von uns auf Proteinebene ermittelten signifikanten Unterschiede mit Hilfe der RT-PCR nicht

nachzuvollziehen waren, ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung von IFN- γ nicht einer transkriptionellen Regulation unterliegt. Daneben sind jedoch auch technische Probleme als Ursache zu diskutieren. Da die Proteinergebnisse eine eindeutige Aussage lieferten und IFN- γ als Protein das funktionell wirksame Zytokin darstellt, wurde dieser Ansatz in unserer Studie nicht weiterverfolgt. Als sensitiveres Verfahren hätte zur Detektion kleiner Unterschiede in der Zytokinexpression, die mit der RT-PCR nicht darstellbar waren, eher mit der REAL-time PCR gearbeitet werden müssen.

6. Zusammenfassung

Die in dieser Studie gewonnenen Daten belegen eine wechselseitige Einflussnahme von Darmepithelien und Lymphozyten, die eine Änderung des Zytokinprofils der Lymphozyten bewirkt. Die Wechselwirkungen zwischen Darmepithelien und Lymphozyten bestehen in einer erhöhten IFN- γ -Induktionskapazität in CD8⁺ Lymphozyten. Spiegelbildlich dazu besteht eine leichtgradige Abnahme der IL-4 Produktion in CD8⁺ Lymphozyten nach Kokultivierung mit Darmepithelzellen. Als klassische Vertreter von Zytokinen von Th/Tc1- bzw. Th/Tc2- Zellen getragenen Reaktionen kann diese Tatsache als Hinweis auf eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen T1/T2-Phänotypen in Richtung einer T1-Reaktion gewertet werden.

Das Phänomen der IFN- γ Induzierbarkeit in CD8⁺ Lymphozyten durch Kokultur mit Darmepithelien ist signifikant ausgeprägter bei Lymphozyten von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ein Unterschied zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten hinsichtlich der Zytokinprofile ihrer Lymphozyten als Antwort auf einen epithelialen Stimulus konnte nicht festgestellt werden. Ebenso bestand kein signifikanter Effekt der Epithelzell/ Lymphozyten-Kokultur auf die Zytokinproduktion von CD4⁺ Lymphozyten.

Die Induktion von IFN- γ scheint sowohl über lösliche Mediatoren als auch durch direkten Zell-Zell Kontakt vermittelt zu sein. Bei letzterem dürften insbesondere Oberflächenmoleküle der MHC I Klasse eine wesentliche Rolle spielen. Die Anregung von Lymphozyten zur IFN- γ Produktion verläuft dabei unabhängig von einer monozytären IL-12 Produktion.

Diese erhobenen Daten sprechen dafür, dass die IFN- γ -Induktion in CD8⁺ Lymphozyten durch Darmepithelzellen einen wichtigen Mechanismus für die Initiierung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen darstellen könnte.

7. Literaturverzeichnis

1. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123(3):679-88
2. Ahmad T, Satsangi J, Mc Govern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(6):731-48
3. Anzano MA, Riemann D, Priecheff W, Bowen-Pope DF, Greig R. Growth factor production by human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1989;49:2898-904
4. Arosa FA, Irwin C, Mayer L, De Sousa M, Posnett, DN. Interactions between peripheral blood CD8 T-lymphocytes and intestinal epithelial cells (iEC). *Clin Exp Immunol* 1998;112:226-36
5. Balk SP, Ebert EC, Blumenthal RL, Mc Dermott FV, Wucherpfennig KW, Landau SB, Blumberg RS. Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Sci* 1991;253:1411-5
6. Behar SM, Porcelli SA, Beckmann EM, Brenner MB. A pathway of costimulation that prevents anergy in CD28- T cells: B7-independent costimulation of CD1-restricted T cells. *J Exp Med* 1995;182:2007-18
7. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index: national cooperative Crohn's disease study. *Gastroenterology* 1976;70:439-44
8. Bisping G, Lügering N, Lütke Brintrup S, Pauels H.-G., Schürmann G, Domschke W, Kucharzik T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN- γ) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:15-22

9. Bland PW, Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology* 1986;58:1-7
10. Bland PW, Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology* 1986; 58:9-14
11. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta cells. *Science* 1994;266:1253-5
12. Brandtzaeg P, Haraldsen G, Rugtveit J. Immunopathology of human inflammatory bowel disease. Springer Semin Immunopathol 1997;18:555-89
13. Bustin SA. Absolute Quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:169-93
14. Campbell NA, Mayer L. Intestinal epithelial cells (IECs) target a subpopulation of CD8+ T cells which are pre-committed to have a suppressor phenotype. *Gastroenterology* 1999;116:A:G2948
15. Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan JC, Kahn A. Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain-reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur J Biochem* 1990;187:691-6
16. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9
17. Christ AD, Blumberg RS. The intestinal epithelial cell: immunological aspects. Springer Semin Immunopathol 1997; 18:449-61
18. Christ AD, Colgan SP, Balk SP, Blumenberg RS. Human intestinal epithelial cell lines produce factor(s) that inhibit CD3-mediated T-lymphocyte proliferation. *Immunology Letters* 58 1997;159-65
19. Colgan SP, Morales VM, Madara JL, Polischuk JE, Balk SP, Blumberg RS. IFN-gamma modulates CD1d surface expression on intestinal epithelia. *Am J Physiol* 1996; 271:C276-83

20. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammation bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 867-874
21. Dayton ET, Matsumoto-Kobayashi M, Perussia B, Trinchieri G. Role of immune interferon in monocytic differentiation of human promyelocytic cell lines induced by leukocyte conditioned medium. *Blood* 1985;66:583-94
22. Deem RL, Shanahan F, Targan SR. Triggered mucosal T cells release tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma which kill human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1991;83:79-84
23. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350-8
24. Elson CO. *Mucosal Immunology* (Academic Press; 2nd edition). 1999
25. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205
26. Fish SM, Proujanski R, Reenstra WW. Synergistic effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut* 1999;45:191-8
27. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* 1992;143:127-42
28. Griga T, Hebler U, Voigt E, Tromm A, May B. Interleukin-4 inhibits the increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with intestinal bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1604-7
29. Hogaboam CM, Vallence BA, Kumar A, Addison CL, Graham FL, Gauldie J, Collins SM. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1997;100:2766-76

30. Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, Wei SH, Aranda R, Cheroutre H, Fowell DJ, Binder S, Tsao B, Locksley RM, Moore KW, Kronenberg M. Altered Immune Responses in Interleukin 10 Transgenic Mice. *J Exp Med* 1997;185:2101-2110
31. Hirsch T, Eggstein S, Frank S, Farthmann, EH, v Specht B-U. Expression of GM-CSF and functional GM-CSF receptor in the human colon carcinoma cell line SW403. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217:138-43
32. Hoang P, Crotty B, Dalton HR, Jewell DP. Epithelial cells bearing class II molecules stimulate allogenic human colonic intraepithelial lymphocytes. *Gut* 1992;33:1089-93
33. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
34. Iijima H, Takahashi I, Kishi D, Kim Jk, Kawano S, Hori M, Kiyono H. Alteration of Interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice. *J Exp Med* 1999;190:6007-15
35. James SP, Fiocchi C, Graeff AS, Strober W. Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology* 1986;91:1483-9
36. Joseph NE, Fiocchi C, Levine AD. Crohn's disease and ulcerative colitis mucosal T cells are stimulated by intestinal epithelial cells: Implications for immunosuppressive therapy. *Surgery* 1997;122:809-16
37. Jumarie C and Malo C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 1991;149:24-33

38. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55-65
39. Kagnoff MF. Mucosal immunology: new frontiers. *Immunol Today* 1996; 17:57-9
40. Kaoutzani P, Colgan SP, Cepek KL, Burkhard PG, Carlson S, Delp-Archer C, Brenner MB, Madara JL. Reconstitution of cultured intestinal epithelial monolayers with a mucosal-derived T lymphocyte cell line. Modulation of epithelial phenotype dependent on lymphocyte-basolateral membrane apposition. *J. Clin Invest* 1994;94:788-96
41. Kawasaki ES (1991) Amplification of RNA. In *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White Tj.(ed.) (Academic Press, Inc., San Diego) pp.21-27
42. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827-45
43. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effects independently of IL-12. *J Immunol* 1997;158:1541-50
44. Kucharzik T, Luger N, Pauels HG, Domschke W, Stoll R. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1998;111:152-7
45. Kucharzik T, Luger N, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol* 1996;104:483-90

46. Lamprecht SA, Schwartz B, Glicksman A. Transforming growth factor-beta in intestinal epithelial differentiation and neoplasia (review). *Anticancer Res* 1989; 9:1877-81
47. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-857
48. Li Y, Yio XY, Mayer L. Human intestinal epithelial cell-induced CD8+ T cell activation is mediated through CD8 and activation of CD8-associated p56lck. *J Exp Med* 1995; 182:1079-88
49. Ma X, Chow JM, Cri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon γ in monocytic cells. *J Exp Med* 1996;183:147-57
50. MacDermott RP. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1996; 31:907-16
51. Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989;83:724-7
52. Mayer L, Eisenhardt D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1990;86:1255-1260
53. Mayer L, Shlien R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987; 166:1471-83
54. McKay DM, Croitoru K, Perdue MH. T-cell-monocyte interactions regulate epithelial physiology in a coculture model of inflammation. *Am J Physiol* 1996;270:C418-28
55. McKay DM, Singh PK. Superantigen Activation of Immune Cells Evokes Epithelial (T84) Transport and Barrier Abnormalities via IFN- γ and TNF- α . *J Immunol* 1997;159:2382-90
56. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco D, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's

- disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997; 112:1169-78
57. Monteleone G, Parello T, Luzzza F, Pallone F. Response of human intestinal lamina propria T lymphocytes to interleukin 12: additive effects of interleukin 15 and 7. *Gut* 1998;43:620-628
 58. Muller S, Lory J, Corazza N, Griffiths GM, Z'graggen K, Mazzuchelli L, Kappeler A, Mueller C. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 1998;152:261-8
 59. Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. *J Immunol* 2000;165:3620-5
 60. Noma Y, Sideras P, Naito T, Bergstedt-Linquist S, Azuma C, Severinson E, Tanabe T, Kinashi T, Matsuda F, Yaoita Y, et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature* 1986; 319:640-6
 61. O'Connell J, Bennett MW, Nally K, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Interferon-gamma sensitizes colonic epithelial cell lines to physiological and therapeutic inducers of colonocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2000; 185:331-8
 62. Oberhuber G, Püspök A, Oesterreicher C, Novacek G, Zauner C, Burghuber M, Vogelsang H, Pötzi R, Stolte M, Wrba F. Focally enhanced gastritis: a frequent type of gastritis in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;112:698-706
 63. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-8
 64. Pallone F, Fais S, Squarcia O, Biancone L, Pozzilli P, Boirivant M. Activation of peripheral blood and intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. In vivo state of activation and in vitro response to stimulation as defined by the expression of early activation antigens. *Gut* 1987;28:745-53

65. Panja A, Barone A, Mayer L. Stimulation of lamina propria lymphocytes by intestinal epithelial cells: evidence for recognition of non classical restriction elements. *J Exp. Med* 1994;179:943-50
66. Panja A, Blumberg RS, Balk SP, Mayer L. CD1d is involved in T cell – intestinal epithelial cell interactions: *J Exp Med* 1993;178:1115-9
67. Panja A, Goldberg S, Eckmann L, Krishen P, Mayer L. The Regulation and Functional Consequence of Proinflammatory Cytokine Binding on Human Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 1998;161:3675-84
68. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000;51:289-98
69. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859-70
70. Perlmann P, Broberger O. In vitro studies of ulcerative colitis. II. Cytotoxic action of white blood cells from patients on human fetal colon cells. *J Exp Med* 1963;117:717-733
71. Peterson MD, Mooseker MS. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2_{Bbe} clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Cell Science* 1992;102:581-600
72. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzane NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A Role for TNF- α and Mucosal T Helper-1 Cytokines in the Pathogenesis of Crohn's Disease. *J Immunol* 1997;159:6276-82
73. Prussin C. Cytokine flow cytometry: Understanding cytokine biology at the single cell level. *J Clin Immunol* 1997;17:195-203
74. Pullman WE, Elsbury S, Kobayashi M, Hapel AJ, Doe WF. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;102:529-37
75. Qiao L, Kozoni V, Tsioulis GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1258:215-23

76. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-amino-salicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis-a randomized trial. *BMJ* 1989;298:82-86
77. Raedler A, Fraenkel S, Klose G, Seyfarth K, Thiele HG. Involvement of the immune system in the pathogenesis of Crohn's disease. Expression of the T9 antigen on peripheral immunocytes correlates with the severity of the disease. *Gastroenterology* 1985;88:978-83
78. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 1995;108:40-50
79. Rigas B, Goldmann IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 1993;122:518-23
80. Röcken M, Racke M, Shevach EM. IL-4 induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunology Today*;17:225-30
81. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*;18:263-66
82. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods* 1992; 154:7-10
83. Santos LM, Lider O, Audette J, Khoury SJ, Weiner HL. Characterization of the immunomodulatory properties and accessory cell function of small intestine epithelial cells. *Cell Immunol* 1990;127:26-34
84. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994;106:533-9
85. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 5S-11S
86. Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994;35:696-700

87. Schreiber S, Heinig T, Panzer U, Reinking R, Bouchard A, Stahl PD, Raedler A. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:21-33
88. Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:451-502
89. Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation of inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunol* 1994; 81:85-91
90. Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann KH. Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease. *Gut* 1991;32:1192-7
91. Selby WS, Janossey G, Mason DY, Jewell DP. Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1983;53:614-8
92. Shirota K, LeDuy L, Yuan S, Jotha S. Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990;58:303-8
93. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN- γ and TGF- β responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol today* 1997;18:61-64
94. Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, Beagley KW, Eldridge JH, Takatsu K, Kiyono H. Analysis of Th1 and Th2 Cells In Murine Gut-Associated Tissues. Frequencies of CD4+ and CD8+ T Cells That Secrete IFN- γ and IL-5. *The Journal Of Immunology* 1990;145:68-77.
95. Takahashi I, Lijima H, Kishi D, Kiyono H. Oligoclonal Th2-biased betabeta T cells induce murine Inflammatory bowel disease. *Immunol Res* 1999;20:237-42

96. Takeuchi M, Nishizaki Y, Sano O, Ohta T, Ikeda M, Kurimoto M. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of IFN.gamma-inducing factor („Interleukin 18“) in mouse intestinal epithelial cells. *Cell & tissue Research* 1997;289:499-503
97. Tanaka T, Hu-Li J, Seder RA, Fazekas de St Groth B, Paul WE. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5914-8
98. Toy LS, Yio XY, Lin A, Honig S, Mayer L. Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease: *J Clin Invest* 1997; 100:2062-71
99. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of T_H1 cells. *Immunol Today* 1993;14:335-8
100. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-Helper cells type I and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994;84:4006-27
101. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative Colitis and Crohn's disease in unselected population of monozygotic and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-6
102. Vachon PH, Beaulieu JF. Transient Mosaic Patterns of Morphological and Functional Differentiation in the Caco-2 Cell Line. *Gastroenterology* 1992;103:414-23
103. Yamamoto M, Fujihashi K, Kawabata K, McGhee JR, Kiyono H. A mucosal intranet: Intestinal epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral T lymphocytes. *J immunol* 1998;160:2188-96
104. Yio XY, Mayer L. Characterization of a 180-kDa intestinal epithelial cell membrane glycoprotein, gp180. A candidate molecule mediating T cell-epithelial cell interactions. *J Biol Chem* 1997;272:12786-92

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Lütke Brintrup
Anschrift: Krawehlstraße 3
45130 Essen

Geburtsdatum: 18.7.1975
Geburtsort: Münster
Familienstand: ledig
Eltern: Hubert Lütke Brintrup, Landwirt
Mathilde Lütke Brintrup, geb. Berghaus, Hausfrau
Geschwister: 3 Brüder (34, 33 und 31 Jahre alt)
Konfession: RK

Schulbildung

1982-1986 Mariengrundschule Roxel
1986-1995 Gymnasium Paulinum, Münster (Abitur)

Studium

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der WWU Münster (1997:
Physikum, 1998: 1. Staatsexamen, 2000: 2. Staatsexamen,
2001: 3.Staatsexamen)

Beruf

2002-2003 Tätigkeit als Arzt im Praktikum, Kliniken Essen-Mitte,
Fachbereich Innere Medizin
seit 9/2003 Tätigkeit als Assistenzarzt, Kliniken Essen-Mitte,
Fachbereich Innere Medizin

Essen, den 25.4.2004