

Intrazelluläre Transportprozesse zur Pathogenese der Zöliakie in epithelialen Zelllinien des Darms

Der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Ina Fischer

geboren am 27.10.1975
in Lehrte

2007

Referent: Prof. Dr. H. Y. Naim
1. Koreferent: Prof. Dr. K. P. Zimmer
2. Koreferent: Prof. Dr. G. Auling

Tag der Promotion: 24. April 2007

*Das Leben hat keinen Sinn außer dem,
den wir ihm geben.*

Thornton Wilder

meinen Eltern

Johanna Aselmann

Zusammenfassung

Der Zöliakie liegt ein Versagen der oralen Toleranz gegenüber Getreideeiweißen zu Grunde. Der Prozess der oralen Toleranzinduktion dient der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts zwischen pathogenen und harmlosen Antigenen. Dennoch sind die verantwortlichen zellbiologischen Vorgänge, vor allem im Hinblick auf die Beteiligung von Enterozyten, nur unvollständig verstanden.

Die *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen im Zusammenhang mit vorangegangenen *ex vivo* Experimenten, dass die Enterozyten durchaus bei den intestinalen Immunreaktionen involviert sein können. So wurde hier dargelegt, dass HT29 die Proteine der HLA Klasse I und II exprimieren. HLA Klasse II-Moleküle sind nach Stimulation mit IFN- γ nachzuweisen, wobei die Expression durch weitere Inkubation mit Frazer's Fraction (Pepsin und Trypsin verdautes Gluten) ohne Einfluss bleibt. Dahingegen ist die Expression der HLA Klasse I-Moleküle nach Inkubation mit Frazer's Fraction signifikant erhöht. Zudem kann für Enterozyten die ungewöhnliche Lokalisation den HLA-Antigenen der Klasse I in den frühen Endosomen beobachtet werden. Die erhöhte Expression und Lokalisation im endosomalen Kompartiment zusammen mit toxischen Peptiden lässt den Rückschluss auf eine mögliche *Cross-Presentation* exogener Antigene durch HLA Klasse I-Antigene zu.

Nach der Internalisierung von Gliadinpeptiden werden einerseits zwei verschiedene Aufnahmemechanismen, zytosolisch bei RACE-Zellen und vesikulär bei normalen Enterozyten, beobachtet. Außerdem unterliegen toxische und nicht-toxische Peptide unterschiedlichen Transportprozessen. Während die nicht-toxischen Sequenzen bis in die späten Endosomen/Lysosomen gelangen, sind toxische Peptide dort in dem Ausmaß nicht nachweisbar. Die Konsequenz ist, dass das toxische Peptid sich zum einen der Degradation entzieht und zum anderen nicht mit HLA Klasse II-Komplexen assoziieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das toxische Peptid 31-49 an die B-Untereinheit des Cholera Toxins, ein effizientes mukosales Trägerprotein, gekoppelt. Hier konnte gezeigt werden, dass nach der Konjugation an CTB das Peptid 31-49 in das spätendosomale Kompartiment von HT29 gesteuert wird.

Weiterführende Experimente werden entscheiden, ob die gezielte Veränderung von Transportwegen innerhalb der Enterozyten und/oder deren Funktion als antigenpräsentierende Zelle für therapeutische Maßnahmen genutzt werden können.

Schlagwörter: Zöliakie, Gliadin, Enterozyten, orale Toleranz

Abstract

Celiac disease is an inflammatory disorder of the small intestine caused by an immune response to ingested gluten in genetically susceptible individuals. The physiological response to food antigens and commensal bacteria is the induction of a state of specific immunological unresponsiveness – oral tolerance. However, the cellular processes responsible for the oral tolerance induction and in particular the role of enterocytes in the pathogenesis of celiac disease have been poorly investigated.

In vitro studies from the present work together with previous experiments indicate a possible role for enterocytes in intestinal immune reactions. The objectives of this study are the analysis of endocytosis of different gliadin peptides in enterocytes, their intracellular distribution and the assessment of HLA class I and II expression. It could be shown that HT29 cells expressed both types of HLA-molecules. The expression of HLA class II molecules could be induced by IFN- γ , whereas the expression was not affected by additional incubation with Frazer's Fraction. On the contrary, HLA class I expression increased upon incubation with Frazer's Fraction. Moreover, it could be shown that HLA I proteins were localized to early endosomes in HT29 cells. The increased expression and co-localization with toxic peptides in endosomal compartments suggested a cross-presentation of exogenous antigens by HLA class I complexes.

Upon internalization of gliadin peptides we could distinguish between cytosolic or vesicular uptake of antigens. Furthermore, toxic and non-toxic peptides were observed on different routes during the intracellular transport. While non-toxic peptides have reached the late endosomes/lysosomes, toxic peptides were not detectable in this compartment. The consequence was that the toxic peptide avoided the complete degradation and additionally this peptide was unable to associate with HLA class II molecules. The latter is an important process for the induction of oral tolerance. In the present study we conjugated the toxic peptide 31-49 to the subunit B of Cholera Toxin (CTB), an efficient mucosal carrier protein. It could be shown that the toxic peptide together with CTB was found to be localizing to late endosomes in HT29 cells.

Further studies will reveal which consequences arise from the toxic peptides being translocated to MHC II containing late endosomes within enterocytes and/or function of enterocytes as antigen presenting cells for a possible therapeutical option.

Key words: celiac disease, gliadin, enterocytes, oral tolerance

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung	5
1.1	Zöliakie	5
1.1.1	Definition	5
1.1.2	Formen der Zöliakie und Epidemiologie	5
1.1.3	Pathogenese	8
1.1.4	Genetische Prädisposition der Zöliakie	10
1.1.5	Das Autoantigen der Zöliakie: die Transglutaminase	11
1.1.6	Getreidetaxonomie und Eigenschaften von Gluten	13
1.1.7	Synthetische Peptide	15
1.2	HLA-System	16
1.2.1	HLA Klasse I-Antigene	16
1.2.2	HLA Klasse II-Antigene	18
1.2.3	Funktion der HLA-Moleküle	19
1.3	Dünndarm und das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe	20
1.3.1	Aufbau der Schleimhaut	20
1.3.2	Das Epithel / Enterozyten	21
1.3.3	Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe	22
1.4	Endozytose	24
1.4.1	Formen der Endozytose	24
1.4.2	Der Endozytose-Pfadweg	25
1.4.3	Transzytose	27
1.5	Antigenprozessierung und -präsentierung	27
1.5.1	Antigenprozessierung im endozytotischen Pfadweg	28
1.5.2	Antigendegradierung durch das Proteasom	29
1.5.3	Antigenpräsentierung der HLA Klasse I	29
1.5.4	Antigenpräsentierung der HLA Klasse II	30

1.5.5	Cross-Presentation	30
1.5.6	Antigenpräsentierung durch Enterozyten	31
1.6	Orale Toleranz	32
1.6.1	Antigene	33
1.6.2	Mechanismus der oralen Toleranz	33
1.6.3	Antigenpräsentierung	35
1.6.4	Enterozyten	35
1.6.5	Cholera Toxin Untereinheit B	36
1.7	Fragestellung	36
2	Material und Methoden	38
2.1	Zellkultur	38
2.1.1	Verwendete Zelllinien	38
2.1.2	Pflege der Zellkultur	40
2.1.3	Internalisierung von Peptiden	41
2.1.4	Herstellung von Frazer's Fraction	41
2.1.5	Peptid-Konjugation	42
2.2	Radioaktive Markierung, Isolierung und biochemische Untersuchung von Proteinen	43
2.2.1	Radioaktive Markierung von Proteinen	43
2.2.2	Lyse der Zellen und Immunpräzipitation	43
2.2.3	Isolierung von subzellulären Strukturen und Dichtegradienten-Zentrifugation	45
2.2.4	Proteinbestimmung	46
2.2.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	47
2.2.6	Western Blot	48
2.3	Molekularbiologische Arbeiten I: DNA und RNA	50
2.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen und cDNA-Synthese	50
2.3.2	PCR: Isolierung der Transglutaminase und HLA-DR aus der cDNA	50
2.3.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	52

2.3.4	Präparativer Restriktionsverdau und Ligation	52
2.4	Molekularbiologische Arbeiten II: Bakterienkultur	54
2.4.1	Verwendeter Escherischia coli-Stamm	54
2.4.2	Verwendete Lösungen und Puffer	54
2.4.3	Transformation von Escherischia coli	54
2.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherischia coli	55
2.4.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	58
2.4.6	Restriktionsanalysen von DNA	58
2.4.7	Analyse von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese	59
2.5	Molekularbiologische Arbeiten III: Herstellung von RNA-Sonden	60
2.5.1	<i>In vitro</i> Transkription und Markierung der Sonden	60
2.5.2	Bestimmung der effektiven Markierung	62
2.5.3	Northern Blot	63
2.6	Morphologische Untersuchungen	67
2.6.1	<i>In situ</i> Hybridisierung in Biopsien	67
2.6.2	Immunfluoreszenz	69
2.6.3	Konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie	71
2.6.4	Kryo-Immunelektronenmikroskopie	71
2.7	Übersicht der verwendeten Chemikalien	74
2.8	Übersicht der verwendeten Enzyme	76
3	Ergebnisse	77
3.1	HLA-Expression in den epithelialen Zelllinien	77
3.1.1	Eigenschaften der verwendeten Zelllinien	77
3.1.2	HLA-Typisierung der verwendeten Zelllinien	79
3.1.3	Analysen der HLA-Expression und -Lokalisation in den Zellen	80
3.1.4	HLA Klasse I-Antigene sind in frühen Endosomen lokalisiert	83
3.1.5	HLA I-Expression wird durch Inkubation mit Frazer's Fraction erhöht	86

3.2	Lokalisation von Gliadin in Enterozyten	88
3.2.1	Endozytose mit dem <i>Fluid Phase</i> Marker FITC-Dextran	88
3.2.2	Gliadin aus Frazer's Fraction ist lokalisiert in frühen und späten Endosomen in HT29 Zellen	90
3.2.3	Intrazelluläre Lokalisation von Frazer's Fraction in HT29 Zellen	91
3.2.4	Lokalisation von Frazer's Fraction in Bezug auf HLA-Moleküle	96
3.2.5	Lokalisation von Ovalbumin in Bezug auf HLA-Moleküle	97
3.2.6	Synthetische Peptide I: das Kontrollpeptid gelangt in späte Endosomen	98
3.2.7	Synthetische Peptide II: das immundominante Peptid 56-68_gelangt in späte Endosomen	100
3.2.8	Synthetische Peptide III: das toxische Peptid wird nicht in späte Endosomen transloziert	101
3.2.9	Modulation des Transports von toxischen Peptiden in späte Endosomen	104
3.3	Expression von HLA-DR und tTG in Enterozyten von Patienten	107
3.3.1	Kontrolle der Spezifität generierter Sonden mittels Northern Blot	107
3.3.2	Detektion von Transglutaminase und HLA-DR mittels <i>in situ</i> Hybridisierung in Patientenbiopsien	108
4	Diskussion	111
4.1	HLA-Expression in intestinalen Zellen	111
4.1.1	HT29, Caco-2 und T84 exprimieren Zöliakie-relevanten Subtyp HLA-DQ8	111
4.1.2	Expression von HLA Klasse I- und II-Komplexen in Enterozyten	113
	HLA Klasse I	113
	HLA Klasse II	114
4.1.3	HLA Klasse I-Moleküle sind in frühen Endosomen lokalisiert	115
4.1.4	Die Expression von HLA Klasse I wird durch Gliadinexposition erhöht	117
4.2	Lokalisation von Gliadin in Enterozyten	119
4.2.1	Frazer's Fraction werden von HT29 Zellen aufgenommen	119

4.2.2	RAC-Enterozyten	120
4.2.3	Toxische Gliadinpeptide gelangen nicht in späte Endosomen	122
4.2.4	Modulation des Transports des toxischen Gliadin-Peptids in späte Endosomen	126
4.2.5	Kolokalisation von Gliadin mit HLA-Molekülen	128
	HLA Klasse I	128
	HLA Klasse II	129
4.2.6	Cross-Presentation exogener Peptide durch HLA Klasse I	130
4.3	Die Rolle der Enterozyten in der Pathogenese der Zöliakie	133
4.3.1	In Enterozyten von Zöliakiepatienten wird die Transglutaminase exprimiert	133
4.3.2	Orale Toleranz	135
	Enterozyten transportieren und prozessieren Antigene nach der Aufnahme unterschiedlich	137
	Enterozyten als Antigenpräsentierende Zelle können Antigene durch HLA Klasse I oder II präsentieren	138
	Enterozyten präsentieren Antigene indirekt durch die Exozytose von beladenen HLA-Antigen-Komplexen oder Exosomen	138
4.3.3	Können Enterozyten als Antigenpräsentierende Zellen eine Rolle spielen?	140
	Präsentation durch HLA Klasse II	140
	Präsentation durch HLA Klasse I	142
4.4	Perspektiven	144
5	Literaturverzeichnis	146
7	Publikationen	163
8	Lebenslauf	164
9	Danksagung	165
10	Eidesstattliche Erklärung	167

6 Abkürzungsverzeichnis

A33	Transmembranes Glykoprotein des Darms
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxosulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle(n)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BALB/c Mäuse	Durch Inzucht gezüchteter Labormausstamm
BES	N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure
BiP	Binding Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungscluster
CD4	Signal- und Adhäsions-Rezeptor für die MHC II-restringierte Antigenpräsentation
CD28	Rezeptor für CD80/86 Kostimulator Moleküle; auf den meisten CD4 und einigen CD8
CD58	für Leukozyten-Adhäsion, bindet CD2
CD63	LAMP-3
CD80	hauptsächlich auf DC, B-Zellen, Makrophagen; Kostimulator für T-Zell Aktivierung; Ligand für CD28
CD86	hauptsächlich auf B-Zellen, Monozyten, DC; Kostimulator für T-Zell Aktivierung; Ligand für CD28
cDNA	Komplementäre DNA
CEC	Colon Epithelial Cells
CLIP	Class II Associated Invariant-Chain Peptide
CSF	Colony-Stimulating Factors
CT	Cholera Toxin
CTB	Cholera Toxin Untereinheit B
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritic Cells
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Early Endosome(s)
EEA-1	Early Endosome Antigen 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FF	Frazer's Fraction
FITC	(fluorescein isothiocyanate)-Dextran
FKS	Fetales Kälberserum
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
Gln	Glutamin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horse Raddish Peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IEC	Intestinal Epithelial Cell
IEL	Intestinal Epithelial Lymphocyte(s)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10	Produktion: Makrophagen, T-Zellen (hauptsächlich Th2); Folge: Makrophagen und DC: Inhibierung der IL-12 Produktion und Expression von Kostimulatoren und Klasse II Molekülen
IL-12	Produktion: Makrophagen und DC Folge: T-Zellen → Th1
IL-15	T- und NK-Zellen: IFN- γ Synthese; erhöhte cytotoxische-Aktivität Produktion: Makrophagen und andere; Folge: NK-Zellen und T-Zellen: Proliferation
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
ISH	In situ Hybridisierung
kD	kilo Dalton
LAMP	Lysosomen Assoziiertes Membranprotein
LB	Luria Bertani
LE	Late endosome (s)
Leu	Leucin
li	Invariante Kette
LIMP	Lysosomen Integrales Membranprotein
M cells	Membranous Cells
MEM	Methionin-freies Medium

Met	Methionin
Mg ₂ Cl	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC class I Polypeptide-related Sequence A
MICB	MHC class I Polypeptide-related Sequence B
MIIC	MHC II Compartment
MYO9B	Myosin IXB
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
P/T-Gliadin	Pepsin/Trypsin verdautes Gliadin
PAS	Protein A-Sepharose
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymersekettreaktion
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PI	Proteaseinhibitoren
PNS	Post Nuclear Supernatant
PP	Peyersche Plaques
Pro	Prolin
RACE	<u>R</u> apid uptake of <u>A</u> ntigen into the <u>C</u> ytosol of <u>E</u> nterocytes
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minutes
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
³⁵ S-Methionin	Radioaktives Isotop des Schwefels
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SI	Saccharase-Isomaltase
TAP	Transporter Associated with Antigen Processing

TCR	T Cell Receptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	Transepithelial Electrical Resistance
TGF	Transforming Growth Factor
TGN	Trans Golgi Network
Th Zellen	T-Helfer Zellen
TNF	Tumor Necrosis Factor
Trp	Tryptan
tTG	Tissue Transglutaminase
Tyr	Tyrosin
U	Unit(s)
UV	ultraviolett
Val	Valin
X	beliebige Aminosäure
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Pathogenese der Zöliakie. Der krankheitsauslösende Faktor für die betroffenen Personen, das Gluten, wurde in den 50-iger Jahren von dem Niederländer K. W. Dicke identifiziert und beschrieben. Bis heute konnte außer der Expositionsprophylaxe keine geeignete Therapie entwickelt werden.

Die Aufklärung der zellbiologischen und immunologischen Mechanismen, die der Pathogenese zu Grunde liegen, ist somit von größter Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *in vitro* Analyse des intrazellulären Transports von Gliadinpeptiden im intestinalen Epithel in Abhängigkeit von der HLA-Expression. Durch biochemische und morphologische Methoden sollen weiterführende Erkenntnisse über die Rolle der Enterozyten bei der Induktion oraler Toleranz und in der Pathogenese der Zöliakie erlangt werden.

1.1 Zöliakie

1.1.1 Definition

Die Zöliakie stellt eine immunologische Erkrankung des Dünndarms dar, die bei genetisch prädisponierten Personen durch Bestandteile verschiedener Getreidesorten ausgelöst und unterhalten wird. Sie führt zu einer Schädigung der Darmmukosa mit charakteristischer Zottenatrophie und konsekutiver Malabsorption, die durch Einhalten einer glutenfreien Diät reversibel ist (Abb. 1.1).

Zöliakie kann kurz nach der Einführung glutenhaltiger Nahrung auftreten oder aber auch erst viel später im Leben entwickelt werden.

1.1.2 Formen der Zöliakie und Epidemiologie

Die Zöliakie ist die häufigste Lebensmittelunverträglichkeit in den meisten Ländern der Welt. Die Prävalenz liegt in Europa, Süd- und Nordamerika sowie Nordafrika bei annähernd 1% der Bevölkerung [Hischenhuber et al. 2006; Hourigan 2006; Stepniak and Koning 2006].

Diese Daten wurden durch serologische *Screenings* ermittelt und durch anschließende histologische Untersuchungen bestätigt.

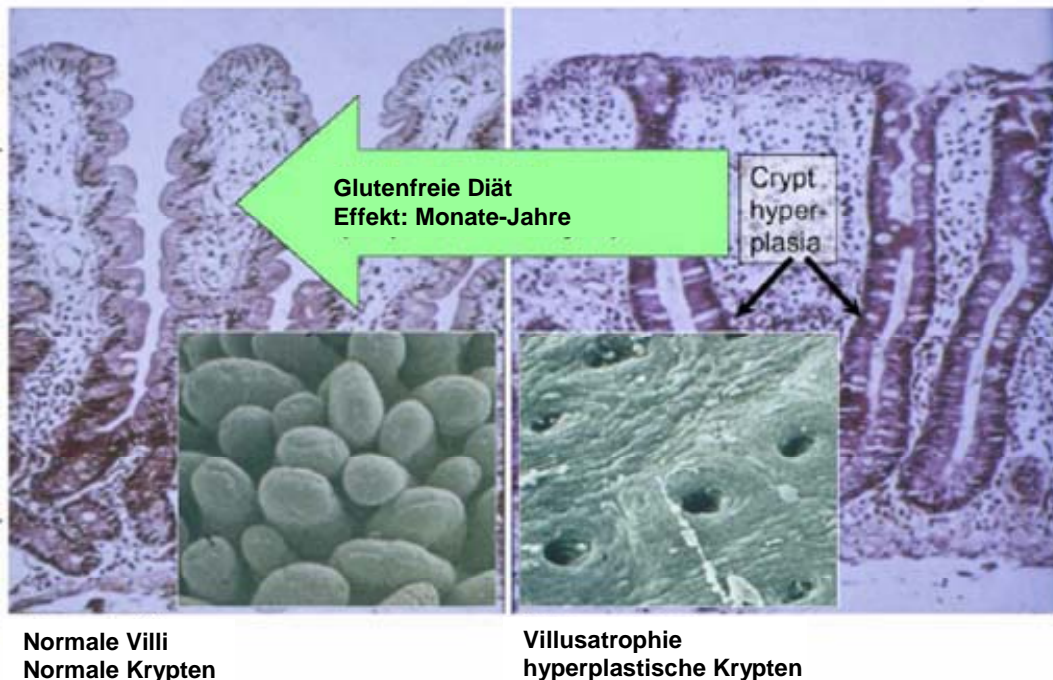


Abb. 1.1: *Mukosa von gesunden Patienten und Zöliakiepatienten.*

Mukosale Veränderungen führen zu hyperplastischen Krypten und Zottenatrophie durch eine schädigende Wirkung auf die Enterozyten (rechts). Die kleinen Bilder zeigen Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop von normalen Villi (links) und abgeflachten Villi mit Hyperplasie (rechts). Durch eine glutenfreie Diät entwickeln sich die Veränderungen innerhalb von Monaten bis Jahren in den normalen Zustand zurück. Entnommen und modifiziert aus [Brandtzaeg 2006].

Die Zöliakie tritt in unterschiedlichen Formen auf:

Die **klassische Zöliakie** zeigt das Vollbild der Erkrankung. Hierzu zählen Durchfall, Erbrechen, Gewichtsabnahme, ausladendes Abdomen, muskuläre Hypertonie und Bauchschmerzen. Bei Kindern und Jugendlichen ist sie verbunden mit Gedeihstörung, Kleinwuchs, Pubertas tarda sowie psychomotorischer und -sozialer Entwicklungsstörung. Die Prävalenz liegt hier bei ungefähr 1:1.000 bis 1:2.000 und bildet die so genannte „Spitze des Eisberges“ der Zöliakie-betroffenen (Abb. 1.2) [Holtmeier et al. 2005; Fasano and Catassi 2005]. Im Weiteren unterscheidet man verschiedene Formen, die **nicht-klassische Zöliakie** (volle Enteropathie mit extra-intestinalen Symptomen), die **silente Zöliakie** (volle Enteropathie mit minimalen Beschwerden oder symptomfrei; die in der Regel zufällig bei serologischen *Screenings* entdeckt wird) und die **potenzielle**

Zöliakie (minimale Enteropathie oder normale Dünndarmmukosa, manchmal symptomatisch, aber mit immunologischer Abweichung (positive EMA- und Gliadinantikörper, erhöhte Anzahl an IEL mit γ/δ -TCR, gesteigerte Expression von CD27- und B7⁺-Lymphozyten und MHC II- Molekülen am Dünndarmepithel)) [Fasano and Catassi 2005]. Eine extreme Variante stellt die **refraktäre Zöliakie** dar, die in der Regel Erwachsene mit klassischer Zöliakie und langem Verlauf betrifft. Hier sprechen die Patienten nicht oder nicht mehr auf eine strikte glutenfreie Diät an [Daum et al. 2005].

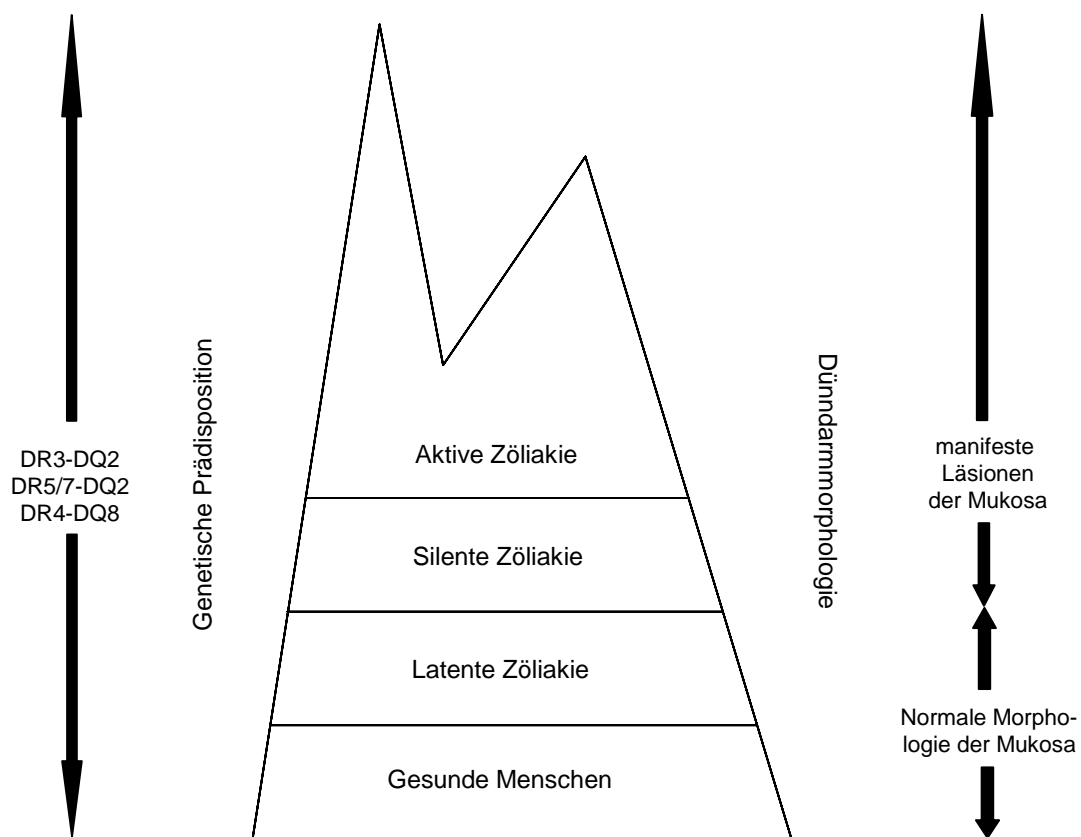


Abb. 1.2: *Klinische Manifestation bei Kindern: das Phänomen des Eisbergs.*

Durch Screenings hat sich herausgestellt, dass die Zöliakie wesentlich häufiger auftritt als angenommen. Die klassische Form der Zöliakie bildet lediglich die Spitze des Eisbergs, während Patienten mit zum Teil wenigen Symptomen oder ohne Beschwerden die breite Basis bilden. Allen Patienten gemeinsam ist die HLA-DQ2/ -DQ8 Prädisposition. Modifiziert nach [Keller 2003].

Für die Zöliakie gibt es bis heute keine Möglichkeit der Therapie. Der Patient kann jedoch durch Einhalten einer lebenslangen glutenfreien Diät die Krankheit „behandeln“. Unter Ausschluss sämtlicher Nahrungsmittel, die Bestandteile von Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Dinkel und/ oder Grünkern enthalten, bilden sich die Zottenatrophie und andere Symptome zurück.

Jedoch ist gerade bei Patienten mit oligosymptomatischen Formen der Leidensdruck oft nicht hoch genug, um sich strikt an diese Diät zu halten. Deren Einhalten setzt eine große Disziplin voraus und kann in gewissem Maße als Einschränkung der Lebensqualität empfunden werden. Bei Nicht-Einhalten der Diät sind schwere Spätkomplikationen, wie z.B. Diabetes mellitus, Osteoporose oder Malignomrisiko für Karzinome des Gastrointestinaltraktes zu erwarten.

So ist die Aufklärung der zellbiologischen und molekularen Vorgänge der Pathogenese von großer Bedeutung und Gegenstand aktueller Forschung für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten.

Die Pathogenese der Zöliakie umfasst genetische Faktoren, wie die Assoziation mit HLA-DQ2 und -DQ8, mit dem Umweltfaktor Gluten sowie immunologische Prozesse in der Dünndarmmukosa. Das Autoantigen, die Gewebstransglutaminase (tTG, *tissue transglutaminase*) bildet das Bindeglied zwischen den HLA-Molekülen und den Glutenpeptiden.

1.1.3 Pathogenese

Das aktuelle Modell zur Pathogenese der Zöliakie beinhaltet zwei integrierte, aber prinzipiell unterschiedliche Mechanismen: Signal 1, generiert vom angeborenen Immunsystem (vielleicht mit dem aktivierten Komplementsystem zusammen) und Signal 2, eine adaptive Immunantwort, die durch HLA-DQ2 oder -DQ8 restringierte CD4⁺ Th1-Zellen unterstützt wird [Brandtzaeg 2006].

Es wird postuliert, dass die Gliadinpeptide nach vorwiegend transzellulärem Transport zur Lamina propria gelangen und nach erfolgter Deamidierung durch die tTG von dendritischen Zellen der Lamina propria komplexgebunden an HLA-DQ2 bzw. -DQ8 präsentiert werden. Durch die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen (Th1) kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen (z.B. IFN- γ) und folgenden Immunkaskaden.

Neben den beschriebenen Gluten-spezifischen T-Zell-Antworten hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass auch Teile des angeborenen Immunsystems durch Gluten stimuliert werden. Dabei spielt das Cytokin Interleukin (IL-) 15 eine zentrale Rolle: Arbeiten von Maiuri und Londei konnten zeigen, dass bei Zöliakiepatienten nicht aber bei Kontrollpatienten die Expression des Cytokins IL-15 durch dendritische Zellen der Lamina

propria und Makrophagen durch die Einwirkung des toxischen Peptids stimuliert wird [Maiuri et al. 2000; Maiuri et al. 2003].

Die Arbeiten von Hue *et al.* konnten zeigen, dass das toxische Peptid 31-49 die Expression des nicht-klassischen MHC-Moleküls MICA auf der Zelloberfläche von Villusenterozyten von Zöliakiepatienten (nicht bei gesunden Kontrollpatienten) induziert [Hue et al. 2004]. Sie konnten ebenfalls demonstrieren, dass die Expression bei unbehandelter Zöliakie bereits erhöht ist, und dass das Expressionslevel mit der Schwere der Erkrankung korreliert. MICA wird bei zellulärem Stress exprimiert und dient als Ligand für NKG2D-Rezeptoren, die auf der Oberfläche von $CD8^+ \alpha/\beta$ -T-Zellen, γ/δ -T-Zellen und auf den meisten NK Zellen zu finden sind [Bahram et al. 2005]. Die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) von Zöliakiepatienten tragen diesen NKG2D-Rezeptor und sind in der Lage, allein durch die NKG2D-MICA-Interaktion Epithelzellen *in vitro* zu lysieren [Hue et al. 2004; Meresse et al. 2004]. Hier konnte ebenfalls ein Zusammenhang mit IL-15 hergestellt werden: die Hochregulation von MICA wird durch IL-15 vermittelt. Eine Behandlung von gesunden Patientenbiopsien mit IL-15 konnte auch dort eine Steigerung der Expression von MICA hervorrufen.

Maiuri und Kollegen schließen aus diesen Beobachtungen, dass das toxische Peptid 31-49 bzw. 31-43 eine notwendige Immunantwort des angeborenen Immunsystems induziert, um anschließend eine adaptive Immunreaktion zu initiieren [Maiuri et al. 2003].

Zwei Untergruppen von IEL liegen bei der Zöliakie vor: $CD8^+ \alpha/\beta$ T-Zellen, welche Effektorzellen darstellen, die mit dem adaptiven Immunsystem zusammenhängen und die IEL mit γ/δ -TCR, die wiederum dem angeborenem Immunsystem zugeordnet werden. Sie antworten auf epithelialen Stress, expandieren bei latenter Zöliakie bevor die Zottenatrophie auftritt und bleiben mehrere Jahre nach glutenfreier Diät erhöht. Eine *in vitro* Studie konnte zeigen, dass nicht nur $CD4^+$ T-Zellen, sondern auch $CD8^+ \alpha/\beta$ T-Zellen an der Ausbildung der spezifischen Immunantwort auf Gliadin involviert sind [Gianfrani et al. 2003].

Die *in vitro* Beobachtungen von Hue und Maiuri und die erhöhten IEL in den Zöliakiepatienten stellen ein Indiz für die Zerstörung der Epithelzellen in der *in vivo* Situation dar, was wiederum das Abflachen der Mukosa erklären würde [Stepniak and Koning 2006].

1.1.4 Genetische Prädisposition der Zöliakie

Die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen liegt bei 86%, während dizygoten Zwillinge nur 20% erreichen, was einen starken Einfluss genetischer Faktoren indiziert [Greco et al. 2002]. Die meisten Patienten tragen den HLA-DR3/DQ2 Haplotyp (*DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201*) oder sind DR5-DQ7/DR7-DQ2 heterozygot (d.h. sie tragen die *DRB1*11/12-DQA1*0505-DQB1*0301/DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0202* Haplotypen) (Abb.1.3). Während die meisten Personen, die kein HLA-DQ2 exprimieren, HLA-DQ8 (*DQA1*0301-DQB1*0302*) positiv sind [Koning et al. 2005]. Bemerkenswert ist an dieser Stelle auch, dass Personen, die HLA-DQ2 homozygot exprimieren, ein wenigstens 5-fach höheres Risiko tragen, Zöliakie zu entwickeln als heterozygot exprimierende Personen. Dabei korreliert auch die Stärke der Gluten-spezifischen Immunantwort: Antigenpräsentierende Zellen (APZ), die homozygot für HLA-DQ2 sind, rufen eine stärkere Gluten-spezifische T-Zell-Antwort aus als APZ, die HLA-DQ2 heterozygot sind [Vader et al. 2003; Stepniak and Koning 2006]. Unterstrichen wird diese Korrelation dabei durch das sehr seltene Auftreten der Zöliakie in Japan, wo die Zöliakie-assoziierten DQ-Allele nur selten in der Bevölkerung vorkommen [Kagnoff 2005].

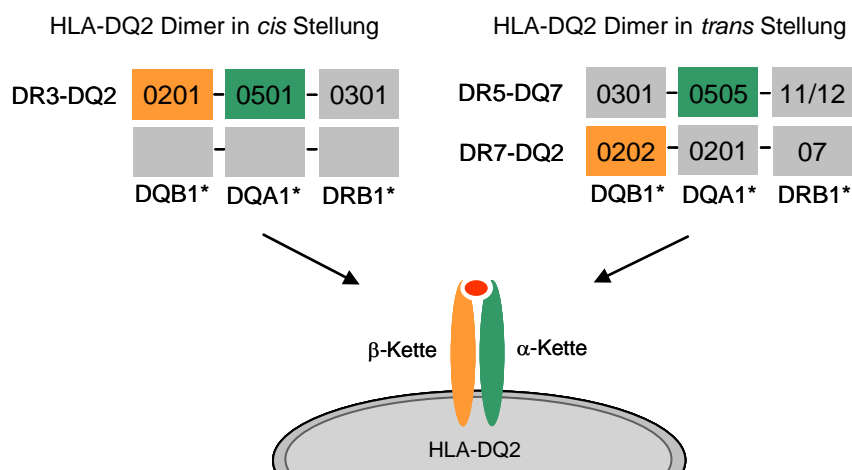


Abb. 1.3: HLA-DQ2-Assoziation in der Zöliakie.

Die meisten Zöliakiepatienten exprimieren einen speziellen heterodimeren HLA-DQ2 Subtyp. Dieses Molekül wird entweder auf demselben Chromosom in *cis* (*DQA1*0501/DQB1*0201*) oder auf unterschiedliche Chromosomen in *trans* Stellung (*DQA1*0505/DQB1*0202*) kodiert.

Modifiziert nach [Sollid 2002].

Jedoch tragen ca. 40% der allgemeinen Bevölkerung diese Allele, entwickeln aber keine Zöliakie. Dies lässt darauf schließen, dass diese genetische Disposition zwar prädisponiert, aber eine Zöliakie nicht zwangsläufig bedingt [Hourigan 2006].

Neben HLA-DQ stehen verschiedene andere genetische Faktoren im Zentrum der Forschung. Kürzlich wurde das erste nicht MHC-kodierende Gen identifiziert, das mit einem erhöhten Risiko für Zöliakie assoziiert ist: Myosin IXB (MYO9B). Die genaue Funktion oder Rolle des Proteins ist noch nicht geklärt, aber man spekuliert, dass die Integrität des Epithels beeinträchtigt ist [Monsuur et al. 2005].

1.1.5 Das Autoantigen der Zöliakie: die Transglutaminase (tTG)

Das menschliche Genom codiert für neun verschiedene Transglutaminasen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen, die auf ihre Kalzium-abhängige, Protein-modifizierende Aktivitäten (Transamidierung, Veresterung oder Hydrolyse) zurückzuführen sind. Transglutaminasen sind beispielsweise involviert bei der Wundheilung, Angiogenese und Apoptose.

Im Zusammenhang mit der Zöliakie steht die tTG2 (Gen: TGM2; 20q11-12; 76kD großes Protein), ein ubiquitär vorkommendes Enzym mit multiplen Funktionen [Fesus and Piacentini 2002; Lorand and Graham 2003].

Dieses Enzym wird konstitutiv in fast allen Zelltypen exprimiert, verbleibt intrazellulär (als inaktive Form) und wird bei Beschädigungen des Gewebes in den Extrazellularraum freigelassen [Aeschlimann and Thomazy 2000]. Die tTG katalysiert u. a. die Vernetzung zweier Proteine unter Bildung einer N^ε(γ-Glutamyl)-Lysin-Isopeptidbindung (Abb. 1.4 unten) zwischen einem Glutaminrest (Glutamindonator) und einem Lysinrest (Glutaminakzeptor) [Lorand and Graham 2003].

Die tTG ist nur bei einer hohen Kalziumkonzentration aktiv (Abb.1.4), wie sie z. B. im Extrazellularraum vorliegt, wo die tTG für die Organisation und Stabilisierung der extrazellulären Matrix verantwortlich ist: Sie vermittelt z. B. Zell-Matrix Interaktionen, die die Verbreitung und Migration von Zellen betreffen und die entscheidend für die Wundheilung sind sowie die Aktivierung von TGF-β (*transforming growth factor*). TGF-β ist u. a. verantwortlich für die Differenzierung der Enterozyten innerhalb der Krypt-Villus-Achse. tTG bindet die inaktive Form (latentes TGF-β) an die Zelloberfläche, wo es durch das Enzym Plasmin proteolytisch zur reifen TGF-β Form aktiviert wird [Nunes et al. 1997; Akimov and Belkin 2001]. Letzteres hat ebenfalls eine Konsequenz für die Pathogenese

der Zöliakie (wenig differenziertes Epithel bei aktiver Zöliakie), da die Aktivierung von TGF- β an der Zelloberfläche indirekt durch die Autoantikörper gegen tTG inhibiert wird.

Unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise, wenn kein primäres Lysin als Glutaminakzeptor zur Verfügung steht oder bei niedrigem pH-Wert, wie er bei intestinalen Entzündungen vorherrscht, deamidiert die tTG das neutrale Glutamin zur negativ geladenen Glutaminsäure (Abb. 1.4 oben) [Folk and Chung 1985]. Ein Substrat ist dann unter Umständen Gluten, das als Nahrungsbestandteil im Lumen des Dünndarms oder nach Absorption in der Lamina propria vorliegt. Die Deamidierung von α -Gliadin erfolgt bevorzugt an den Sequenzen **Gln-X-Pro**, **Gln-X-X-Phe** (Tyr, Trp, Met, Leu, Ile oder Val) und **Gln-X-Pro-Phe** (Tyr, Trp, Met, Leu, Ile oder Val) [Piper et al. 2002; Fleckenstein et al. 2002; Dieterich et al. 2003].

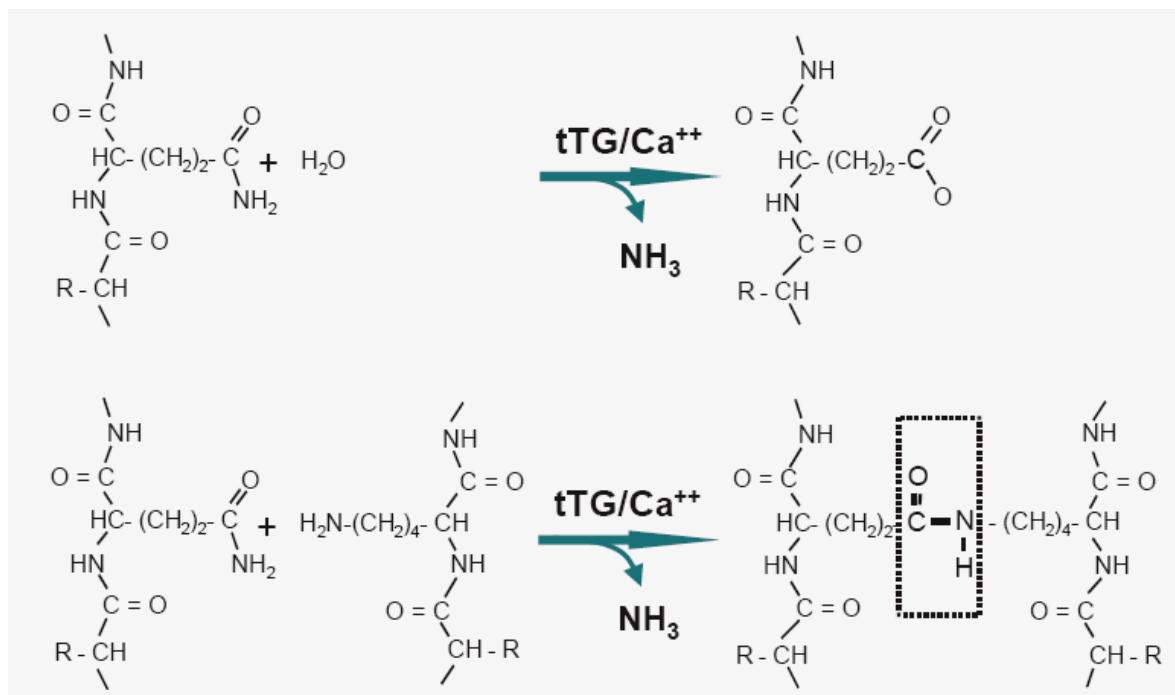


Abb. 1.4: Vernetzung und Deamidierung von Proteinen durch die tTG.

Die tTG katalysiert sowohl die Deamidierung (oben) als auch die Vernetzung (unten) von Proteinen. In beiden Fällen ist die Reaktion Kalzium-abhängig. Oben: bei Abwesenheit eines Lysinrestes (Glutaminakzeptor) und bei niedrigem pH (<7) wird der Glutaminrest des Zielproteins in die negativ geladene Glutaminsäure umgewandelt. Deamidierung von Glutenpeptiden resultiert in der Entstehung negativ geladener Glutamatreste, welche die Bindung der Gliadinpeptide an HLA-DQ2 und -DQ8 erleichtert. Unten: tTG vernetzt ein Glutaminrest des einen Proteins mit dem Lysinrest eines anderen Proteins bei relativ hohem pH Wert (>7). Es entsteht eine irreversible Isopeptidylbindung. Entnommen aus [Koning et al. 2005]

1.1.6 Getreidetaxonomie und Eigenschaften von Gluten

Mitte des letzten Jahrhunderts zeigte der holländische Kinderarzt K. W. Dicke, dass Weizen und andere Getreidesorten im direkten Zusammenhang mit der Zöliakie stehen und dass eine Diät ohne Getreideprodukte zur dramatischen Verbesserung der klinischen Symptome führt [Dicke et al. 1953].

Die gemeinsame Bezeichnung für die Zöliakie-aktivierenden Proteine aus Weizen, Roggen und Gerste ist „Gluten“. Genau genommen jedoch ist Gluten der wissenschaftliche Name für die Proteine des Weizens.

Die Speicherproteine der Samen sind bezüglich ihrer Extraktion und Löslichkeit in Wasser (Albumine), Salzlösungen (Globuline), in Alkohol (Prolamine) und verdünnten Säuren oder Laugen (Gluteline) in Gruppen eingeteilt. Die Hauptspeicherproteine sind Albumine, Globuline und Prolamine, wobei letztere jedoch nur auf die Samen der Gräser beschränkt sind [Shewry and Tatham 1990; Shewry et al. 1995].

Gluten ist ein komplexes Gemisch aus zwei verschiedenen Fraktionen von Speicherproteinen, den Prolaminen (Gliadin des Weizens) und Glutelinen (Glutenin des Weizens) (Abb. 1.5). Die nah verwandten Getreide Weizen, Roggen und Gerste sind bereits bekannt für ihre krankheitsaktivierende Wirkung, der weiter entfernt verwandte Hafer ist umstritten, da es nur vereinzelt zu einer Aktivierung kommt [Srinivasan et al. 2006]. Im Hafer sind die Prolamine nur mit ~5-10% des Gesamtproteingehaltes vertreten, während sie bei den meisten Getreiden das Hauptspeicherprotein bilden (~50% des Proteingehalts im reifen Korn) [Shewry et al. 1995]. Die noch weiter entfernt verwandten Getreidesorten Reis, Mais, Hirse und Sorghum verursachen keine Zöliakie [Shewry & Kasarda 1992].

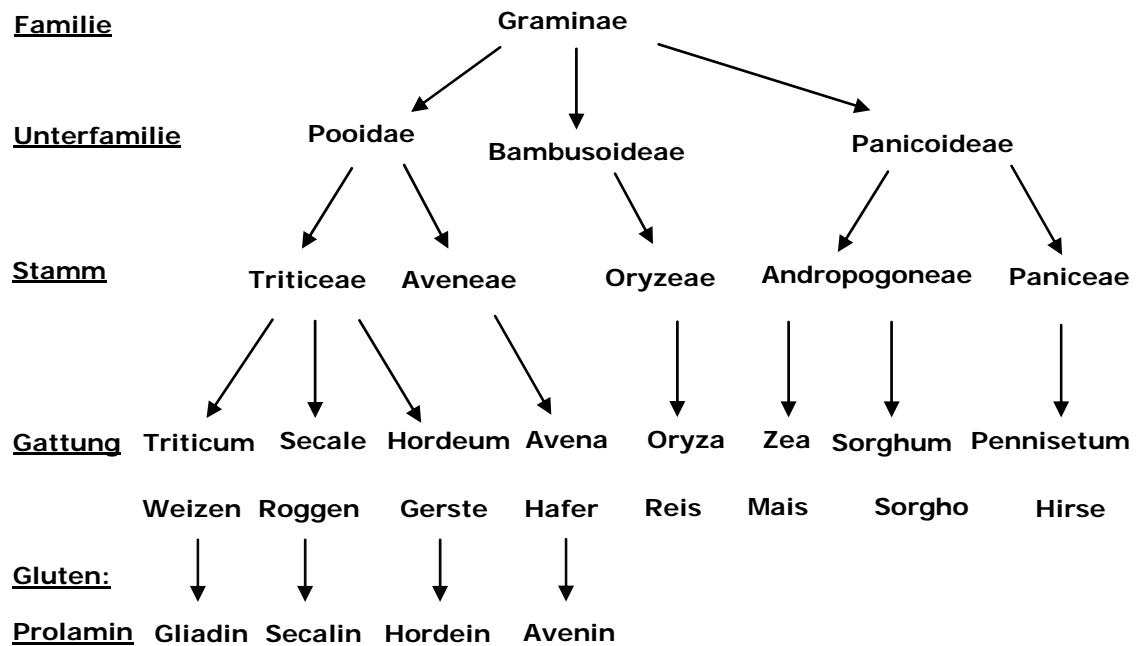


Abb. 1.5: *Taxonomie der Getreidesorten.*

Weizen, Roggen und Gerste, die Gluten und Gliadin, Secalin und Hordein enthalten, gehören zum Stamm der Triticeae innerhalb der Familie der Gräser (Graminae). Hafer dagegen gehört den Aveneae und beinhaltet nur wenige Zöliakie-aktive Sequenzen. Die noch weiter entfernten Getreide Reis, Mais und Hirse tragen keine krankheitsaktivierenden Sequenzen.
In Anlehnung an [Kagnoff 2005].

Glutenproteine haben mehrere einzigartige Eigenschaften, die für ihre immunogene Eigenschaft verantwortlich sind. Sie sind sehr reich an den Aminosäuren Prolin (*Pro*; ~15%) und Glutamin (*Gln*; ~36%). Auf Grund des hohen Prolingehalts sind die Proteine sehr resistent gegenüber der proteolytischen Degradierung, da Magen- und Pankreasenzyme sowie Hydrolasen der Bürstensaummembran keine *post*-Prolin Spaltungsaktivität besitzen. Außerdem macht der hohe Glutaminanteil (~30-40%) Gluten zu einem guten Substrat für die Gewebstransglutaminase (siehe 1.1.4). Solche modifizierten Glutenpeptide können an HLA-DQ2 oder -DQ8 Proteine binden, da diese Moleküle eine Affinität für negativ geladene Aminosäuren an verschiedenen Positionen der Bindungsstelle besitzen [van de Wal et al. 1998; Arentz-Hansen et al. 2000; Molberg et al. 2001]. Diese Peptide mit T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften konnten auch für andere Getreidesorten, wie Roggen und Gerste, als auch für Glutenine des Weizen identifiziert werden [Vader et al. 2002].

Die tTG ist somit das molekulare Bindeglied zwischen dem Umweltfaktor (Getreidepeptide) und dem genetischen Faktor (HLA-Moleküle). Die selektive Modifikation von Glutamin durch die tTG erzeugt auf diese Weise ein riesiges Repertoire an Epitopen,

hergeleitet von verschiedenen Getreidearten, die an HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 binden und T-Zellen im Dünndarm von Zöliakiepatienten stimulieren [Koning et al. 2005].

1.1.7 Synthetische Peptide

Es ist bekannt, dass Gluten viele Peptide verbirgt, die eine Kapazität zur T-Zell-Stimulation haben, darunter sind solche, die als immundominant gelten, da sie bei der großen Mehrheit der Patienten eine T-Zellantwort hervorrufen. Andere Peptide scheinen weniger immunogen zu sein, diese haben dafür aber eine toxische Wirkung auf die Darmmukosa des Zöliakiepatienten. In den Fokus der Forschung sind daher ganz bestimmte Sequenzen des alpha-Gliadins gelangt:

Die immunodominanten Sequenzen des alpha-Gliadins, sind α -9 (57-68) QLQPFPPQQLPY bzw. die deamidierte Form von α -9 (57-68) QLQPFPPQPELPY und α -2 (62-75) PQPQLPYPQPQLPY bzw. die deamidierte Variante von α -2 (62-75) PQPELPYPQPQLPY [Arentz-Hansen et al. 2000; Maiuri et al. 2003].

Das „toxische“ Epitop des alpha-Gliadins ist innerhalb der Sequenz 31-49 LGQQQPFPPQQPYPQPQPF zu finden und wird häufig auch mit der verkürzten Sequenz 31-43 eingesetzt [De Ritis et al. 1988]. Dieses Peptid ist für die schnelle Villusatrophie verantwortlich [Sturgess et al. 1994], ebenso wie für einige andere Veränderungen in der Mukosa, bzw. des angeborenen Immunsystems (Kapitel 1.1.6).

Sollid und Kollegen haben ein 33-mer des α 2-Gliadins mit der Sequenz 57-89 (LQLQPFPPQQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) identifiziert, das resistent ist gegenüber gastrointestinalen Enzymen. Dieses 33-mer enthält drei immundominante Epitope PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ (3-fach) und PYPQPQLPY (2-fach), die sich teilweise überlappen [Shan et al. 2002].

Kürzlich wurde ein weiteres immunmodulatorisches Peptid des alpha-Gliadins entdeckt, welches eine CD8⁺T-Zell-vermittelte Immunantwort auslöst. Das Epitop umfasst die Aminosäuren 123-132 (QLIPCMDVVL) [Gianfrani et al. 2003].

1.2 Das HLA-System

Strukturell stellen sich die Moleküle des MHC (*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) als hochgradig polymorphe, an der Zelloberfläche exprimierte heterodimere Glykoproteine dar. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Selbst und Nicht-Selbst; und zwar sowohl bei der Prägung des Immunsystems als auch in der Auseinandersetzung mit Proteinantigenen, die fremder Herkunft (*allogen*) oder körpereigen (*autolog*) sein können.

Ein wesentliches Charakteristikum der Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort ist die Notwendigkeit zur Prozessierung und Präsentation des Antigens an T-Lymphozyten. Letzteres wird durch die MHC-Moleküle vermittelt.

Der MHC ist ausschließlich auf Vertebraten beschränkt. Innerhalb jeder Spezies wird der Oberbegriff MHC durch einen weiteren Namen zur speziesspezifischen Bezeichnung eingesetzt. So ist die Bezeichnung für den menschlichen MHC *Humanes Leukozyten Antigen*, bzw. abgekürzt HLA.

Bei jedem Individuum werden zwei Allele eines jeden HLA-Genortes exprimiert. Differieren beide Allele voneinander, so wird das Individuum als heterozygot, bei Identität als homozygot bezeichnet. Die Expression der HLA-Moleküle erfolgt in kodominanter Weise. Die Gesamtheit der Allelausstattung an allen bzw. mehreren Genorten wird, da sie auf einem Chromosom liegen, als HLA-Haplotyp bezeichnet [Waßmuth 1995; Abbas and Lichtman 2003].

Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Typen von HLA-Komplexen, die Klasse I und Klasse II Antigene. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrer molekularen Zusammensetzung als auch in ihren Funktionen (siehe auch Kapitel 1.5.3 und 1.5.4).

1.2.1 HLA Klasse I-Antigene

HLA-Klasse I-Moleküle bestehen aus einer schweren polymorphen α -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 45kD und einer assoziierten leichten Kette von 11,5kD, dem β_2 -Mikroglobulin. Die glykolysierte α -Kette besteht aus drei extrazellulär liegenden Domänen (α_1 , α_2 , α_3), einer Transmembranregion und einem zytosolischen Anteil (Abb. 1.6). Die Antigenbindungsstelle wird durch die α_1 - und α_2 -Domänen geprägt. In diesen Domänen sind auch die Sequenzvariabilitäten lokalisiert, die für den allelischen Polymorphismus der HLA Klasse I-Moleküle und die Antigenpräsentation verantwortlich sind [Thomson 1995].

Die Bindungsstelle besteht aus sechs Taschen, A-F, wobei Tasche A und F mit den N- bzw. C-Terminus und Taschen B-E mit den Seitenketten des Peptids interagieren [Gromme and Neefjes 2002].

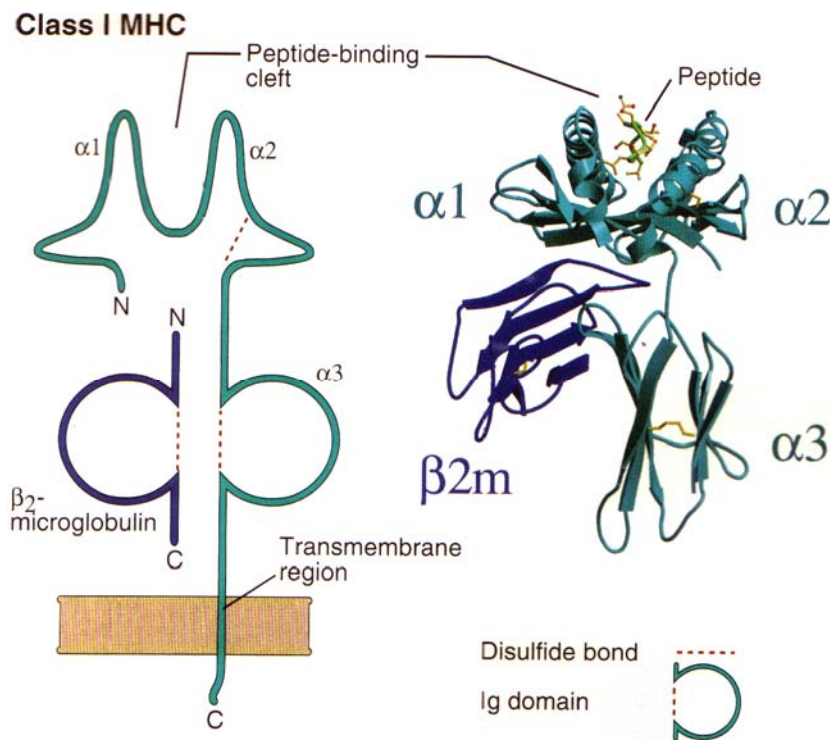


Abb. 1.6: Aufbau von HLA Klasse I-Molekülen.

Die extrazellulären Domänen α_1 , α_2 , und α_3 sind je etwa 90 Aminosäuren lang. Die α_2 -Domäne enthält eine Disulfidbrücke, die eine Schleifenbildung mit ~63 AS bedingt. Die kurze transmembrane Region ist ~25 AS, der cytosolische Teil etwa 30 AS lang.

Aus röntgenkristallographischen Untersuchungen des HLA-A2 Moleküls weiß man, dass sich die α_1 , und α_2 -Domänen der schweren Kette so aneinander lagern, dass die achtsträngige β -Faltblattstruktur dieser beiden Domänen eine Plattform bildet. Auf dieser sind quer zwei α -Helices parallel angeordnet, die so die Wände der funktionell wichtigen Antigenbindungsstelle formen.

Abbildung entnommen aus [Abbas and Lichtman 2003].

Die Sequenz im Bereich der α_3 -Domäne ist hochgradig konserviert und an ihr ist das nicht-kovalent gebundene β_2 -Mikroglobulin assoziiert. Diese Assoziation stabilisiert die funktionell wichtige Konformation der Antigenbindungsstelle. An der α_3 -Domäne findet ebenfalls die Interaktion mit dem CD8-Komplex auf der Oberfläche von T-Lymphozyten statt [Abbas and Lichtman 2003].

Das Gen der HLA Klasse I befindet sich auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6 (6p21.1-6.21.3). Es besteht aus acht Exons und erstreckt sich insgesamt auf einer Länge von 3.500 Basenpaaren. Währenddessen ist das β_2 -Mikroglobulin-Gen

aus vier Exons zusammengesetzt und auf Chromosom 15 lokalisiert. Bei den HLA Klasse I-Molekülen kennt man drei Genorte, HLA-A, -B und -C, die die klassischen, serologisch definierten Spezifitäten kodieren. Darüber hinaus werden von den Klasse I-Genorten HLA-E, -F und -G ebenfalls funktionell aktive Moleküle exprimiert, während die Genorte HLA-H, -J, -K und HLA-L als Pseudogene gelten (für sie konnte bislang kein Genprodukt nachgewiesen werden) [Marsh, Parham, Barber 2000].

1.2.2 HLA Klasse II Antigene

Man unterscheidet die Klasse II-Moleküle in HLA-DR, -DQ und -DP. Im Bereich der HLA-DR-Region sind ein nicht-polymorphes α -Kettengen (DRA) und mehrere β -Kettengene kodiert (DRB1-DRB9). Ein besonderes Charakteristikum der HLA-DR-Region ist, dass die Zahl der DRB-Gene auf einem Chromosom nicht konstant, sondern vom jeweiligen Haplotypen abhängig ist.

Die HLA-DQ- bzw. HLA-DP-Regionen weisen die hochgradig polymorphen Gene DQA1 und DQB1, bzw. DPA1 und DPB1 auf. Weitere Genorte innerhalb der HLA Klasse II-Region werden als DO und DM bezeichnet, deren Genprodukte keine Antigene präsentieren, aber für die Prozessierung der DR-, DQ- und DP-Antigene als Chaperone dienen [Waßmuth 1995; Abbas and Lichtman 2003].

HLA Klasse II-Moleküle sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Kette zusammengesetzt sind. Die schwere α -Kette weist ein Molekulargewicht von ca. 33-35kD und die leichtere β -Kette von ca. 26-29kD auf, wobei die Gewichtsunterschiede auf Unterschiede in der Glykosylierung zurückzuführen sind. Beide Ketten beinhalten je zwei extrazelluläre Domänen (α_1 , α_2 und β_1 , β_2), eine Transmembranregion und einen intrazellulären Abschnitt (Abb. 1.7) [Thomson 1995].

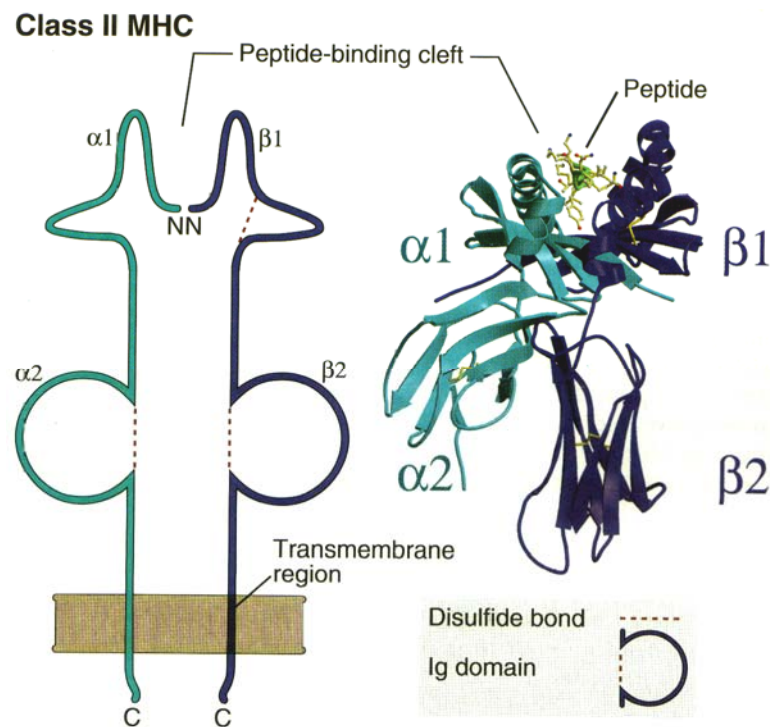


Abb. 1.7: Aufbau von HLA Klasse II-Molekülen.

Beide Ketten weisen je zwei extrazelluläre Domänen (α_1 , α_2 und β_1 , β_2), eine transmembrane Region (23AS) und einen intrazellulären C-terminalen Abschnitt (8-15AS) auf. Die N-terminalen α_1 bzw. β_1 polymorphen Domänen weisen eine Länge von 85-95 AS auf und sind an der Bildung der Antigenbindungsstelle beteiligt. Diese Bindungsstelle ist aus einer achtsträngigen β -Faltblattstruktur und zwei α -helikalen Anteilen aufgebaut. Abbildung entnommen aus [Abbas and Lichtman 2003].

Bei Heterozygotie können durch *cis*- und *trans*- Assoziation verschiedene Heterodimere gebildet werden. Bei der *cis*-Konformation stammen beide Ketten des Heterodimers vom selben Haplotyp. Dagegen findet bei der Kombination in *trans* die Heterodimerbildung durch die Assoziation der Genprodukte der verschiedenen Haplotypen statt.

Ähnlich wie bei den Klasse I Molekülen befinden sich auch hier die variablen Regionen am N-Terminus, so bilden die polymorphen α_1 - und β_1 -Domänen die Antigenbindungsstelle. Ein HLA Klasse II- α -Ketten-Gen setzt sich aus fünf Exons, das β -Ketten-Gen aus sechs Exons zusammen.

1.2.3 Funktion der HLA-Moleküle

T-Lymphozyten erkennen Antigene nicht in freier, löslicher Form, sondern nur als Proteinfragmente, gebunden an MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche Antigenpräsentierender Zellen. Die Antigenbindungsstelle stellt hierbei den funktionell wichtigsten Teil des MHC-Moleküls dar. Die Antigenerkennung wird durch einen ternären

Komplex aus MHC-Molekül, prozessiertem Antigen (gebunden an das eigene (Selbst-) MHC-Molekül) und T-Lymphozyten-Rezeptor, vermittelt.

Die Einteilung des MHC in zwei Klassen spiegelt nicht nur strukturelle Unterschiede zwischen beiden Molekülklassen wider, sondern basiert auch auf unterschiedlicher Antigenprozessierung und –präsentation (siehe Abschnitt 1.5).

1.3 Dünndarm und das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe

Der Dünndarm ist mit ca. 5m Länge der längste Abschnitt des Verdauungstraktes und ist in drei Abschnitte unterteilt. Den ersten und kürzesten Abschnitt bildet das Duodenum mit 25-30cm Länge. Darauf folgt das Jejunum (~2m) und das anschließende Ileum (~3m).

Der Dünndarm ist für die Absorption von Nährstoffen und die Homeostase des Menschen verantwortlich.

Der Aufbau des Darms gliedert sich in vier aufeinander folgende Gewebeschichten: Tunica mucosa (Schleimhaut), Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica serosa.

1.3.1 Aufbau der Schleimhaut

Die Dünndarmschleimhaut (Tunica mucosa) kann histologisch nochmals in drei Einheiten unterteilt werden: ein einschichtiges Säulenepithel, die darunter liegenden Lamina propria (Abb. 1.8) und Lamina muscularis mucosa. In allen Dünndarmabschnitten zeigt die Tunica mucosa fingerförmige Fortsätze in das Darmlumen, die Darmzotten (Villi intestinales) genannt werden. Sie sind etwa 1mm lang und resultieren aus Ausstülpungen des einschichtigen Epithels und der unterliegenden gefäßführenden Lamina propria. Zwischen benachbarten Zotten senken sich Lieberkühn Krypten bis zur nach unten begrenzenden Lamina muscularis mucosa.

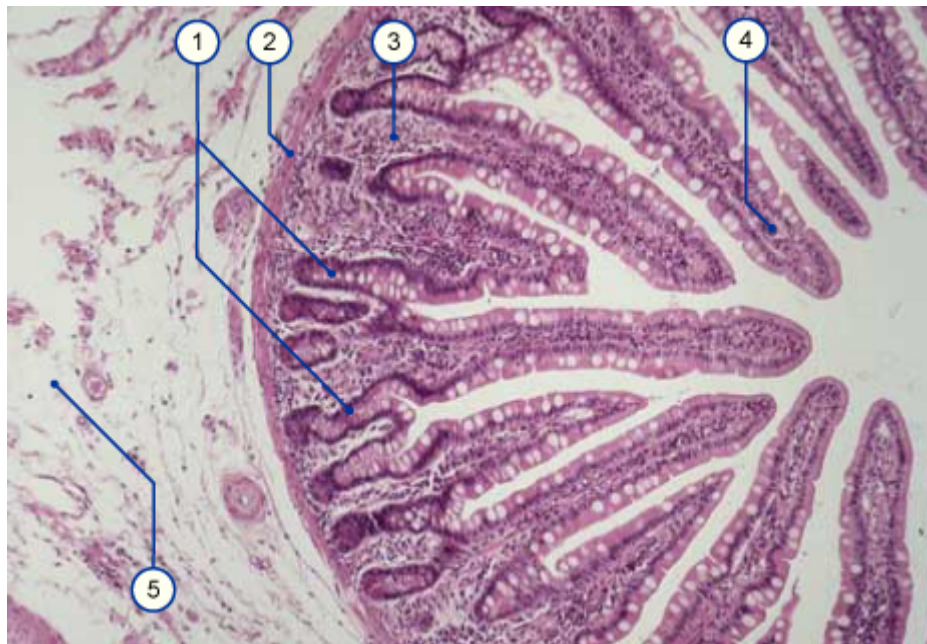


Abb. 1.8: Die verschiedenen Gewebeschichten des Darms.

Der Dünndarm bildet fingerartige Fortsätze, die die Zotten (4) und Krypten (1) bilden. Die Schleimhaut besteht wiederum aus weiteren Schichten, der Lamina propria mucosae (3), die darunter liegende Lamina muscularis mucosae (2) und der Tunica submucosa (5).

Entnommen:

www.unifr.ch/histologielearningfreeallemandbiochemieverdauungduenndarm-duenndarm

1.3.2 Das Epithel / Enterozyten (IEC)

Das Epithel der Krypten geht kontinuierlich in das der Zotten über, wobei undifferenzierte Epithelzellen aus der Krypte an die Villusspitze wandern und dabei differenzieren, und die reifen Zellen im Bereich der Zottenspitze abgeschilfert werden. Die Epithelregeneration erfolgt nach 3-6 Tagen, ohne dass Lücken im Epithelverband auftreten.

Das einschichtige Epithel besteht neben den Enterozyten aus muzinbildenden Becherzellen, enteroendokrinen Zellen sowie in den Krypten lokalisierte Paneth-Zellen.

Das Oberflächenepithel des Dünndarms wird zu 99% aus resorbierenden Enterozyten gebildet. Sie haben eine Höhe von ca. 20-25µm und eine Breite von ca. 7-8µm und stellen polarisierte Epithelzellen mit funktionell unterschiedlicher apikaler und basolateraler Membran dar. Die Oberfläche der apikalen Domäne (dem Lumen zugewandte Membran) bildet durch die als Mikrovilli bezeichneten Ausstülpungen, die so genannte Bürstensaummembran. Je Enterozyt kommen etwa 3.000 Mikrovilli (Höhe 1µm, Breite 0,08µm) vor, so dass die Oberfläche um das 20-fache vergrößert ist.

Der Bürstensaum ist mit einer 0,3-0,5µm hohen Glykokalyx bedeckt. Diese setzt sich aus Glykoproteinen, Glykolipiden und Proteoglykanen zusammen und dient als mechanischer

Schutz vor proteolytischen Abbau und dem Eindringen von Mikroorganismen [Frey et al. 1996].

Im Übergangsbereich von der apikalen zur basolateralen Membran sind die benachbarten Enterozyten über ein Schlussleistennetz miteinander verbunden. Der Schlussleistenkomplex setzt sich aus mehreren Verbindungsstrukturen zusammen, die im Detail nur im Elektronenmikroskop sichtbar sind. Apikal bilden die benachbarten Epithelzellen eine Zonula occludens (tight junction), welche dem Verschluss des Interzellularraums dient. Anschließend folgt die Zonula adhaerens mit einem unter der Membran gelegenen dichten Aktinfilamentnetzwerk. Sie garantiert die plastische Verformbarkeit der benachbarten Epithelzellen. An den Fusionsstellen bleibt lediglich ein Zwischenraum von 10-20nm Spaltbreite frei, so dass unter physiologischen Bedingungen die Barriere für Moleküle größer als 5.500 Dalton nicht passierbar ist [Pappenheimer and Reiss 1987]. Somit ist gewährleistet, dass Makromoleküle nur unter strikter Kontrolle der transepithelialen Transportmechanismen in das Körperinnere gelangen. Weiter basal befinden sich weitere Verbindungskomplexe (Desmosomen, Macula adhaerens), die sowohl der mechanischen Festigung als auch zur Kommunikation benachbarter Zellen dienen.

1.3.3 Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe, GALT

Die mukosale Oberfläche wird geschützt durch verschiedene epitheliale Sekretionsprodukte wie Mucine, Defensine und sekretorische Antikörper – insbesondere IgA – und durch epitheliale Strukturen wie den Tight Junctions und der Glykokalyx [Neutra et al. 2001].

Das darmassoziierte Lymphgewebe (*gut-associated lymphoid tissue, GALT*) ist der größte und wahrscheinlich auch komplexeste Teil des Immunsystems. Es ist über eine Gesamtfläche von etwa 200m² im ständigen Kontakt mit einer Vielzahl von fremden Antigenen. Das GALT muss dabei zwischen pathogenen Mikroorganismen und harmlosen Antigenen, wie z. B. Nahrungsbestandteilen und körpereigenen Bakterien, diskriminieren. Die unterschiedlichen Bereiche des GALT lassen sich in drei Kompartimente gliedern: die Peyerschen Plaques (PP), das diffuse lymphatische Gewebe der Lamina propria und die intraepithelialen Lymphozyten (IEL). T-Zellen, insbesondere die der PP sowie der Lamina propria, sind in der Lage, zu rezirkulieren und nach erfolgter Stimulation systemisch Einfluss zu nehmen [Weiner et al. 1994].

Immunantworten des GALT auf orale Antigene unterscheiden sich von anderen Immungeweben: die beiden auffälligsten Unterschiede sind die hohe Mukosa-assoziierte Produktion an IgA Antikörpern und die Tendenz zur oralen Immunisierung durch Induktion von T-Zell-Toleranz statt T-Zell-Aktivierung [Neutra et al. 2001].

Peyerschen Plaques (PP):

Sie besitzen eine Architektur vergleichbar mit der von Lymphknoten und beinhalten neben T- und B-Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen (DC). Die Organisation der PP ist dadurch bedeutend, da sie keine afferenten Lymphgefäße besitzen, sondern Antigene direkt durch die Darmsoberfläche erhalten. Spezialisierte Epithelzellen, so genannte M-Zellen (*membranous cells*), kennzeichnen das den PP aufliegende intestinale Epithel. Sie besitzen keine ausgeprägten Mikrovilli und nur eine spärliche Glykokalyx auf ihrer Oberfläche. M-Zellen sind in erheblichem Ausmaß für die Absorption/Pinozytose und Transzytose von luminalen Antigenen verantwortlich und führen diese unverändert dem lymphatischen Gewebe der PP zu [Kraehenbuhl and Neutra 2000].

Diffuses lymphatisches Gewebe der Lamina propria:

Die intestinale Lamina propria beherbergt verschiedene Zellpopulationen und umfasst ebenfalls T-Lymphozyten, welche vorwiegend vom Typ CD4 sind und den Phänotyp von aktivierten Zellen haben. Die Lamina propria beinhaltet zudem eine große Anzahl an aktivierten B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie Makrophagen, DC, Eosinophile und Mastzellen. Die Hauptfunktion der B-Lymphozyten besteht in der Synthese von sekretorischen Immunglobulinen der Subklasse IgA, welche von den Enterozyten in das Darmlumen transportiert werden. Dort können die Antikörper an Antigene binden und neutralisieren diese dadurch, dass ihre Aufnahme blockiert ist [Abbas and Lichtman 2003].

Intraepitheliale Lymphozyten (IEL):

IEL stellen die größte Population peripherer extrathymidaler T-Lymphozyten dar. Sie befinden sich zwischen den Enterozyten oberhalb der Basalmembran und unter physiologischen Bedingungen liegt ein Verhältnis von ca. 15 Lymphozyten pro 100 Enterozyten vor. Die Mehrheit der IEL im humanen Gewebe sind CD3⁺CD8⁺, lediglich 6% sind CD3⁺CD4⁺ T-Lymphozyten. Folglich wird den IEL vorwiegend eine supprimierende und zytotoxische Funktion zugeschrieben.

Man unterscheidet die IEL im Weiteren nach ihren T-Zell Rezeptoren (TCR, *T cell receptor*), wobei die Mehrheit den α/β -TCR exprimieren. Nur 10% tragen den γ/δ -TCR,

jedoch übersteigt dies deutlich den Anteil im Blut (3,8%) oder in anderen peripheren Lymphgeweben (Lamina propria 4,6%) [Deusch et al. 1991]. Die biologische Funktion dieser Zellen ist momentan noch nicht vollständig geklärt, sie sind aber vorwiegend vom CD8⁺ Typ. Im Gegensatz zu den α/β -T-Zellen, erkennen γ/δ -T-Zellen keine MHC Strukturen. Für beide TCR Subtypen lässt sich sagen, dass sie nur eine geringe Diversität des Antigenrezeptors zeigen.

1.4 Endozytose

Die Plasmamembran bildet die Verbindungsstelle zwischen den Zellen und ihrer Umwelt. Die Aufnahme von Nährstoffen und die Kommunikation unter Zellen sowie zwischen Zellen und ihrer Umwelt finden hier statt.

Kleine Moleküle wie Aminosäuren, Zucker und Ionen können über integrale Transporter oder Kanäle die Plasmamembran überqueren. Makromoleküle hingegen müssen über membrangebundene Vesikel in die Zelle transportiert werden. Dieser Prozess erfolgt über Invagination einzelner Abschnitte der Plasmamembran und wird *Endozytose* genannt [Conner and Schmid 2003]. Endozytose umfasst verschiedene Mechanismen, durch die Zellen Makromoleküle und Partikel aufnehmen, und sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, bei der Immunantwort, Nervenübertragungen, interzellulärer Kommunikation und der Homeostase des Organismus.

1.4.1 Formen der Endozytose

Man unterscheidet verschiedene Mechanismen der Endozytose, die sich in zwei weit reichende Gruppen einteilen lassen, die Phagozytose (Aufnahme von großen Partikeln) und die Pinozytose (Aufnahme von Flüssigkeiten und Lösungen).

Phagozytose wird in Säugetieren nur durch spezialisierte Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen betrieben. Sie eliminieren z.B. Bakterien, große Zellbruchstücke oder arterielle Fettablagerungen durch eine unspezifische Aufnahme, die durch das Aktinzytoskelett und GTPasen der Rho-Familie gesteuert wird.

Pinozytose oder *Fluid Phase* Aufnahme findet in allen Zelltypen statt und lässt sich in vier grundlegende Mechanismen unterteilen: Makropinozytose (Vesikel mit Durchmesser von 0,5-5µm zur Internalisierung großer Volumen von Flüssigkeiten, z.B. dendritische Zellen), Clathrin-abhängige Endozytose (Vesikeldurchmesser ~100nm), Caveolae-abhängige Endozytose (Vesikeldurchmesser ~50nm) und Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose. Dadurch können *Tracemoleküle* im umgebenden Medium aufgenommen werden, wobei der Grad der Internalisierung von Molekülen proportional zu deren Konzentration im Medium ist. Gelöste Stoffe können sich aber auch unspezifisch an die Zellmembran binden (adsorptive Pinozytose) oder werden spezifisch durch Rezeptoren auf der Oberfläche gebunden (rezeptorvermittelte Endozytose) und internalisiert [Marsh 2001].

1.4.2 Der Endozytose-Pfadweg

Nach der Endozytose gelangen extrazelluläre Moleküle, Rezeptorproteine oder Zellmembranstrukturen in das endosomale Kompartiment. Diese stellen ein intrazelluläres System aus morphologisch unterschiedlichen vesikulären oder tubulären Strukturen dar, die durch Vesikeltransport untereinander sowie mit der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat in Verbindung stehen. Nach Definition wird endozytiertes Material als erstes in die frühen Endosomen (EE, *early endosome*), dann in die späten Endosomen (LE, *late endosome*) und schließlich in die Lysosomen transportiert. Die Transportdauer zum jeweiligen endosomalen Kompartiment variiert zwischen einzelnen Zelltypen und zwischen Kulturzellen und Gewebe [Mullock et al. 1994; Luzio et al. 2000].

Die EE werden auch als Sortier- oder Recyclingstation des endosomalen Transportweges bezeichnet, da hier über das weitere „Schicksal“ der endozytierten Moleküle entschieden wird. Einige Komponenten wie bestimmte Typen von Lipiden oder Rezeptoren werden an die Zelloberfläche recycelt; andere werden in die späten Endosomen sortiert, wo sie degradiert werden. Alternativ können Bestandteile zu anderen zellulären Bestimmungsorten, wie Golgi Apparat und TGN transportiert werden oder aber gehen in polarisierten Zellen den transzellulären Weg [Mukherjee et al. 1997].

Frühe Endosomen (EE) – die erste Station des Endozytose-Pfadwegs:

EE sind häufig in der Zellperipherie zu finden und empfangen die meisten Vesikel, die von der Plasmamembran eintreten. Sie besitzen eine charakteristische tubuläre, vesikuläre Morphologie, wobei der Vesikeldurchmesser bis zu 1µm beträgt und tubuläre Fortsätze einen Durchmesser von ~50nm haben. Im Lumen der EE herrscht ein leicht saurer pH-Wert von ~6,2-6,5, wodurch z. B. viele Liganden von ihrem Rezeptor dissoziieren [Mellman 1996; Mukherjee et al. 1997]. Rab4 (recycling EE), Rab5 (EE, Plasmamembran) und EEA-1 (*early endosome antigen 1*) sind Markerproteine für die EE, die verschiedene Fusionsmechanismen kontrollieren.

Späte Endosomen (LE) – erhalten internalisiertes Material auf dem Weg von den EE oder vom TGN zu den Lysosomen. In den LE liegt der pH-Wert bei 5,0-5,5. Sie enthalten oft viele Membranvesikel oder –lamellen und Proteine, die typisch für Lysosomen sind (lysosomale Glykoproteine und saure Hydrolasen).

Lysosomen – das finale Kompartiment des Endozytose-Pfadwegs:

Sie haben einen stark sauren pH-Wert von ~4,8 und erscheinen im EM als große (1-2µm Durchmesser), elektronendichtes Material enthaltende Vakuolen. Sie haben einen hohen Gehalt an lysosomalen Membranproteinen, wie z. B. die saure Phosphatase (LAP), LAMP-1 und -2 (Lysosomen-assoziiertes Membranprotein), LIMP-I und -II (Lysosomen integrales Membranprotein) und aktive, lysosomale Hydrolasen. Sie können von Endosomen durch die Abwesenheit der Mannose-6-Phosphatrezeptoren und recyclingenden Zelloberflächenrezeptoren unterschieden werden [Kornfeld and Mellman 1989].

Im Allgemeinen werden die Lysosomen als Entsorgungsorganell beschrieben, jedoch scheinen die Populationen und Funktionen der LE und Lysosomen sehr viel heterogener zu sein. So befindet sich das MHC Klasse II-Kompartiment in den LE (MIIC) [Geuze 1998; Chow et al. 2002] oder Lysosomen bilden die sekretorischen Organellen von hämatopoetischen Zellen, Melanozyten, zytotoxischen T-Zellen u. a. Zelltypen [Page et al. 1998; Stinchcombe and Griffiths 1999; Kollner et al. 2006].

Der Transport zwischen den EE und LE verfolgt zwei Modelle, die graduelle Reifung (*maturation model*) oder einen vesikulären Transport von endozytiertem Material (*vesicular transport model*). Bei dem Model der Reifung stellt man sich vor, dass ein reifendes EE durch kontinuierliches Entfernen und Hinzufügen von Material zu einem LE wird [Stoorvogel, W et al. 1991]. Wohingegen das zweite Model besagt, dass sich Vesikel (ECV, *early carrier vesicle*) vom EE abschnüren und mit LE fusionieren und damit

luminalen Inhalt und Membranproteine transportieren [Aniento et al. 1993; Gruenberg and Maxfield 1995].

Für den Transfer von endozytiertem Material zwischen den LE und den Lysosomen werden ebenfalls zwei Hypothesen vorgeschlagen: Die erste wird „*kiss-and-run*“ genannt und besagt, dass LE und Lysosomen einer ständigen und wiederholten transienten Fusion und Teilung unterliegen [Storrie and Desjardins 1996]. Die zweite wird als „Hybrid-Organell“-Hypothese bezeichnet und schlägt vor, dass LE und Lysosomen direkt miteinander verschmelzen und nach einer späteren Erholung des Lysosomen zur erneuten Nutzung bereit liegen [Mullock et al. 1994; Luzio et al. 2000].

1.4.3 Transzytose

In polarisierten Zellen, die eine apikale und eine basolaterale Membran aufweisen, existiert ein zusätzlicher intrazellulärer Transportweg für Makromoleküle. Dies ist der vesikuläre Transport von einer Membrandomäne zur gegenüberliegenden und wird als Transzytose beschrieben. Dieser Transportmechanismus ist z. B. bei Epithelzellen für die Aufnahme und Sekretion von IgA und IgM von Bedeutung. Eine Transzytose kann sowohl von der basolateralen zur apikalen Seite erfolgen (z.B. bei der Sekretion von IgA), als auch von der apikalen zur basolateralen Seite (z.B. bei der Aufnahme mütterlicher IgG-Moleküle im Intestinaltrakt von Säuglingen) [Leitner et al. 2006].

Ebenso werden Nährstoffe im Darm durch Transzytose über die Enterozyten vom Lumen in den Interzellularspalt transportiert.

1.5 Antigenprozessierung und -präsentierung

Als Antigene werden Substanzen bezeichnet, die vom Immunsystem (B- und T-Lymphozyten, Antikörper) erkannt werden und eine Immunreaktion hervorrufen. Löst ein körperfremdes Molekül eine Immunantwort aus, so wird es immunogen genannt. Bindungsstellen von Antikörpern oder MHC sind gegen eine bestimmte Stelle auf solch einem Molekül gerichtet, das so genannte Epitop oder die antigene Determinante [Berg, Tymczko, Stryer 2003].

Der Organismus bedient sich im Zuge einer Immunreaktion gegen schädigende Antigene besonderer immunkompetenter Zellen. Dazu gehören u. a. T- und B-Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen, die im Zusammenspiel mit den Cytokinen wie z. B. Interleukine (IL), Interferonen (IFN) oder CSFs (*colony-stimulating factors*) den Organismus vor Pathogenen schützen.

T-Zell-vermittelte Immunantworten spielen eine führende Rolle bei den Entzündungsprozessen von Zöliakiepatienten und bei der Induktion oraler Toleranz:

Für die zellvermittelte Immunreaktion gegen schädigende Antigene müssen diese intrazellulär verarbeitet - prozessiert - werden (Kapitel 1.5.1 und 1.5.2). Anschließend erfolgt die Antigenpräsentation, die zur Stimulation von antigenspezifischen T-Lymphozyten führt (Kapitel 1.5.3 bis 1.5.6). Diese Aktivierung erfolgt sowohl durch endogene als auch durch exogene Antigene über ein Erkennen des Antigens durch den membranständigen T-Zell-Rezeptor (TCR, *T cell receptor*). Der TCR wird sowohl auf der Zelloberfläche von CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert und, zusammen mit dem assoziierten CD3-Komplex, übernimmt er die Aufgabe der Signalübertragung ins Zellinnere.

T-Zell-Rezeptoren sind jedoch nicht in der Lage, Antigene in ihrer nativen Konformation zu erkennen [Allen and Unanue 1987]. Eine erfolgreiche Interaktion setzt vielmehr voraus, dass das Antigen dem TCR in modifizierter Molekülstruktur und komplexgebunden an MHC-Proteine (Kapitel 1.2) auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

1.5.1 Antigenprozessierung im endozytotischen Pfadweg

Der erste Schritt zur Enthüllung von antigenen Epitopen wird durch den sauren pH-Wert des endozytotischen Kompartiments erreicht, da dieser die Entfaltung von Proteinen unterstützt. Unterschiedliche Antigene benötigen ein abweichendes proteolytisches Milieu in den verschiedenen endozytotischen Kompartimenten von den EE zu den Lysosomen [Collins et al. 1991; Watts 1997]. Die Proteine, die in der Proteindegradation involviert sind, benötigen ebenfalls ein saures Milieu für ihre Aktivität. Zu diesen Enzymen gehören Aspartatproteasen wie Cathepsin D und E und Cysteinproteasen wie Cathepsin B, L, S und H [Villadangos and Ploegh 2000]. Neben den Cathepsinen spielen die Asparagin-spezifische Cysteinendopeptidase sowie die Gamma-Interferon-induzierbare lysosomale Thiolreduktase eine bedeutende Rolle bei der Antigenprozessierung [Manoury et al. 1998; Arunachalam et al. 2000].

1.5.2 Antigendegradierung durch das Proteasom

Für die Degradierung von zytosolischen Proteinen oder Peptiden erfolgt eine chemische Modifikation, die Ubiquitinierung. In einem mehrstufigen Prozess werden mehrere Ubiquitin-Moleküle an Lysinreste innerhalb des zum Abbau vorgesehenen Proteins angehängt, so dass sich eine Kette bildet, die vom Proteasom erkannt wird. Dieses ist ein großer Proteasekomplex (26S-Proteasom) aus vielen Untereinheiten, der ATP-abhängig Proteine verdaut, an die Ubiquitin angehängt wurde. Das 26S-Proteasom besteht aus zwei Komponenten: einem 20S-Proteasom, das die katalytische Aktivität ausübt, und einer regulatorischen 19S-Untereinheit. Substrate werden nach und nach abgebaut, ohne dass die Zwischenstufen des Abbaus freigesetzt werden, bis das Substrat auf Peptide einer Länge von 7-9 Aminosäuren reduziert ist. Die 19S-Untereinheit enthält sechs unterschiedliche ATPasen sowie eine Isopeptidase, die intakte Ubiquitinmoleküle abspaltet. Das Ubiquitin wird wiederverwertet und die Peptidprodukte werden durch andere zelluläre Proteasen weiter zu einzelnen Aminosäuren abgebaut [Pamer and Cresswell 1998].

1.5.3 Antigenpräsentierung der HLA Klasse-I

Der größte Anteil der Peptide, der von MHC Klasse I-Molekülen präsentiert wird, entstammt der Prozessierung von intrazellulären, endogenen Proteinen. Die Prozessierung erfolgt im zytoplasmatisch gelegenen Proteasom durch enzymatische Degradation von Antigenen (Kapitel 1.5.2). Von dort erfolgt der Transport der Peptide vom Zytoplasma in das endoplasmatische Retikulum (ER) unter Beteiligung des TAP Komplexes (*transporter associated with antigen processing*). Die α -Kette wird kotranslational in die ER-Membran inseriert und glykosyliert und assoziiert im ER mit dem β_2 -Mikroglobulin. Hier erfolgt sogleich die Assoziation der Peptide mit *de novo* synthetisierten HLA Klasse I- und β_2 -Mikroglobulin-Molekülen. Die entstehenden heterotrimeren Komplexe werden durch den Golgi-Apparat und das TGN an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von CD8⁺T-Zellen erkannt werden [Gromme and Neefjes 2002; Williams et al. 2002].

1.5.4 Antigenpräsentierung der HLA Klasse II

MHC Klasse II-Moleküle präsentieren primär extrazelluläre, exogene Antigene. Jedoch ist die Expression von MHC II-Molekülen bestimmten Zelltypen vorbehalten. Diese so genannten Antigenpräsentierenden Zellen umfassen neben dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten auch verschiedene Epithelzellen, wie z. B. Enterozyten.

MHC II-Komplexe werden im ER synthetisiert, assoziieren dort mit der invarianten Kette (*Ii*) und dem CLIP (*class II associated invariant-chain peptide*)-Fragment und werden von dort als Nonamer über den Golgi-Apparat zu den MHC transportiert. Die *Ii* dient dabei als Signalsequenz für den intrazellulären Transport und als Schutz vor frühzeitiger Antigenbindung. Exogene Antigene gelangen durch Endozytose in die LE, bzw. MHC, werden dort prozessiert und an MHC II-Moleküle gebunden. Anschließend erfolgt der Transport dieser neu gebildeten MHC II/Antigen-Komplexe an die Zelloberfläche, wo die Antigenpräsentation an CD4⁺ T-Zellen erfolgt [Braciale and Braciale 1991; Watts 1997].

1.5.5 Cross-Presentation

Diese strikte Trennung zwischen der Präsentation exogener und endogener Antigene konnte in den letzten 20 Jahren widerlegt werden. Für eine Vielzahl unterschiedlichster exogener Antigene konnte der Nachweis einer MHC I/ CD8⁺ T-Lymphozyten vermittelten Präsentation und Stimulation erbracht werden. Dieser als *Cross-Presentation* bezeichnete Prozess konnte für Antigene wie Bakterien, Parasiten, Zelltrümmer, artifizielle Partikel in Form von an Latex gekoppeltes OVA, inaktivierte Viren und Viruspartikel, denaturierte Proteine als auch für synthetische Peptide bewiesen werden [Jondal et al. 1996; Albert et al. 1998; Li et al. 2001; Gianfrani et al. 2003].

Wenigstens zwei fundamental unterschiedliche *pathways* wurden für die Präsentation exogener Antigene durch HLA I-Komplexe beschrieben: Das eine Modell verfolgt die Idee, dass exogene Antigene Zutritt zum konventionellen HLA Klasse I-Pfadweg erlangen (*phagosome-to-cytosol pathway*). Das andere Modell besagt, dass HLA I-Komplexe analog zu den Klasse II-Molekülen in endosomalen Kompartimenten mit exogenen Antigenen assoziieren (*post-golgi loading of MHC I*) [Gromme and Neefjes 2002].

Phagosome-to-cytosol Modell:

Studien haben gezeigt, dass die Präsentation exogener Antigene durch MHC I nicht sensitiv auf die Behandlung mit Leupeptin oder Chloroquin, aber sensitiv auf Inhibitoren des Proteasoms reagierten. Diese Beobachtungen deuten auf eine nicht-lysosomale, zytosolische Prozessierung hin. Außerdem kann ein Transfer von endozytotischen Material ins Zytosol stattfinden, ohne Unterbrechung endosomaler Membranen [Kovacsovic-Bankowski and Rock 1995; Reis e Sousa and Germain 1995; Shen et al. 1997]. Alternativ können exogene Antigene auch ins Zytosol gelangen als Resultat einer Überladung der Phagozytoseprozesse, was zum Verlust der Membranintegrität führt [Reis e Sousa and Germain 1995].

Diese exogenen Proteine oder Peptide, die Zugang von Phagosomen ins Zytosol erlangen, folgen dem konventionellen Pfad endogener Antigenprozessierung für MHC Klasse I Präsentation.

Das *post-golgi loading* Modell:

Hier findet die Peptidbeladung auf MHC I-Komplexe in den Endosomen statt. MHC I-Moleküle gelangen entweder durch den direkten Transport vom ER zu den Endosomen oder werden von der Oberfläche internalisiert und recycelt. Endozytierte MHC/Peptid-Komplexe dissoziieren bei niedrigem pH-Wert und können erneut assoziieren. Bestimmte Peptide hingegen binden bei saurem pH sogar mit hoher Affinität an MHC I [Stryhn et al. 1996; Chiu et al. 1999; Li et al. 2001; Gromme and Neefjes 2002].

1.5.6 Antigenpräsentierung durch Enterozyten

Enterozyten können als immunpotente Zellen bezeichnet werden, da sie neben den klassischen MHC I-Molekülen auch die nicht-klassischen MHC I-Moleküle wie CD1d (β_2 -Mikroglobulin abhängig und unabhängig), MICA und MICB sowie verschiedene Cytokinrezeptoren exprimieren [Blumberg et al. 1997]. Zudem synthetisieren Villusenterozyten konstitutiv MHC II-Antigene, nicht jedoch kostimulierende Faktoren wie CD80 oder CD86 [Blumberg et al. 1999; Hershberg and Mayer 2000]. Unter entzündlichen Bedingungen kommt es zu einer Hochregulation der MHC II-Moleküle durch den Einfluss von IFN- γ , die dann ebenfalls in den Enterozyten im Bereich der Krypten nachzuweisen ist [Bland and Warren 1986]. Außerdem können Enterozyten lösliche Antigene sowohl von apikal (aus dem Lumen) als auch basolateral aufnehmen. Diese gelangen dann in den endolysosomalen Weg der IEC, wo sich auch das MIIC befindet. Somit sind die einzelnen

Bausteine, die für die Antigenprozessierung und -präsentierung benötigt werden, vorhanden (siehe auch oben). Zudem stehen die IEC in sehr engem Kontakt mit residenten IEL, und die Expression der MHC-Moleküle ist hauptsächlich auf die basolaterale Membran beschränkt, so dass ebenfalls der Kontakt zu Lymphozyten der Lamina propria besteht [Hershberg et al. 1998; Campbell et al. 1999].

Den Enterozyten als APZ wird eher eine supprimierende oder unterstützende Funktion zugeschrieben, als das sie in der Lage sind, eigenständig (naive) $CD4^{+}T$ -Lymphozyten zu stimulieren [Hershberg and Mayer 2000; Garside and Mowat 2001]. Da Enterozyten konstitutiv keine kostimulierenden Moleküle (CD80, CD86 oder ICAM-1) exprimieren, ist davon auszugehen, dass diese MHC II-vermittelte Interaktion entweder zur Induktion von $CD4^{+}Th2$ - bzw. $Th3$ -Zellen führt oder in die klonale Anergie spezifischer $Th1$ -Zellen mündet.

1.6 Orale Toleranz

Die intestinale Mukosa ist stetig einer Vielzahl von Antigenen, Mikroorganismen und Nahrungsbestandteilen ausgesetzt. Ein geringer, aber physiologisch signifikanter Anteil von Nahrungsproteinen wird intakt absorbiert (s. u.). Diese immunogen wirksamen Eiweiße erhalten so Zugang zum GALT, aber auch zum systemischen lymphatischen Gewebe mit immunologischen Konsequenzen [Strobel and Mowat 1998; Mowat 2003].

Die lokale Produktion und Sekretion von IgA Antikörpern als physiologische Immunantwort verhindert die Aufnahme eines entsprechenden Antigens. Im Darmlumen sind an IgA gebundene Antigene der enzymatischen Degradation verlängert ausgesetzt, ohne eine Aktivierung des klassischen Komplementweges zu initiieren. In seltenen Fällen ergeben sich lokal und/oder systemisch pathologische Immunantworten auf Nahrungsproteine. Mehrheitlich resultiert aus der Interaktion von Nahrungseiweißen mit dem GALT jedoch die Ausbildung einer antigenspezifischen immunologischen Toleranz, die als orale Toleranz beschrieben wird.

Pathogene Antigene werden hingegen als solche erkannt und induzieren eliminierende Immunantworten. Die Fähigkeit zur Ausbildung der oralen Toleranz zeigt sich dabei nicht nur auf die Passage der gastrointestinalen Schleimhaut beschränkt, sondern ist auch bei nasaler oder bronchialer Antigenexposition gegeben [Rask et al. 2000].

1.6.1 Antigene

Nahrungsproteine sind während der gastrointestinalen Passage proteolytischen Prozessen ausgesetzt. Verschiedene Proteasen und Peptidasen des Magens (Pepsin) und des Pankreas (Chymotrypsin, Trypsin, Carboxy- und Aminopeptidasen) sowie die Hydrolasen der Bürstensaummembran katalysieren die Spaltung der Nahrungsbestandteile. Die Peptidasen der Enterozyten im Dünndarm vollziehen den letzten Schritt der luminalen Eiweißhydrolyse, so dass etwa 90% der oral aufgenommenen Proteine als kurzkettige Peptide oder freie Aminosäuren absorbiert werden. Lediglich 10% der Proteine werden von den Enterozyten in nativer Form aufgenommen. Durch intrazelluläre Degradierung unterliegen die kurzkettigen Peptide sowie 90-97% der nativen Proteine der vollständigen Hydrolyse. Ein geringer Anteil von ~1% der Nahrungseiweiße entzieht sich der Proteolyse und erreicht die systemische Zirkulation im unveränderten, immunogenen Zustand [Heyman and Desjeux 1992; Terpend et al. 1998; Heyman 2001].

1.6.2 Mechanismus der oralen Toleranz

Die verschiedenen Mechanismen zur Induktion oraler Toleranz gegenüber einem bestimmten Antigen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Jedoch ist nach heutigem Kenntnisstand davon auszugehen, dass es sich bei diesem aktiven immunologischen Prozess um ein T-Zell-vermitteltes Phänomen handelt, das zur spezifischen Suppression von zellulären und humoralen Immunreaktionen führt.

Die Induktion der oralen Toleranz setzt zunächst einmal eine Prozessierung und Präsentation des tolerogenen Antigens voraus. Als involvierte Zellformen werden klassische APZ der intestinalen Mukosa wie Makrophagen, DC und B-Lymphozyten, aber auch Enterozyten als nicht-klassische APZ beschrieben [Weiner and van Rees 1999; Dubois et al. 2005]. Abhängig von der Frequenz der Nahrungsaufnahme und der Antigenexposition beruht der immunologische Toleranzstatus auf der Aktivität antigenspezifischer T Suppressorzellen sowie der klonalen Anergie bzw. Deletion bestimmter T-Lymphozyten. Nach Aufnahme hoher Antigen Dosen basiert der immunologische Toleranzstatus überwiegend auf einer klonalen Anergie. Darunter versteht man in diesem Zusammenhang einen Stimulationszustand von antigenspezifischen Th1 Lymphozyten, der durch fehlende Proliferation und IL-2

Produktion charakterisiert ist. Dieses aktiv entstehende Immundefizit trägt vorrangig zur Reduktion der humoralen Immunantwort bei [Chehade and Mayer 2005].

Als klonale Deletion wird hingegen die induzierte Apoptose immunreaktiver Zellen beschrieben, die jedoch nur nach Applikation extrem hoher (unphysiologischer) Antigendosen eintritt. Es ist folglich davon auszugehen, dass unter physiologischen Bedingungen die klonale Deletion nur einen geringen Anteil zur Induktion oraler Toleranz beiträgt [Strobel 2002].

Nach Applikation niedriger Antigendosen überwiegt die Induktion spezifischer T-Suppressorzellen, die mehrheitlich CD4-Antigene aufweisen, daneben jedoch auch den CD8-Phänotyp sowie γ/δ -T-Suppressorzellen zeigen [Chen et al. 1995; Strobel 2002; Mowat 2003]. Jedoch scheint die Rolle der CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg} Zellen) von entscheidender Bedeutung zu sein: In CD4⁺T-Zell-defizienten Mäusen kann keine B-Zell- oder CD8⁺T-Zell-vermittelte orale Toleranz ausgelöst werden. Außerdem wird in Mäusen, die CD4⁺T-Zell-*depleted* oder MHC II-defizient sind, zwar eine Antigen-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantwort ausgelöst, aber keine Induktion einer oralen Toleranz [Garside et al. 1995; Desvignes et al. 1996; Dubois et al. 2005]. Man unterscheidet verschiedene Typen von T-Zellen: CD4⁺T_{reg} Zellen, die auch Th3 genannt werden, CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen (repräsentieren 5-10% der peripheren CD4⁺T-Zellen) sowie Tr1 Zellen, die oft CD25 exprimieren und vergleichbar mit den CD4⁺CD25⁺T_{reg} Zellen sind, aber nicht den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren.

Die physiologische Antwort auf intestinale Antigene ist meist charakterisiert durch die Produktion von IgA und die Produktion von Interleukin 4 (IL-4), IL-10 (inhibiert Makrophagenaktivierung, Antagonist zu IFN- γ), TGF- β (inhibiert T- und B-Zellproliferation; stimuliert B-Zellen zur IgA-Produktion) und durch T_{reg} Zellen. Die Funktion liegt in der Unterstützung einer Toleranzreaktion. Wohingegen die Cytokine IL-18, IL-12 oder IL-1 die orale Toleranz unterbinden [Chehade and Mayer 2005; Dubois et al. 2005].

Die beschriebenen zellulären Prozesse können entweder exklusiv oder parallel induziert werden und in variablem Ausmaß interagieren.

1.6.3 Antigenpräsentierung

Für die Ausbildung einer oralen Toleranz besteht die Notwendigkeit zur Prozessierung und Präsentation der aufgenommenen Antigene. In der intestinalen Mukosa kommen die konventionellen APZ wie Makrophagen und dendritische Zellen sowie die Enterozyten (siehe 1.6.4) als nicht-klassische APZ in Frage.

Jedoch konnte bis heute nicht geklärt werden, in welchen Verhältnissen und welchem Ausmaß diese Zelltypen für die orale Toleranzinduktion notwendig sind. Die am besten untersuchte Population an APZ im Darm ist die der dendritischen Zellen der PP. Sie stellen die wahrscheinlichsten Kandidaten für diesen Prozess dar und es wurden bereits mehrere Untergruppen beschrieben [Iwasaki and Kelsall 2001; Mowat 2003].

1.6.4 Enterozyten

Den Enterozyten können verschiedene Funktionen im Rahmen der oralen Toleranzinduktion zugeschrieben werden: Ausschluss, Filtration und Präsentation von Antigenen.

Die Enterozyten bilden durch eine geschlossene Epithelschicht und ihre Mukusschicht eine physikalische Barriere, die luminale Antigene daran hindert, unkontrolliert ins Körperinnere zu gelangen. Das Epithel verhindert die Passage immunogener Aggregate, so dass Antigene in löslicher Form dem Immunsystem zugeführt werden und somit eine inflammatorische Immunkaskade vermieden wird [Garside and Mowat 2001]. Wie oben beschrieben können IEC Antigene auch direkt an T-Lymphozyten präsentieren (Kapitel 1.5.6). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine Direktion von exogenen Antigenen in die LE von Enterozyten für die orale Toleranzinduktion erforderlich ist [Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 2000].

Da Enterozyten MHC II-positiv sind, aber normalerweise keine kostimulierenden Faktoren exprimieren, die für eine vollständige T-Zell-Aktivierung benötigt werden, sind sie gute Kandidaten für tolerogene APZ *in vivo*. Die Präsentation von Antigenen durch IECs an angrenzende CD4⁺T-Zellen würde helfen, die lokale Toleranz zu erklären. Es ist außerdem möglich, dass diese das Überleben und die Aktivität bereits geprimter T_{reg} Zellen aufrechterhalten [Mowat 2003].

Alternativ nehmen IEC Einfluss auf die Immunantwort durch die Abschnürung von Exosomen oder Tolerosomen, die von anderen APZ aufgenommen und präsentiert oder

direkt von T-Zellen erkannt werden [Karlsson et al. 2001; van Niel et al. 2001; Theyry et al. 2002; Van et al. 2003].

1.6.5 Cholera Toxin Untereinheit B, CTB

Das Cholera Toxin gehört zu der Familie der AB₅-Toxine. Fünf identische Peptide sind zu einem Ring assoziiert und formen die pentamere B-Untereinheit (~55kDa). Diese Untereinheit ist ein Lektin und bindet spezifisch an GM1 Ganglioside auf der Oberfläche von Epithelzellen. Die Untereinheit A ist nicht-kovalent an die Untereinheit B assoziiert und besitzt eine enzymatische Einheit, welche die Adenylat Cyclase aktiviert [Lencer and Tsai 2003].

Bakterielle Toxine, wie die nicht-toxische Untereinheit B des Cholera Toxins, dienen als mukosale Adjuvantien [Bergerot et al. 1997] und unterstützen die Effekte eines tolerogenen Antigens [Sun et al. 1994; de Haan and Hirst 2000]. Durch den Einsatz von CTB konnten bereits Erfolge zur oralen Toleranzinduktion in experimentellen Modellen für Autoimmunerkrankungen [Bergerot et al. 1997; Rask et al. 2000; Sun et al. 2000] und auch in klinischen Studien an Patienten erzielt werden [Stanford et al. 2004].

1.7 Fragestellung

Bei der Zöliakie entsteht durch den Verlust der oralen Toleranz gegenüber Getreideeiweißen eine chronische Entzündung des Dünndarms. Das derzeitige Modell zur Pathogenese der Zöliakie schreibt den klassischen APZ der Lamina propria die Hauptfunktion bei dem Verlust der oralen Toleranz zu [Stepniak and Koning 2006]. Die orale Toleranzinduktion vollzieht sich nach heutigem Kenntnisstand im Bereich des Epithels und dem GALT [Strobel and Mowat 2006].

Aufgaben und Funktionen der Enterozyten sind in diesem Zusammenhang bislang nur schlecht verstanden. Das Epithel stellt jedoch den direkten und primären Kontakt mit aufgenommenen Nahrungsantigenen, wie etwa Gliadin, dar. Die initialen Schritte beim Umgang mit Gliadin, wie Endozytose, intrazelluläre Transportwege und Lokalisationen der Peptide innerhalb der Enterozyten sind wenig erforscht. Zudem wurden diese Zellen als

nicht-klassische APZ beschrieben, denen unter normalen, gesunden Bedingungen eher eine supprimierende Funktion zuzuordnen ist [Snoeck et al. 2005].

Aufgrund vorangegangener Studien besteht die Vermutung, dass toxische und nicht-toxische Gliadinpeptide in den Enterozyten unterschiedlich transportiert werden [Zimmer et al. 1998; Zimmer et al. 2006]. Um diese Unterschiede weiter zu charakterisieren, rekonstruiert dieses Forschungsvorhaben die einzelnen Transportschritte unter experimentellen Bedingungen in kultivierten intestinalen Epithelzellen.

Einen wesentlichen Aspekt der Untersuchung stellt die Aufnahme von Gliadinpeptiden und deren Transport in endosomale Kompartimente eines immortalisierten Zellmodells für intestinale Zellen (HT29) dar. Hierfür wird ein Peptidgemisch, Frazer's Fraction, benutzt, das durch den Verdau von Gliadin mit Pepsin und Trypsin hergestellt wird [Fazer et al. 1959]. Außerdem werden synthetische Peptide definierter Sequenz verwendet, die bereits als toxisch oder immundominant beschrieben wurden [Maiuri et al. 1996; Arentz-Hansen et al. 2000], zur Internalisierung auf die Zellkultur gegeben und anschließend in den Zellen nachgewiesen. Da für die Zöliakie eine HLA-Assoziation vermutet wird, wird auch die HLA-Expression in den Zelllinien untersucht und mittels IFN- γ -Stimulation moduliert. Enterozyten sind in der Lage sowohl HLA Klasse I- als auch Klasse II-Antigene zu exprimieren [Hershberg and Mayer 2000].

Des Weiteren wird versucht durch Konjugation des toxischen Peptids an Cholera Toxin Untereinheit B, dieses Peptid in die späten Endosomen zu lenken. Dort assoziieren die HLA-Klasse II-Moleküle, die für eine orale Toleranzinduktion erforderlich sind, mit exogenen Antigenen.

In diesem Zellmodell soll die Frage beleuchtet werden, welche Rolle die Enterozyten als erste Kontaktstelle oral aufgenommener Antigene bei der Pathogenese der Zöliakie und bei der Toleranzinduktion spielen können. Die Aufklärung dieser Prozesse ist entscheidend für die Entwicklung innovativer Therapien, insbesondere für die oligosymptomatische Form der Zöliakie.

2 Material und Methoden


Lösungen, Puffer und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch autoklaviert (121°C, 1 bar, 20 min), Glasgeräte sterilisiert (250°C, 1h). Alle weiteren Utensilien wurden, wenn erforderlich, in steriler Form vom Hersteller bezogen.


Alle verwendeten Reagenzien waren mindestens von p.a. Qualität.


2.1 Zellkultur


Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (Holten LaminAir, Integra) durchgeführt.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

-  HT-29 Zellen: Isoliert aus Kolonadenokarzinom
Kaukasier, weiblich, 44 Jahre
Adhärente Epithelzellen (HTB-38; ATCC, USA)

-  Caco-2 Zellen: Isoliert aus primären Kolontumor
Kaukasier, männlich, 72 Jahre alt
Adhärente Epithelzellen; (HTB-37; ATCC, USA)

-  T84 Zellen: Isoliert aus Kolonkarzinom (Lungenmetastase) und
passagiert in Mäusen
Männlich, 72 Jahre
Adhärente Epithelzellen; (CCL-248, ATCC, USA)

-  DR3/DR3 B-Lymphozyten:
EBV transformierte Lymphozyten von DR3- homozygoten;
Julia Ellis, London

Medien, Lösungen und Puffer:

Die verwendeten Medien und Zusätze, sowie Trypsin/ EDTA-Lösung wurden von der Firma BioWest (Nouaillé, Frankreich) bezogen.

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose* wurde zur Kultivierung von HT29 und Caco-2 Zellen verwendet.

Zusätze:

500.000U/ l Penicillin

10mg / l Streptomycin

10% Fetales Kälberserum (FKS)

- *DMEM-Ham's F12* wurde zur Kultivierung der T84 Zellen verwendet.

Zusätze:

500.000U/ l Penicillin

10mg/ l Streptomycin

10% FKS

- *RPMI 1640 Medium* wurde für die Kultivierung von DR3 B-Lymphozyten gebraucht.

Zusätze:

1000U/ l Penicillin

1mg/ l Streptomycin

500µg/ l Gentamycin

10% FKS

- *Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):*

0,8% NaCl

0,2% KCl

8mM Na₂HPO₄

1,5mM K₂HPO₄

- *Interferon-γ (IFN-γ):*

rekombinant, human; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. B. Otto, Tierärztliche Hochschule Hannover

- *Trypsin/ EDTA-Lösung* zur Ablösung der adhärent wachsenden Zellen:
PBS
0,05% Trypsin
0,02% EDTA

- *Einfriermedium* wurde angefertigt aus 10% DMSO in FKS

2.1.2 Pflege der Zellkultur









Die Dauerkulturen von Zelllinien können in speziellen Kryogefäßen bei einer Temperatur von -196°C im flüssigen Stickstoff über größere Zeiträume gelagert werden. Wenn eine Zelllinie in Kultur gebracht wird, erwärmt man die Zellen auf 37°C und überführt sie zügig in Kulturmedium. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO wirkt nach der Erwärmung zelltoxisch, so dass es aus der Zellsuspension entfernt werden muss. Dies geschieht durch kurzes abzentrifugieren der Zellen für 2 Minuten bei 1.600 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau). Das Zellpellet wird anschließend in dem jeweiligen Medium resuspendiert und auf zwei Kulturschalen verteilt. Zur Kultivierung werden die Zellen im Inkubator (Biosafe eco, Integra) bei 37°C , 5% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95% gezüchtet.

Adhärent wachsende Zellarten setzen sich auf den Boden der Kulturschale ab und wachsen dort fest. Mit der Zeit bilden die sich teilenden Zellen einen dichten Rasen. Man spricht von konfluenten Zellen, wenn die gesamte Fläche mit Zellen bedeckt ist. Die epithelialen Zellen differenzieren in diesem Stadium und bilden durch Tight Junctions die für Epithelzellen typische Polarität aus.

Während der Kultivierungsphase wird das Medium alle 2-3 Tage erneuert und im Mikroskop die Qualität der Zellen überprüft. Wenn die Zellen konfluent gewachsen sind, können sie mit Hilfe von Trypsin wieder von der Platte gelöst und geteilt werden. Dafür werden die Zellen 2mal mit PBS gewaschen, bevor 2ml Trypsin/ EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben und einige Minuten bei 37°C inkubiert werden. Die abgelösten Zellen werden in Medium aufgenommen und 2 Minuten bei 1.600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf die gewünschte Anzahl an Kulturschalen verteilt.

2.1.3 Internalisierung von Peptiden

Die Untersuchungen der Gliadininternalisierung durch intestinale Zellen erfolgte unter Verwendung folgender Peptide des alpha-Gliadin, bzw. Peptidgemische [Kasarda et al. 1984]:

-  ¹M1 (α 31-49): LGQQQPFPPQQPYQPQPF
-  ^{1,2}M1-CTB: CTB-CLGQQQPFPPQQPYQPQPF
-  ¹G5 (α 56-68): LQLQPFQPPELPY
-  ¹G3 (α 56-68): LQLQPFQPQLPY
-  ¹M3 (α 229-246): LPQFEEIRNLALQTLPAM
-  Frazer's Fraction III
-  Pepsin/ Trypsin verdautes Gliadin (Sigma, Taufkirchen)
-  Ovalbumin (OVA, Sigma)

Sofern nicht anders angegeben, wurden die synthetischen Peptide in einer Konzentration von 0,5mg/ml eingesetzt. Das konjugierte Peptid M1-CTB (1mg/ml Stammlösung), Frazer's Fraction sowie P/T-Gliadin wurde 1:20 mit Medium verdünnt. Die jeweilige Inkubationszeit für die Aufnahme der Peptide wurde variiert und ist im Ergebnisteil vermerkt.

2.1.4 Herstellung von Frazer's Fraction

Lösungen und Puffer:

- *Gluten* (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- *Pepsin DAB 5* (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- *Trypsin cryst.* (Merck)
- *HCl* (Merck)
- *NaOH* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Zu 1L einer 0,1 molaren HCl-Lösung werden 100g Gluten und 0,5g Pepsin gegeben (pH 1,8) und bei 37°C für 4h unter Rühren inkubiert. Nach anschließender Erhöhung des pH-Wertes auf 7,8 durch Titration von ca. 100ml einer 1 M NaOH, wird 0,5g Trypsin

¹ Synthetisiert von H. Wieser, Garching

² Konjugation von Dr. Wagner, AKH Wien

hinzugefügt und die Lösung wiederum 4h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von ca. 50ml 1 molarer HCl-Lösung bis zu einem pH-Wert von 4,5 kommt es zur Bildung eines Niederschlags. Durch anschließende Zentrifugation bei 2.500 rpm kann dieser von der löslichen Fraktion getrennt werden und der Überstand (Frazer's Fraction III) in Aliquots eingefroren werden [Frazer et al. 1959].

Die Herstellung von P/T-Gliadin verläuft analog, nur wird hier anstatt Gluten 100g Gliadin (Sigma) eingesetzt.

2.1.5 Peptid-Konjugation

Das Peptid wird an das Trägerprotein CTB (SBL Vaccin, Stockholm, Schweden) durch das heterobifunktionale Vernetzerreagens *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimid (MBS - Pierce) gekoppelt. Dazu wurde die Aminogruppe des Trägerproteins zunächst durch die Gabe eines 25-fachen Überschusses von MBS und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur aktiviert. Anschließend wurde überschüssiges MBS durch eine Entsalzungssäule (PD-10 Säule, Amersham Bioscience) entfernt. In einem zweiten Schritt wurde das Peptid in einem Verhältnis von 20:1 (Peptid:Trägerprotein) hinzugefügt. Die Vernetzung erfolgte innerhalb von 3h bei Raumtemperatur an Cysteinresten des Peptids. Ungebundenes Peptid wurde durch Dialyse gegen PBS entfernt. Abschließend wurde die Konzentration mit einem BCA Protein Assay (Pierce) bestimmt³.

Im Dot Blot wurde überprüft, ob die Konjugation erfolgreich war. Dafür wurde 1µl (1µg) des Konjugats und 1µl P/T-Gliadin auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert („gedottet“). Die Membran wurde mit Milchpulver geblockt, mit dem polyklonalen anti-Gliadin Primärantikörper und anschließend mit einem HRP gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (vgl. Kapitel 2.2.6 Western Blot). Das M1-CTB konnte neben dem P/T-Gliadin deutlich detektiert werden.

³ Durchführung Dr. Wagner, AKH Wien

2.2 Radioaktive Markierung, Isolierung und biochemische Untersuchung von Proteinen

2.2.1 Radioaktive Markierung von Proteinen

Lösungen und Puffer:

- *MEM (Minimum Essential Medium)* ohne Methionin; Bio West
Zusätze:
292 mg/ l L-Glutamin
500.000U/ l Penicillin
10 mg/ l Streptomycin
- *L-(³⁵S)-Methionin* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Die Proteine werden durch den Einbau von radioaktivem Schwefel markiert, um sie später autoradiographisch zu detektieren [Torian and Kenny 1986].

Alle Arbeiten mit radioaktivem Material wurden im Isotopenlabor unter Einhaltung der Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt.

Bei der Durchführung dieser Versuche wurde die modifizierte Form nach der AG Naim angewandt [Naim et al. 1991].

Die Zellen wurden für 2h mit Methionin-freiem Medium (MEM) bei 37°C inkubiert (ausgehungert), um später einen raschen Einbau zu erreichen. Anschließend wurde das Medium nochmals gewechselt, um Reste von Methionin zu entfernen. Pro Platte werden 3,5µl ³⁵S-Methionin (~ 80 µCi) an Aktivität ins Medium gegeben. Die Zellen inkubieren in Abhängigkeit von der Translations- und Transportzeit für 2-4h bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

2.2.2 Lyse der Zellen und Immunpräzipitation (IP)

Lösungen:

- *Lysispuffer* [Amigorena et al. 1994]
0,5% Nonidet P40
300mM NaCl
50mM Tris; pH7,4

- *Proteasen-Inhibitoren* (Roche, Penzberg, Deutschland)
 - 1mM PMSF
 - 1µg/ml Pepstatin A
 - 1µg/ml Antipain
 - 5µg/ml Leupeptin
 - 5µg/ml Aprotinin
 - 50µg/ml Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor

- *Waschpuffer I und Waschpuffer II*
 - Waschpuffer I:
 - 0,5% Triton-X-100
 - 0,005% Na-Deoxycholat in PBS

 - Waschpuffer II:
 - 500mM NaCl
 - 0,5% Triton-X-100
 - 10mM EDTA
 - 125mM Tris-HCl; pH 8,0

- *Protein-A-Sepharose (PAS)* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Nach Beendigung der Markierungszeit wurde das radioaktive Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Zum Schutz der Proteine vor Degradation wurde pro Milliliter Lysispuffer 20µl des Proteaseninhibitor-Mix (PI-Mix) dazu gegeben.

Die Zellen wurden bei 4°C (auf Eis) mit 1ml Lysispuffer und mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte gelöst. Die Suspension wurde für 1,5h bis über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler gelagert.

Nach der Lyse wurde die Suspension für 15-30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus), um nicht gelöste Zelltrümmer aus dem Zellextrakt zu entfernen. Der Überstand wurde im Anschluss mit 40µl Protein-A-Sepharose (PAS) zum *Preclean* für 1,5h oder über Nacht auf dem Schüttler inkubiert (4°C). Bei diesem Verfahren sollen lösliche Proteine unspezifisch an das Protein A binden, so dass der Zellextrakt durch eine Präzipitation vorgereinigt wird. Die Sepharose-Kügelchen (*Beads*) wurden anschließend 1 Minute bei 6.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde für die folgende Immunpräzipitation abgenommen.

Mit der Immunpräzipitation kann ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung isoliert werden. Bei der IP mit immobilisiertem Protein A binden Antigen-Antikörperkomplexe an PAS und werden damit ausgefällt. Das Präzipitat enthält anschließend Antigen, Antikörper, PAS und unspezifisch adsorbiertes Protein. Zunächst wurde das Antigengemisch mit einem entsprechenden Antikörper für 2h inkubiert, bevor für weitere 2h die PAS hinzu gegeben wurde.

Einsetzen der Antikörper:

<u>Antigen:</u>	<u>Firma:</u>	<u>Spezies/ Klon/ Isotyp:</u>	<u>Verdünnung:</u>
HLA-I	Hybridoma, ATCC	<i>Maus</i> / W6/32/ IgG2a	1:500
HLA-I	Dianova	<i>Maus</i> / B9.12.1/ IgG2a	1 :500
HLA-II	Dako, Hamburg	<i>Maus</i> / CR3/43/ IgG1	1 :200
Beta2Mikroglobulin	Nordic, Tilburg	<i>Kaninchen</i> / polyklonal	1 :500
EEA-1	Dianova	<i>Kaninchen</i> / polyklonal	1 :2000

Erneutes abzentrifugieren bei 4.500 rpm sorgte für die Trennung von Überstand und Immunpräzipitat, wobei letzteres für eine anschließende SDS-PAGE gereinigt wurde. Dafür wurden die *Beads* 2mal mit Waschpuffer I und 3mal mit Waschpuffer II gewaschen.

2.2.3 Isolierung von subzellulären Strukturen und Dichtegradienten-Zentrifugation

Lösungen:

- *Homogenisierungspuffer*

Saccharose	250mmol/l
Hepes	20mmol/l
Natriumazid	5mmol/l
pH 7,4	
- *Gradientenpuffer*

Hepes	20mmol/l
Natriumazid	5mmol/l
pH 7,4	

Zur Analyse einzelner Zellkompartimente und Organellen wurden Zellhomogenate im Dichtegradienten aufgetrennt. Hierbei wurden subzelluläre Strukturen nach ihrer Dichte aufgetrennt.

Vorbereitung der Homogenate:

Zellen wurden in den Zellkulturschalen mehrmals mit PBS gewaschen. Mit 1ml Homogenisierungspuffer (inklusive 20µl PI Mix) wurden Zellen von zwei Schalen in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Zellen wurden vereinzelt und mechanisch aufgebrochen, in dem sie mehrmals durch eine Spritze (Omnifix-F 1ml, B.Braun, Melsungen, Deutschland) passagiert wurden. Für einen ergiebigen Aufschluss wurden die Zellen jeweils 20mal mit einer 21G- und anschließend einer 24G-Kanüle (B.Braun) homogenisiert. Zellkerne, größere Zelltrümmer und erhaltene Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 1000xg entfernt. Der resultierende Überstand, *Post Nuclear Supernatant (PNS)*, wurde für die Dichtegradienten-Zentrifugation eingesetzt.

Erstellen des Gradienten:

Die Gradienten wurden kontinuierlich mit Hilfe eines Mischers (Amersham) hergestellt. Dafür wurden Saccharose-Lösungen von 10% und 50% vorbereitet. 5ml jeder Zucker-Lösung wurden jeweils in eine Kammer überführt und der Gradient wurde in 12,5ml Ultrazentrifugenröhrchen gegossen. Anschließend wurde der PNS vorsichtig auf den Saccharose-Gradienten pipettiert. Die Zentrifugation wurde bei 155.000xg für 2,5h in der Ultrazentrifuge (Optima XL-100K, Beckman Coulter, Krefeld) im Ausschwingrotor (SW40) durchgeführt.

Anschließend wurden 1ml Fraktionen, von oben beginnend, abgenommen und für weitere Analysen im Western Blot oder für die Immunpräzipitation verwendet.

2.2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde durchgeführt nach der Methode von Bradford [Bradford 1976]. Bei dieser Bestimmung werden Proteine in Lösung gemessen, indem sich diese mit dem Farbstoff (Brillant Blue G) zu einem Komplex formieren. Dies führt zu einer Erhöhung des Absorptionsmaximums von 464nm auf 595nm, wobei die Menge der Absorption proportional zur vorhandenen Proteinmenge ist.

Nach Messung von Doppel- oder Dreifachansätzen der Standards und der zu bestimmenden Proben, wurden die Proteinmengen mittels der Eichkurve berechnet.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (-PAGE)

Lösungen:

- *3x Lämmli-Puffer*
 - 6% SDS
 - 30% Glycerol
 - 150mM Tris-HCl, pH 6,8
 - 0,02% Bromphenolblau
 - 150mM DTT

- *Elektrophoresepuffer*
 - 3,028g/l Tris
 - 14,4g/l Glycin
 - 1g/l SDS

- *Färbelösung* zum Anfärben von Proteinen in einem Polyacrylamidgel
 - 0,1% Coomassie Brillant Blau
 - 25% Isopropanol
 - 10% Essigsäure

- *Entfärber* zur Fixierung und Entfernung des überschüssigen Farbstoffs
 - 25% Isopropanol
 - 10% Essigsäure

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele mit diskontinuierlichem Puffersystem verwendet [Laemmli 1970; Naim et al. 1991]. Um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen, wurden die Proben mit 3x Lämmli-Puffer versetzt und 6 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, wobei das Trenngel je nach Proteingröße in der Dichte variiert wurde. Neben den Proben wurde noch ein Proteinstandard als Marker (Roti ®-Mark Standard, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Er dient zur Kontrolle des Gellaufs und zur Charakterisierung der aufgetrennten Proteine. Die Elektrophorese läuft über Nacht in dem Protean®II Xi Cell-System von BioRad in Elektrophoresepuffer mit konstant 6 oder 7 mA.

Puffer/ Lösungen:	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 15%
H ₂ O, destilliert	15,6ml	12,3ml	6,9ml
Acrylamid	3,9ml	10,3ml	15ml
1M Tris, pH 6,8	2,9ml	-	-
1,5M Tris, pH 8,8	-	7,7ml	7,7ml
10% SDS	230µl	310µl	310µl
TEMED	23µl	23µl	23µl
10% APS	230µl	310µl	310µl

Mit der Färbelösung wurden die Proteine im Gel angefärbt und anschließend fixiert. Für die Detektion wurden die Gele bei 85°C auf Filterpapier vakuumgetrocknet und auf einem Phosphoscreen (Fuji, Düsseldorf, Deutschland) exponiert. Die Auswertung erfolgte mit dem BIO-RAD Molecular Imager®FX und der Software *Quantity One*.

2.2.6 Western Blot

Lösungen:

- *10xTransferpuffer*
192mM Glycin
25mM Tris
- *Blockpuffer*
5% Milchpulver in PBS
- *Waschpuffer*
0,05% Tween 20 in PBS

Die Analyse mittels Western Blot ist eine weitere immunologische Methode zum Nachweis von Proteinen. Dafür werden die Proteine aus der SDS-PAGE auf eine Membran transferiert und können dort im immobilisierten Zustand durch Bindung von Antikörpern detektiert werden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel und die PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham Biosciences) 10 Minuten in 1xTransferpuffer (mit zusätzlich 10% Methanol) equilibriert. Gemäß einem Transport von Minus nach Plus wurde aus Filterpapieren, Gel und Membran ein „Sandwich“ gebildet und dieses in die Apparatur eingebaut. Der

Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran läuft 30-90 Minuten und mit einer Stromstärke von 3,5mA pro cm² bei Raumtemperatur.

Nach dem Transfer wurde entweder erst eine Ponceau S (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) -Färbung durchgeführt oder direkt mit dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen begonnen. Dafür wurde die Membran für 1h in 20ml Blockpuffer geschwenkt.

Anschließend folgte die Bindung des primären Antikörpers in unterschiedlicher Verdünnung (2% Milchpulver in PBS, siehe Tabelle). Die Inkubation läuft mindestens 1h bei Raumtemperatur oder maximal über Nacht bei 4°C.

Einsetzen der Primärantikörper:

<u>Antigen:</u>	<u>Firma:</u>	<u>Spezies/ Klon/ Isotyp:</u>	<u>Verdünnung:</u>
EEA-1	Dianova	Kaninchen / polyklonal	1:2.000
Lamp-2	BD Pharmingen	Maus / H4B4/ IgG1	1:5.000
HLA-I	Hybridoma, ATCC	Maus / W6/32/ IgG2a	1:5.000
HLA-II	Dako, Hamburg	Maus / CR3/43/ IgG1	1:500
PDI	Stressgen	Maus / IgG1	1:5.000
GM130	BD Pharmingen	Maus / 35 / IgG1	1:500
BiP	Sigma	Kaninchen / Antiserum	1:3.000
Rab11	B. Goud	Kaninchen / polyklonal	1:1.000
Gliadin	Sigma	Kaninchen / polyklonal	1:2.000

Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mit Waschpuffer gewaschen.

Der sekundäre Antikörper ist mit einer Peroxidase (*Horse raddish peroxidase, HRP*) gekoppelt und wurde 1:10.000 in 2%-iger Milch/PBS-Lösung verdünnt. Für die Bindung wurde die Membran 30-60 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde wieder mit dem Waschpuffer abgespült.

Die Detektion erfolgte mit dem Super-Signal-Reagens von der Firma Pierce. Die Peroxidlösung und die Luminol/Verstärker-Lösung wurden zu gleichen Teilen gemischt und für etwa eine Minute auf der Membran inkubiert. Die Signale, in Form von Chemilumineszenz, wurden auf einem Röntgenfilm (Kodak) ausgewertet.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten I: DNA und RNA

Das Ziel dieser Arbeiten ist das Generieren von RNA-Sonden für die Durchführung einer *in situ* Hybridisierung in Biopsien von Zöliakiepatienten (siehe Kapitel 2.6.1). Nach RNA-Isolation und reverser Transkription wurde die Ziel-cDNA in Transkriptionsvektoren kloniert. Mit Hilfe dieser Vektoren wurde dann *in vitro* cRNA hergestellt, die für den Nachweis von RNA in den Biopsien eingesetzt wurde.

Im folgenden Versuchsablauf wird beschrieben, wie für die Gewebstransglutaminase 2 (*tissue transglutaminase, tTG2*) und HLA-DR die cRNA hergestellt wurde.

2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen und cDNA-Synthese

RNA-Isolation:

Die Gewinnung der Gesamt-RNA aus einer Fibroblasten Zelllinie (wt510) und DR3 homozygoten B-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des RNeasy mini kits® der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Dafür wurde 1/10 einer konfluent gewachsenen Zellschale eingesetzt und Isolation nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die isolierte RNA wurde in Aliquots bei -80°C gelagert und für die cDNA-Synthese verwendet.

cDNA-Synthese:

Die Synthese der „*full-length*-cDNA“ wurde mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthese Kits®“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.2 PCR: Isolierung der tTG2 und HLA-DR aus der cDNA

Aus der synthetisierten cDNA wurden mittels PCR [Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1986] Fragmente der Gewebstransglutaminase 2 (*tTG2*; NM_004613, NCBI) aus den Fibroblasten und HLA-DR (NM_019111, NCBI) aus der B-Lymphozyten cDNA amplifiziert. Die Sequenz des tTG-Fragments umfasst etwa 1200 bp, das HLA-DR Fragment ca. 730 bp.

Folgende PCR-*Primer* wurden dafür von der Firma Sigma angefertigt:

tTG2 for	CGGGGTACCCCGGGCATGGTCAACTGCAACGATG Umfasst die Sequenz von 776 bis 795 und eine <i>Acc65I</i> Schnittstelle
tTG2 rev	CCCAAGCTTGGGCTCCACAGTGAAGGTGCAGC Umfasst die Sequenz von 1956 bis 1974 und eine <i>HindIII</i> Schnittstelle
DR for	CGGGGTACCATGAGCGCTCAGGAATCATGG Umfasst die Sequenz von 133 bis 153 und eine <i>Acc65I</i> Schnittstelle
DR rev	CGGAAGCTTCCTCCATGTGCCTTACAGAGG Umfasst die Sequenz von 838 bis 860 und eine <i>HindIII</i> Schnittstelle

Zur Amplifizierung der Fragmente wurde folgender PCR-Ansatz von 50µl Gesamtvolumen verwendet, wobei die eingesetzte Menge der cDNA zwischen 50ng und 150ng lag. Die verwendeten Reagenzien wurden von der Firma QBiogene (Heidelberg) bezogen:

5µl PCR-Puffer	(200mM Tris HCl (pH9,0 bei 25°C), 250mM KCl, 100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15mM MgSO ₄ , 1% Tween20, 1mg/ ml BSA)
1µl dNTP mix	(5mM wässriger Lösung von dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
2µl cDNA	
5µl Primer 1	(10pmol/µl in deionisiertem Wasser)
5µl Primer 2	(10pmol/µl in deionisiertem Wasser)
1µl ISIS™ DNA Polymerase	(1U/µl in 20mM Tris-HCl (pH 8,0), 100mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol, 0,5% Tween20, 0,5% Nonidet P40, und 50% Glycerol gelagert)
31µl dH ₂ O	

Durchgeführt wurde die PCR in einem Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) nach folgendem Standardprogramm, wobei die Elongationszeit bei dem tTG-Fragment 3,5 Minuten und bei HLA-DR nur 2,5 Minuten betrug.

Insgesamt wurden 35 PCR-Zyklen (2. – 4.) durchgeführt:

1. Vordenaturierung	95°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	1 min
3. Primerannealing	55°C	1 min
4. Elongation	72°C	2,5 bzw. 3,5 min
5. Finale Elongation	72°C	10 min
6. Pause 4°C bis zur Weiterverarbeitung		

2.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Lösungen:

- 3M Natriumacetat
- TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) zum Aufnehmen der DNA
1mM EDTA
50mM Tris-HCl; pH 8,0

Für die Weiterverarbeitung der DNA wurde jeweils der komplette PCR-Ansatz auf ein Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande des PCR-Produktes wurde nach dem Gellauf ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe der *Freeze-squeeze*-Methode [Thuring et al. 1975; Naim et al. 1991] aus dem Gel isoliert:

1. Das Gelstück wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und im flüssigen Stickstoff gefroren.
2. Zwischen Parafilmstreifen wurde das Stück gepresst und die freiwerdende Flüssigkeit in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgefangen.
3. Für die Fällung der DNA wurden 0,1 Volumen Natriumacetat (3M) und 2-3 Volumen absoluter Ethanol dazugeben.
4. Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei -80°C inkubiert.
5. Durch eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm, 4°C (Kendro Biofuge 15R) wurde die DNA pelletiert.
6. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen.
7. Das gereinigte und getrocknete Pellet wurde anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

2.3.4 Präparativer Restriktionsverdau und Ligation

Restriktionsverdau:

Mit den oben aufgeführten PCR-Primer wurden in die amplifizierte DNA zusätzliche Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Acc65I* und *HindIII* eingefügt (2.3.3). Mit diesen Enzymen wurden die aufgereinigten PCR-Produkte sowie die Transkriptionsvektoren pTZ19R (Fermentas, St. Leon-Rot) und pGEM-4Z (Promega, Mannheim) geschnitten.

Ansatz 50 oder 100µl:

DNA	(1-3 µg/ml)
Enzyme	(1U/ µg DNA)
Puffer	(2x Y ⁺ Puffer 66mM Tris-Acetat; pH 7,9; 20mM Mg-Acetat, 132mM K-Acetat, 0,2mg/ml BSA)
Wasser	add 50, bzw. 100µl

Der Ansatz wurde für 1,5 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden der geschnittenen Vektor-DNA und der *Template*-DNA wurden ausgeschnitten und die DNA nach der *Freeze-Squeeze*-Methode isoliert (2.3.4).

Ligation:

Lösungen:

- *10x Ligationspuffer*
5M Tris; pH 7,4
1M MgCl₂
1M DTT

- *10xATP*
10mM ATP in dH₂O

Die Konzentration der DNA nach der *Freeze-Squeeze* Isolierung wurde im Agarosegel im Vergleich zum Standard ermittelt (siehe 2.4.7). Die für die Ligation eingesetzte molekulare Menge der *Insert*-DNA entsprach der 2-3-fachen Menge von der Vektor-DNA.

Das Endvolumen des Ligationsansatzes entsprach 20µl:

1. Die DNA wurde in dem benötigten Volumen dH₂O aufgenommen und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.
2. Die DNA wurde für 2 Minuten auf Eis gekühlt und
3. anschließend wurden 2µl des 10xLigationspuffer, 2µl ATP und 0,5µl T4 Ligase (5U/µl) hinzugefügt.
4. Der Ansatz wurde gemischt und zentrifugiert.
5. Die Ligation erfolgte für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.
6. Der Ansatz wurde anschließend zur Transformation von *E.coli*-Bakterien eingesetzt (2.4.3).

2.4 Molekularbiologische Arbeiten II: Bakterienkultur

2.4.1 Verwendeter *E.coli*-Stamm

Transformationskompetente *E.coli*-Bakterien (XL1-Blue) wurden von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Der Genotyp dieses Stammes ist:

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacqZΔM15 Tn10 (Tetr)]c

Die Herstellung chemisch superkompetenter Zellen erfolgte nach der von Sambrook (2001) beschriebenen Methode.

2.4.2 Verwendete Lösungen und Puffer

- *LB-Medium (Luria Bertani)* zur Vermehrung und Selektion von Bakterien
 - 1% Bacto-Trypton
 - 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt
 - 1% NaCl

Zur Selektion wurde dem Medium ein entsprechendes Selektionsantibiotikum (50mg/ml Ampicillin) zugefügt.

Für die Herstellung fester Nährböden wurde das Medium mit 1,5% Bacto Agar versetzt und nach Autoklavierung in Kulturschalen gegossen.

2.4.3 Transformation von *E.coli*

Die Transformation von kompetenten Zellen wurde modifiziert nach der Methode von [Hanahan 1983] durchgeführt.

1. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu jedem Ligationsansatz wurden 50µl kompetente Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten, wobei die Ansätze alle 10 Minuten geschwenkt wurden.

2. Anschließend erfolgte der so genannte Hitzeschock: die Zellen wurden 90 sek. bei 42°C erwärmt und daraufhin wieder für 5 Minuten auf Eis inkubiert.
3. Es wurden 900µl 37°C-warmes LB-Medium hinzugegeben und die Zellen werden 1h bei 37°C geschüttelt.
4. Darauf wurden die Bakterien 30-60 sek. bei 6.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien mit 100µl LB-Medium vorsichtig resuspendiert.
5. Da die Plasmide eine Ampicillinresistenz aufweisen, wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen Agarböden ausgestrichen und wuchsen über Nacht bei 37°C.

2.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Die Plasmidpräparationen wurden mittels einer alkalischen Lyse durchgeführt. Dem Protokoll liegen die Methoden von [Birnboim and Doly 1979] und das Protokoll von Sambrook (2001) zugrunde.

Lösungen zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien:

- *Lösung 1:*
25mM Tris-HCl (pH 8.0)
10mM EDTA (pH 8,0)
- *Lösung 2:*
0,2N NaOH
1% SDS
- *Lösung 3:*
Zur Herstellung einer Lösung, die 3M Kalium und 5M Acetat enthält, wurden auf 100ml gemischt:
60ml 5M Kaliumacetat
11,5ml Eisessig
28,5ml dH₂O

Analytische Minipräparation

Für eine analytische Minipräparation wurde eine Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte in 5ml LB-Medium unter Zusatz von 2µl/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C im Schüttler angezüchtet.

1. 1,5ml der Bakteriensuspension wurde bei 8.000 rpm für 2 Minuten pelletiert (Biofuge fresco Heraeus) und der Überstand wurde verworfen.
2. Das Pellet wurde in 100µl Lösung 1 (inklusive RNase A) und durch vortexen resuspendiert. Hierbei werden die Bakterienwände durch den Entzug von Calciumionen durch das EDTA destabilisiert.
3. Die Lyse und Denaturierung der DNA erfolgte durch die Zugabe von 200µl Lösung 2 und mischen der Suspension.
4. Durch Zugabe von 150µl Lösung 3 wurde die Suspension neutralisiert - die dadurch denaturierten Proteine sowie die chromosomale DNA präzipitieren mit dem Kaliumsalz aus, nicht jedoch die Plasmid-DNA.
5. Nach 10-20 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte die Sedimentation der Salze durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm.
6. Der Überstand, mit den enthaltenden Plasmiden, wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit absolutem Ethanol (1ml) gefällt.
7. Anschließend wurde die DNA durch 15 Minuten zentrifugieren bei 13.000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen.
8. Das Pellet wurde 1-3mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 30µl TE-Puffer aufgenommen.
9. Die DNA wurde daraufhin durch einen Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese (siehe 2.4.7) überprüft, um die positiven Klone zu ermitteln.

Midipräparation

Für die Isolierung größerer Mengen an DNA wurden 50µl einer Übernachtskultur oder 10µl aus Glycerolkulturen in 150ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37°C angezüchtet.

Bevor mit der Midipräparation begonnen wurde, wurden aus der gewachsenen Kultur Glycerolkulturen angelegt. Dafür werden 500µl Glycerol mit 500µl Bakterienkultur in einem 1,5ml Gefäß gemischt und unmittelbar bei -80°C gelagert.

Die Midipräparation ist analog zu der oben beschriebenen analytischen Minipräparation:

1. Die verbliebene Bakterienkultur wurde in 250ml verschraubbare Polypropylen Zentrifugenbecher (Beckman) überführt und 5 Minuten bei 5.000 rpm, 4°C, zentrifugiert (Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).
2. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien wurden in 6ml Lösung 1 (inklusive RNase A) resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur darin inkubiert.
3. Anschließend wurden 12ml von der Lösung 2 hinzu gegeben und der Becher vorsichtig geschwenkt.
4. Nach 10 Minuten wurden 9ml der Lösung 3 hinzugefügt, vorsichtig geschüttelt und 20 Minuten auf Eis inkubiert.
5. Die ausgefallenen Kaliumsalze wurden durch einen Zentrifugationsschritt, 30 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C sedimentiert, und der Überstand wurde durch Filterpapier filtriert und in neue Zentrifugenröhrchen halbiert (35ml *Snap Cap* Polypropylen, Beckman).
6. Der filtrierte Überstand wurde mit 30ml eiskaltem Isopropanol versetzt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei 12.000 rpm über 15 Minuten zentrifugiert (Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld), um die Plasmid-DNA aus der wässrigen Lösung zu fällen.
7. Der Überstand wurde abgegossen, und das Pellet wurde 2mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet.
8. Das getrocknete Pellet wurde dann in 300µl TE-Puffer aufgenommen und nochmals mit RNase behandelt (30µl RNase A; 30 Minuten bei 37°C), um RNA vollständig zu entfernen.
9. Zur Überprüfung der DNA wurde an dieser Stelle eine Restriktionsanalyse durchgeführt, bevor die Plasmide weiter aufgereinigt wurden.

Für die Reinigung der DNA von verbliebenen Proteinen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt:

1. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol:Chloroform kräftig gemischt und 1 Minute bei 13.000 rpm, 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Deutschland).
2. Nach einer Zentrifugation wurde die wässrige Phase, die DNA enthaltend, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit der gleichen Menge Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert.

3. Der zweite Schritt wird noch einmal wiederholt und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt.
4. Zur Fällung der DNA wurden 0,7 Volumenanteile Isopropanol und 30µl 3M Natriumacetat-Lösung dazugegeben, vorsichtig geschüttelt und 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert.
5. Das Pellet wird 3mal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und abschließend in 500µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C, bzw. wurde für größere Zeiträume bei -20°C gelagert.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260nm am Photometer (Jenway, Genova). Für die Reinheitsbestimmung wurde die DNA bei 280nm gemessen, um Verunreinigungen wie Proteine zu erfassen. Dabei gilt:

$$A_{260} = 1 \text{ OD entspricht } 50\mu\text{g/ml DNA}$$

Der Quotient OD₂₆₀/280 gibt den Reinheitsgrad an. Der Wert sollte zwischen 1.8-2.0 liegen. Die DNA-Lösung wurde 1:1.000 mit TE verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Die Messung erfolgte bei 260nm gegen TE. Die Konzentration ließ sich dann wie folgt berechnen.

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{gemessene OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

2.4.6 Restriktionsanalysen von DNA

Die Restriktionsenzyme des Typs II schneiden an genau definierten Stellen die DNA und sind somit ein essentielles Werkzeug für Klonierungsarbeiten. Ein Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen wird zum einen als Kontrolle einer Klonierung und Amplifizierung von Plasmid-DNA eingesetzt, dient aber auch der Verifizierung von DNA für die Ligation eines Konstruktes (*Insert*) in einen Vektor (Kapitel 2.3.5).

Dafür wurden 2µl der Mini- oder Midipräparation (ca. 1µg Plasmid-DNA) mit 2µl enzyspezifischem Puffer, 15,8µl dH₂O und 0,2µl (2U) des entsprechenden Restriktionsenzym gemischt, so dass der Gesamtansatz 20µl betrug. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei der enzyspezifischen Temperatur inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.4.7 Analyse von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Lösungen:

- *TAE-Puffer* (Tris-Aacetat-EDTA-Puffer) zum Gießen der Gele
1mM EDTA
40mM Tris-Acetate; pH 8,0

- *TE-Puffer* (Tris-EDTA-Puffer) zum Aufnehmen der DNA
1mM EDTA
50mM Tris-HCl; pH 8,0

- *Probenpuffer* zum Beladen der Gele
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30% Glycerol in Wasser

Analytische und präparative Agarosegelelektrophoresen wurden durchgeführt, um einerseits die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen (PCR-Produkte, Fragmente nach Restriktionsanalysen) und andererseits, um PCR-Produkte als Vorbereitung für Ligationen aufzureinigen.

Je nach Fragmentgröße wurde eine 0,8 bis 1,0%-ige Agaroselösung mit TAE-Puffer hergestellt und diese zum Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzt [Sharp et al. 1973]. Die Auftrennung läuft bei einer konstanten Spannung von 100V. Die anschließende Analyse des Gels erfolgte mit Hilfe eines Photoimagers (Biorad). Als Standard-Referenzmarker wurde, die mit *EcoRI* / *HindIII* verdaute DNA des Phagen λ der Firma MBI Fermentas gewählt.

2.5 Molekularbiologische Arbeiten III: Herstellung von RNA-Sonden

RNA-Sonden binden stärker als DNA-Sonden und sind daher wesentlich sensitiver. Für ihre Herstellung kloniert man die cDNA, bzw. eine Sequenz der cDNA in einen Vektor, der SP6, T7 oder T3 Bindungsstellen besitzt. Mit der jeweiligen RNA-Polymerase lässt sich dann *in vitro* die cRNA synthetisieren [Melton et al. 1984; Schenborn and Mierendorf, Jr. 1985].

2.5.1 In vitro Transkription und Markierung der Sonden

Bevor die Plasmide für die *in vitro* Transkription eingesetzt werden, müssen sie am Ende des *Inserts* (*downstream* der Promotorstelle und der DNA Insertion) durch ein Restriktionsenzym linearisiert werden. Auf diese Weise schließt man aus, dass die RNA Vektorsequenzen enthält, und man erhält zudem RNA von definierter Länge.

Dafür werden 15µg Plasmid für 2h mit 40U Enzym in 100µl Gesamtvolumen geschnitten:

	tTG2-pGEM-4Z	tTG2-TOPO	DR-pGEM-4Z	Spätere Sonde:
T7		<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	→ anti-sense
SP6	<i>HindIII</i>		<i>HindIII</i>	→ sense
Verdau:				
DNA	8,52µl	11,54µl	10,56µl	
Puffer	10µl	10µl	10µl	
Enzym	4µl	4µl	4µl	
Wasser	77,48µl	74,46µl	75,44µl	

Zur Reinigung der DNA wurde nach dem Restriktionsverdau eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt:

1. Es wurden 100µl Phenol:Chloroform zu jedem Ansatz gegeben, gut gemischt und 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus).
2. Die wässrige Phase mit der DNA wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl Chloroform gemischt und erneut 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert.

3. Die wässrige Phase wurde erneut in ein frisches Gefäß überführt und die DNA mit 300µl absolutem Ethanol gefällt. Dafür wurde die Mischung für 1,5h bei -20°C inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert.
4. Das Pellet wurde einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und getrocknet.
5. Das getrocknete Pellet wurde in 10µl RNase-freiem dH₂O resuspendiert.
6. Die Konzentration der DNA wurde daraufhin im Agarosegel im Vergleich zum Standard bestimmt.

In vitro Transkription:

Die RNA wurde mit DIG (Digoxigenin) – markierten UTP markiert (Roche).

Für die Transkription wurden von jedem Plasmid etwa 1µg linearisierte DNA in einem Gesamtvolumen von 20µl eingesetzt:

	tTG2- pGEM4Z	tTG2- TOPO	DR-pGEM- 4Z	DR-pGEM-4Z
T7		<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	
SP6	<i>HindIII</i>			<i>HindIII</i>

Transkriptionspuffer 10x	2,0µl	2,0µl	2,0µl	2,0µl
Ribonuklease Inhibitor (50u)	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl
DIG RNA <i>labeling mix</i>	2,0µl	2,0µl	2,0µl	2,0µl
<i>Template</i> (1µg)	5,0µl	9,0µl	5,0µl	9,0µl
RNA-Polymerase	2,0µl (SP6)	2,0µl (T7)	2,0µl (T7)	2,0µl (SP6)
H ₂ O	8,5µl	4,5µl	11,5µl	4,5µl

Die einzelnen Ansätze wurden gemischt, zentrifugiert und für 2h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C abgestoppt und die RNA anschließend gefällt, um ungebundene Nukleotide zu eliminieren.

Fällung der RNA:

Zu jedem Transkriptionsansatz wurden 0,1 Volumen 4M Lithiumchlorid und 2,5 Volumen absoluter Ethanol gegeben, gut gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die gefällte RNA wird durch eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 15.000 rpm, 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die getrocknete RNA wird in RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der effektiven Markierung

Lösungen:

- *Maleinsäurepuffer*
100mM Maleinsäure
150mM NaCl; pH 7,5

- *Blockpuffer*
1% Blockreagenz (Roche Diagnostic, Penzberg) in Maleinsäurepuffer

- *Waschpuffer*
0,3% Tween20 in Maleinsäurepuffer

- *Puffer III*
100mM Tris-HCl; pH 9,5
100mM NaCl
100mM MgCl₂

- *NBT-Stocklösung* (Nitroblau Tetrazolium Chlorid),
ist ein Redox-Indikator in Kombination mit XPO₄ für die Detektion der
alkalischen Phosphatase
75mg/ml in 70% DMF (Dimethylformamid)

- *XPO₄-Socklösung*, als Substrat für die alkalische Phosphatase
50mg/ml in DMF

- *Kontroll-Sonde*
5µg/50µl; Böhringer Mannheim

Mit Hilfe eines Dot Blots wurde eine Konzentrationsbestimmung der Sonde über eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Die Detektion erfolgte am Ende mit einer immunologischen Reaktion gegen DIG-markierte Nukleotide der RNA.

1. Von jeder erstellten Sonde sowie der Kontroll-Sonde wurden folgende Verdünnungen hergestellt: 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ und 1:10⁶.

2. Von jeder Verdünnung wurde 1µl auf eine Nylon-Membran (Amersham Biosciences) aufgetragen und getrocknet. Durch eine Bestrahlung bei 254nm für 30 Sekunden wurden die Nukleinsäuren auf der Membran fixiert.
3. Die Membran wurde für einige Minuten in Maleinsäurepuffer equilibriert und anschließend für 30 Minuten in 1% Blockreagenz in Maleinsäure geblockt.
4. Der AP (alkalische Phosphatase) gekoppelte anti-DIG-Antikörper (*sheep* anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) wurde 1:10.000 in Blockpuffer verdünnt und die Membran 30 Minuten in der Lösung inkubiert.
5. Anschließend wurde überschüssiger oder ungebundener Antikörper durch zweimaliges waschen von 5 Minuten mit Waschpuffer entfernt.
6. Die Membran wurde dann 2 Minuten in Puffer III equilibriert, bevor die Färbung gestartet wurde.
7. Für die Färbung wurden 45µl NBT- und 35µl XPO₄-Lösung in 10ml von Puffer III pipettiert und die Lösung über Nacht im Dunkeln auf der Membran inkubiert.
8. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt, und die Membran wurde getrocknet und archiviert.
9. Die Auswertung der einzelnen Sonden erfolgte im Vergleich zur Kontrolle.

2.5.3 Northern Blot

Lösungen:

- *5xRNA-Puffer*
- *Probenpuffer*
- *20xSSC-Puffer*
3M NaCl
0,3M Natriumcitrat; pH 7,0

- *(Prä-) Hybridisierungslösung*
2x SSC, 10mM DTT, 1 mg/ml Heringssperma-DNA
500µg/ml Hefe-tRNA, 1mg/ml BSA, 50% Formamid

- *Puffer I*
100mM Tris; pH 7,5
150mM NaCl

- *Waschpuffer*
Puffer I mit 0,3% Tween 20

- *Blockpuffer*
1% Blockreagenz (Roche Diagnostic, Penzberg, Deutschland) in
Maleinsäurepuffer

Im Northern Blot wurde die Spezifität der Sonden überprüft, um auszuschließen, dass die Sonden an ribosomale Untereinheiten binden. Dafür wurde RNA aus Fibroblasten und RNA aus DR3 B-Lymphozyten im Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran geblottet und anschließend mit den Sonden hybridisiert.

RNA-Isolation:

Die Gesamt-RNA von Fibroblasten (510wt) und DR3 B-Lymphozyten wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits von der Firma Qiagen isoliert (siehe Kapitel 2.3.2).

Die Konzentration der RNA wurde anschließend am Photometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden 9µl DEPC-Wasser und 1µl der isolierten RNA in eine Quarzküvette pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260/280nm gemessen.

RNA-Gel:

Für die Agarosegelelektrophorese wurde 1,0g Agarose in 60ml DEPC-Wasser erhitzt und gelöst. Wenn die Agarose gelöst war, wurden 20ml Formaldehyd und 20ml 5xRNA-Puffer dazugegeben und das Gel wurde in der Gelkammer (PEQLab) gegossen.

Es wurden jeweils 1-10µg RNA in Probenpuffer (plus 1µl Ethidiumbromid) aufgenommen, bei 60°C für 10 Minuten denaturiert und aufgetragen. Das Gel wurde für 1h bei 30V gestartet und dann auf 15V heruntergeschaltet und über Nacht laufen gelassen.

Northern Blot:

Der Northern Blot wird unter Ausnutzung von Kapillarkräften in einem Hochsalzpuffer durchgeführt (Abbildung 2.1). Dabei wird SSC-Puffer durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen, die RNA wandert mit und bleibt auf der Membran hängen.

Aufbau:

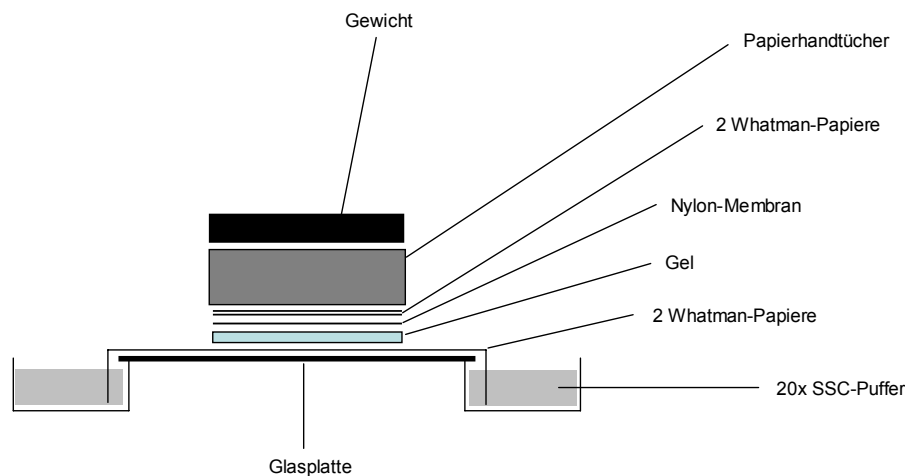


Abb. 2.1: Aufbau des Northern Blots.

Das Gel und die Membran wurden zwischen Whatman-Papieren und Papierhandtüchern gestapelt, mit einem Gewicht beschwert und über Nacht inkubiert. Auf Grund von Kapillarkräften wandert die RNA aus dem Gel auf die Nylonmembran.

Abbau:

1. Nach Beendigung des Blots wurde die Membran für 5 Minuten in 2x SSC geschüttelt und das Gel im UV-Licht überprüft, ob die RNA komplett auf die Membran transferiert wurde.
2. Anschließend wurde die Membran auf Whatman-Filter getrocknet und die DNA durch bestrahlen mit UV-Licht (30 sek. 254nm) kovalent an die Membran gebunden.
3. Mit Methyleneblau (0,5M Natriumacetat, 0,04% Methyleneblau; pH 5,3) wurde die Membran für 30 Minuten gefärbt.
4. Daraufhin wurde die Membran für 10 Minuten in 25%-igem Ethanol fixiert und für weitere 10 Minuten in DEPC-H₂O gewaschen.
5. Nachdem die Membran getrocknet wurde, wurden die Banden markiert, die Membran fotografiert und eingeschweißt.

Hybridisierung:

1. Die Membran wurde in Hybridisierungsröhrchen gegeben und mindestens 2h bei 72°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Mit diesem Schritt sollen verbleibende freie Bindungsstellen abgesättigt werden.

2. Anschließend wurde die Sonde in den Hybridisierungspuffer gegeben, 10 Minuten bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurde die Prähybridisierungslösung gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Hybridisierung erfolgte über Nacht.

Detektion:

3. Die Membran wurde zweimal 15 Minuten in 2xSSC/0,1% SDS (auf 70°C vorgewärmt) im Röhrchen gewaschen.
4. Danach wurde die Membran zweimal 30 Minuten in 70°C vorgewärmtem 0,1x SSC/0,1% SDS gewaschen.
5. Anschließend wurde die Membran 3 Minuten in Puffer I bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt.
6. Als nächstes wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und für 30 Minuten mit Blockpuffer bei RT inkubiert.
7. Für die Antikörperreaktion wurde der Antikörper (anti-DIG-AP; siehe oben) 1:10.000 in dem Blockpuffer verdünnt und für 30 Minuten auf der Membran inkubiert.
8. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen.
9. Bevor die Färbelösung gegeben wurde, wurde die Membran im Puffer III 2mal 5 Minuten equilibriert.
10. CSPD wurde 1:200 in Puffer III verdünnt und für 5 Minuten auf der Membran, in einer Folie eingeschweißt, inkubiert.
11. CSPD wurde dann aus der Folie herausgestrichen, die Membran wieder eingeschweißt und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
12. Die Detektion erfolgte durch die Exposition eines Röntgenfilmes.

2.6 Morphologische Untersuchungen

2.6.1 In situ Hybridisierung (ISH) in Biopsien

Das Ziel der *in situ* Hybridisierung besteht darin, die mRNA eines bestimmten Gens sichtbar zu machen, um auf diese Weise die gewebs- oder zellspezifische Expression eines Proteins nachzuweisen. Die Methode wurde ursprünglich von John *et al.* sowie Pardue und Gall entwickelt [John *et al.* 1969; Pardue and Gall 1969].

Die Digoxigenin (DIG) Methode basiert auf einem aus *Digitalis* Pflanzen isolierten Steroid, welches an die Position C-5 von Uridin-Nukleotiden verknüpft ist [Holtke *et al.* 1990; Kessler *et al.* 1990] und von RNA-Polymerasen eingebaut wird. Der Nachweis erfolgt durch eine enzymatische Umsetzung der Alkalischen Phosphatase. Für die Reaktion wird 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat/ Nitroblau Tetrazolium (BCIP/NBT) eingesetzt, was zu einem braun-violetten Präzipitat führt. Diese Detektion bietet die Möglichkeit einer guten Lokalisation im Gewebe, ist sehr sensitiv und das Präzipitat sehr stabil [De Jong *et al.* 1985].

Die ISH wurde modifiziert nach der Methode von der Arbeitsgruppe von Gabrielle Plenz im Institut für Arterioskleroseforschung in Münster durchgeführt [Plenz *et al.* 1997; Plenz *et al.* 1999].

Lösungen:

- *5xTE-Puffer*
50mM Tris-HCl, pH 8,0
5mM EDTA

- *TBS (Tris buffered salt solution)*
50mM Tris, pH 7,5
150mM NaCl

- *Tris-Glycine*
100mM Tris-HCl; pH 7,0
100mM Glycin

- 20x SSC
3M NaCl
0,3M Natriumcitrat; pH 7,0
- *Hybridisierungslösung (HB)*
2x SSC, 10mM DTT, 1mg/ml Heringssperma-DNA
500µg/ml Hefe-tRNA, 1mg/ml BSA, 50% Formamid
- *Puffer I*
100mM Tris; pH 7,5
150mM NaCl
- *Puffer III*
100mM Tris-HCl; pH 9,5
100mM NaCl
50mM MgCl₂
- *Färbelösung:*
100ml Puffer III mit 335µg/ml NBT, 174 µg/ml XPO₄ und 240µg/ml Levamisol

Vorbereitung der Präparate und der Kryoschnitte:

Prähybridisierung:

1. Die Gewebeschnitte auf Objektträgern wurden 10 Minuten bei 50°C getrocknet und 3mal mit 5x TE-Puffer gespült.
2. Das Gewebe wurde daraufhin mit 2µg/ml Proteinase K in TE-Puffer bearbeitet und mit Tris-Glycin gewaschen.
3. Anschließend wurden die Präparate nochmals 10 Minuten in 4% PFA fixiert und 3mal 5 Minuten TBS gewaschen.

Hybridisierung:

1. Für die Prähybridisierung wurde die HB-Lösung 10 Minuten bei 80°C denaturiert und anschließend 2h bei 52°C im Schüttelwasserbad auf den Gewebeschnitten inkubiert.

2. Für die Hybridisierung wurden die Sonden in einer Konzentration von 0,2µg/ml oder 4µg/ml in der HB-Lösung verdünnt und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Schüttelwasserbad.

Posthybridisierung:

1. Die HB-Lösung wird mit 4x SSC entfernt und anschließend wurde jeweils 2mal 15 Minuten mit 2x SSC, 1x SSC und abschließend mit 0,2x SSC gewaschen. Alle Waschschriffe fanden bei 52°C mit vorgewärmten Lösungen statt.

Detektion:

2. Die Objektträger wurden 5 Minuten bei RT in Puffer I inkubiert.
3. Die Präparate wurden daraufhin 1h in 0,5% Blockreagens in Puffer I geblockt.
4. Nachdem das Blockreagens (Roche) entfernt wurde, folgte die Inkubation des Antikörpers (anti-DIG-AP, siehe oben) für 1h mit einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockreagens.
5. Anschließend wurde 2mal 15 Minuten mit 0,05% Tween20 in Puffer I gewaschen.
6. Die Objekte wurden für 15 Minuten mit Puffer III (inkl. 1mg/ml Levamisol zur Inhibierung der endogenen alkalischen Phosphatase) inkubiert.
7. Die Präparate wurden für 30 Minuten bis über Nacht in der Färbelösung gelagert und die Reaktion wurde abschließend in 5x TE-Puffer abgestoppt.
8. Vor dem Eindecken der Schnitte wurden die Objektträger in DEPC-Wasser gespült. Das Eindecken erfolgte mit Mounting Medium Glycergel (Dako).
9. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop Axioskop von Zeiss (Göttingen, Deutschland).

2.6.2 Immunfluoreszenz

Lösungen:

- *Paraformaldehyd (PFA)* zum Fixieren von Zellen
4g PFA in 50ml dH₂O lösen (trübe Lösung), mit NaOH die Lösung klar werde lassen (pH ~ 10,5-12,3), mit 2x PBS auf 100ml auffüllen und mit 5M HCl auf pH 7,4 bringen.
Aliquots bei -20°C lagern und frisch auftauen

- *Blockpuffer*
0,5% Saponin
1% BSA
in PBS pH 7,4
- *Mounting Medium*
2,4g Mowiol
6g Glycerol (99,5%)
12ml 0,2 M Tris; pH 8,5

Einsetzen der Primärantikörper:

<u>Antigen:</u>	<u>Firma:</u>	<u>Spezies/ Klon/ Isotyp:</u>	<u>Verdünnung:</u>
HLA-I	Dianova	Maus / B9.12.1 / IgG2a	1 :200
HLA-I	Hybridoma, ATCC	Maus / W6/32/ IgG2a	1 :200
HLA-II	Dako, Hamburg	Maus / CR3/43/ IgG1	1 :400
Beta2Mikroglobulin	Nordic, Tilburg	Kaninchen / polyklonal	1 :150
EEA-1	Dianova	Kaninchen / polyklonal	1 :250
Cathepsin D	Dako, Hamburg	Kaninchen poly / Vollserum	1 :100
Lamp-2	BD Pharmingen	Maus / H4B4/ IgG1	1 :150
Caspase-3	BD Pharmingen	Kaninchen / polyklonal	1 :100
R5	Mendez, Madrid	Maus / R5 / IgG2a	1 :75
Gliadin	Sigma	Kaninchen / polyklonal	1 :150
OVA	Strobel, Plymouth	Kaninchen / polyklonal	1 :250

Für die Analysen mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Glasdeckgläsern in einer 24-Loch-Platte gezüchtet.

Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden 2-5mal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 4%-igem Paraformaldehyd in PBS fixiert wurden. Das Paraformaldehyd wurde anschließend durch zweimaliges waschen mit PBS wieder entfernt. Zur Reduktion der Autofluoreszenz wurden die Zellen 2mal 10 Minuten mit Ammoniumchlorid (50mM in PBS) inkubiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Präparate für 30-60 Minuten mit Blockpuffer bedeckt.

Darauf folgte die Inkubation der Antikörper im Blockpuffer in 30-40µl Tropfen auf Parafilm. Es fand stets eine Doppelmarkierung statt, wobei jeder Antikörper einzeln gegeben wurde. Zwischen den einzelnen Antikörper-Inkubationen wurden die Zellen mit

Blockpuffer 3-4mal gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nach der letzten Inkubation wurde ebenfalls 3-4mal mit Blockpuffer und abschließend 3-4-mal mit PBS gewaschen. Bevor die Deckgläschen mit Mounting Medium (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) oder Mowiol (Fluka BioChemika, Steinheim, Schweiz) auf Objektträger geklebt wurden, wurde jedes Präparat kurz durch destilliertes Wasser gezogen.

Die Proben wurden mindestens über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Analyse erfolgte dann mit dem konfokalen Laser-Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland).

2.6.3 Konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Leica TCS SP1I Mikroskop unter Verwendung einer 63-fachen Planachromat Linse (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland).

2.6.4 Kryo-Immunelektronenmikroskopie

Die Entwicklung dieser Technik basiert insbesondere auf den Arbeiten von Tokusaysu und Griffith [Tokuyasu 1978; Griffiths et al. 1984]. Bei dieser Methode werden Ultradünnschnitte (40 bis 80nm) bei einer Temperatur von ca. -100°C hergestellt. Dieses Verfahren hat zum einen den Vorteil, dass die Schnitte aus minimal kleinen nativ kryokonservierten Proben erstellt werden können, wodurch die zelluläre Integrität, antigene Determinanten und Proteinstrukturen erhalten bleiben.

Als morphologische Methode bietet sie die Möglichkeit, Proteine innerhalb einer Zelle nachzuweisen und exakt ihren intrazellulären Aufenthaltsort in den Kompartimenten zu analysieren (rein statische Verteilung). Durch die extrem geringe Schnittdicke wird in der elektronenmikroskopischen Auswertung (bis zu 40.000-fache Vergrößerung) ein sehr genauer Einblick in die Ultrastruktur der Zellen und ihrer subzellulären Einheiten erreicht. Ein Nachteil dieser Technik liegt in der sehr geringen Menge an Proteinen innerhalb der ultradünnen Gefrierschnitte.

Erkennbar wird das gesuchte Protein durch das Einsetzen von primären Antikörpern zusammen mit goldkonjugierten Sekundärantikörpern.

Die Goldpartikel erscheinen im Mikroskop als elektronendichte Punkte, die in ihrer ultrastrukturellen Verteilung derjenigen des untersuchten Antigens entsprechen. Dabei besteht die Option zu Simultanmarkierungen zur Visualisierung von zwei Antigenen und zur indirekten Analyse von Transportprozessen.

Zellpräparation:

Lösungen:

- *Paraformaldehyd (PFA) -PIPES* zum Fixieren von Zellen

Lösung A: PFA

100ml H₂O auf 60°C erhitzen, 10g PFA zugeben und 1M NaOH zugeben bis die Lösung klar ist

Lösung B: PIPES Puffer (0,4M)

12,096g PIPES in 80ml H₂O lösen, mit 5M NaOH auf pH 7,0 einstellen und mit H₂O auf 100ml auffüllen.

Lösung A und Lösung B werden 1:2 gemischt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

- *PVP-Saccharose:*

Polyvinylpyrrolidone, PVP-10 (MW 10.000); Sigma

2,4ml H₂O und 0,6ml einer 1,1M Na₂CO₃-Lösung in ein Gefäß geben und unter ständigem rühren 3g PVP langsam hinzu geben. Nachdem PVP vollständig aufgelöst ist, werden 7ml von 2,3M Saccharose-PBS-Lösung addiert und das Gemisch wird bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wird der Ansatz bei 4°C gelagert und sollte 1 Woche alt sein, bevor er zum Einbetten eingesetzt wird.

Die HT29 Zellen wurden mit 5% PFA-PIPES in der Kulturschale fixiert (über Nacht 4°C), vom Schalenboden geschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 10.000 rpm abzentrifugiert und in Gelatine eingebettet. Das Pellet wurde dann in kleinere Stücke aufgeteilt, über Nacht in PVP-Saccharose inkubiert und auf Nägeln platziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Versuchsdurchführung für Ultra-Kryo Versuche:

Lösungen:

- *FKS:*
FKS (Gibco) wird mittels PBS zu einer 5%- bzw. 10%-Lösung angesetzt
- *Uranylacetat:*
Saures Uranylacetat (Merck): 4% Lösung in dH₂O herstellen und 3-4mal filtrieren
- *Methylcellulose (2%):*
100ml dH₂O werden auf 95°C erhitzt und 2g Methylcellulose unter Rühren hinzugefügt. Diese Lösung muss weitere 3 Tage bei 4°C gerührt werden und wird abschließend bei 300.000xg 90 min (4°C) zentrifugiert werden (Beckman Ti 70).

Einsetzen der Primärantikörper:

<u>Antigen:</u>	<u>Firma:</u>	<u>Spezies/ Klon/ Isotyp:</u>	<u>Verdünnung:</u>
HLA-DR	Peters, Amsterdam	Kaninchen / polyklonal	1:100
Lamp-2	BD Pharmingen	Maus / H4B4/ IgG1	1:20
WB6/8	Ciclitira, London	Maus / WB8 / IgG1	1:20
Gliadin	Sigma	Kaninchen / polyklonal	1:50

Die Schnitte (60nm dick) werden bei einer Blocktemperatur von -110°C und einer Messertemperatur von -100°C mit dem Leica EM Ultramikrotom (Leica, Wien, Österreich) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Netze platziert und für die Immundetektion eingesetzt [Zimmer *et al.* 1995]:

1. 15 Minuten in 10% FKS blockieren.
2. 45 Minuten wurde der primäre Antikörper in 5% FKS verdünnt (5µl Tropfen je Netz) inkubiert.
3. Überschüssiger Antikörper wurde durch waschen mit PBS entfernt.
4. 45 Minuten wurde der jeweilige Sekundärantikörper (mit Goldpartikel gekoppelt) in 5% FKS verdünnt inkubiert.
5. Durch erneutes waschen mit PBS wurde überschüssiger Antikörper entfernt.

6. Weiteres waschen mit dH₂O.
7. Inkubation der Schnitte mit Uranylacetat/Methylcellulose im Verhältnis 1:10 auf Eis. Hierbei werden die Ultradünnschnitte vor Austrocknung geschützt und gleichzeitig kontrastiert [Tokuyasu 1978].
8. Überschuss an Uranylacetat/ Methylcellulose wurde mit Platinösen auf Filterpapier abgestreift, und die Netze wurden abschließend an der Luft getrocknet und archiviert.

Elektronenmikroskopie:

Die Auswertung der durchgeführten Versuche fand mit Hilfe des Elektronenmikroskops EM 208 der Firma Philips (Eindhoven, Niederlande) statt. Dazu wurden die markierten Ultradünnschnitte mit einer 14.000- bis 30.000-facher Vergrößerung betrachtet und zur Dokumentation Fotos auf Kodak Elektronenmikroskopiefilm 4489 (Rochester, New York, USA) erstellt.

2.7 Übersicht der verwendeten Chemikalien

Acrylamid	Rotiphorese Gel30, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Fluka, Steinheim, Schweiz
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Tryptone	BD Biosciences
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Pasching, Österreich
Chloroform	Roth
D ithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
E thanol	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth

Ethidiumbromid	Merck
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco
FITC (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)-Dextran 70kD	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Magnesiumchlorid (Mg ₂ Cl)	Merck
Moviol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure (BES)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Nonidet P40 (NP40)	Fluka
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin-Streptomycin-Glutamin (PSG)	Gibco
Phenol	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton-X-100	Sigma
Tween 20	Roth

2.8 Übersicht der verwendeten Enzyme

Ligase T4	MBI Fermentas
Proteaseinhibitoren	Roche Diagnostics
1mM PMSF	
1µg/ml Pepstatin A	
1µg/ml Antipain	
5µg/ml Leupeptin	
5µg/ml Aprotinin	
50µg/ml Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor	
Restriktionsenzyme und Puffer	MBI Fermentas
<i>Acc 65I</i> (Puffer O ⁺ , 50mM TrisHCl, pH7,7 bei 37°C; 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 0,1mg/ml BSA)	
<i>Hind III</i> (Puffer R ⁺ , 10mM TrisHCl, pH8,5 bei 37°C; 10mM MgCl ₂ , 100mM KCl, 0,1mg/ml BSA)	
<i>Eco RI</i> (Puffer EcoRI, 50mM TrisHCl, pH7,5 bei 37°C 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 0,02% TX-100, 0,1mg/ml BSA)	
RNase A (10mM Tris; pH 7,5; 15mM NaCl)	10 mg/ml Stocklösung, Roche
RNAse Inhibitor	MBI Fermentas
SP6 RNA Polymerase	Roche Diagnostics
T7 RNA Polymerase	Roche Diagnostics

3 Ergebnisse

3.1 HLA-Expression in intestinalen Zelllinien

Die Untersuchung zur HLA-Expression intestinaler Epithelien erfolgte beispielhaft in immortalisierten, intestinalen Epithelzelllinien (HT29, Caco-2 und T84).

3.1.1 Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

Die Zelllinien HT29, Caco-2 und T84 wurden ursprünglich aus Kolonkarzinomzellen entwickelt (siehe 2.1.1), entsprechen jedoch dem intestinalen Phänotyp. Sie exprimieren verschiedene Enzyme oder Hydrolasen der Bürstensaummembran des Dünndarms. So kann die Saccharase-Isomaltase (SI) z. B. in Caco-2 Zellen oder die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) in HT29 nachgewiesen werden (Abb. 3.1). SI, DPP IV und auch die Aminopeptidase N werden, sowohl in den Kulturzellen als auch in den Enterozyten im Dünndarm, zur apikalen Membran differenzierter Zellen transportiert [Alfalah et al. 2005].

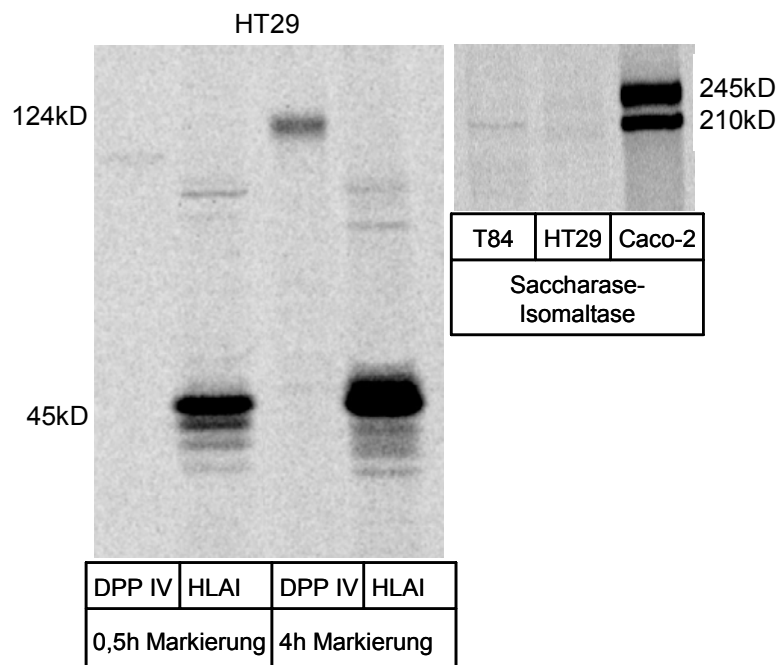


Abb. 3.1: Die Zellen exprimieren Hydrolasen der Bürstensaummembran.

Die verschiedenen Zelllinien wurden biosynthetisch mit ^{35}S Methionin markiert und anschließend lysiert. Aus den Lysaten wurden DPP IV, SI und HLA I immunpräzipitiert und auf einer 8%- bzw. 5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. (A) In HT29 ist nach 30 Minuten Markierung bereits eine leichte Mannose-reiche DPP IV-Bande zu beobachten. Nach 4h ist die reife Form des Enzyms deutlich zu erkennen. (B) Die SI ist in T84 und HT29 kaum nachweisbar, jedoch sehr stark in Caco-2 Zellen exprimiert.

Die Zellen bilden nach Konfluenz einen dichten Rasen in der Kulturschale, der durch Zell-Zell-Kontakte an den Tight Junction verbunden ist. Wie im Darm bilden die Zellen so einen geschlossenen Epithelverband. Tight Junction werden ausgebildet, wenn die Zellen ihre Polarität erlangen (Kapitel 1.3.2). Ein Protein dieses Komplexes ist das ZO-1. Mittels der indirekten Immunfluoreszenz (siehe 2.6.2) kann ZO-1 an den Tight Junction sichtbar gemacht werden. So kann überprüft werden, ob polare Zellen bereits differenziert sind, und eine geschlossene Zellschicht bilden. Markierte Caco-2 Zellen zeigen das typische wabenähnliche Muster, das bei polarisierten Zellen im Zellverband auftritt (Abb. 3.2).

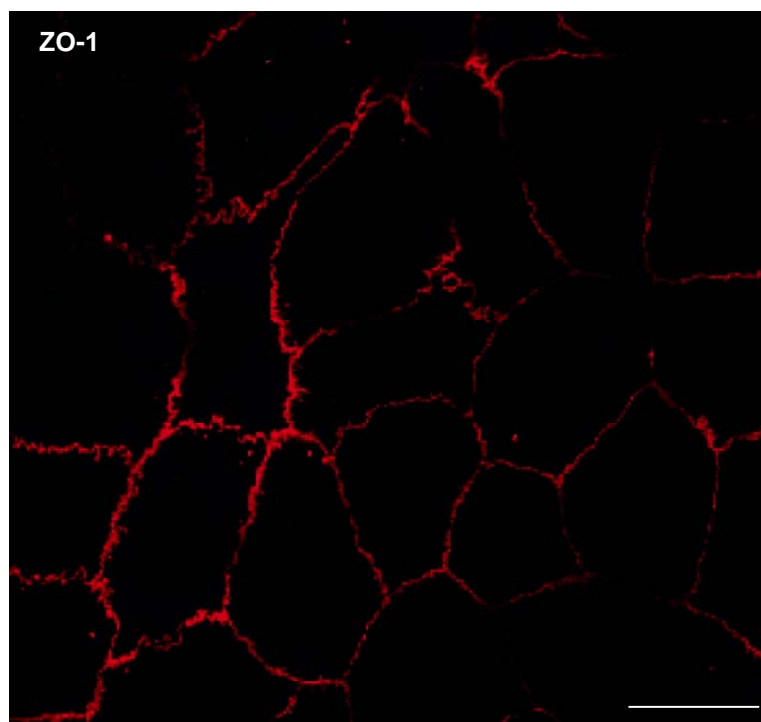


Abb. 3.2: *Die Zellen bilden ein geschlossenes Epithel.*

Caco-2 Zellen wurden für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet und fixiert. Die Tight Junction wurden mit Hilfe des anti-ZO-1 Antikörpers markiert und mit dem Farbstoff AlexaFluor 568 sichtbar gemacht. Die Zellen bilden ein in sich geschlossenes Epithel durch Zell-Zell-Kontakte.

Scale = 20µm

Die Zellen haben folglich die Eigenschaft einer Dünndarmzelle und bilden dabei ein dichtes Epithel aus polarisierten Zellen. Im Weiteren werden die HLA-Eigenschaften der Zellen untersucht und anschließend die in vitro Experimente mit Gliadin besprochen.

3.1.2 HLA-Typisierung der verwendeten Zelllinien

Zunächst wurden die drei Zelllinien hinsichtlich ihrer HLA-Subtypen charakterisiert. Die Typisierung erfolgte durch die Transfusionsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Prof. Blasczyk.

Da bereits beschrieben wurde, dass die Zöliakie mit den Klasse II-Molekülen HLA-DQ2 und -DQ8 assoziiert ist [Koning 2003], bzw. auch ein Zusammenhang zur Klasse I (HLA-A2) vermutet wird [Gianfrani et al. 2003], erfolgte die Typisierung mit dem Ziel, Zöliakie-relevante HLA-Subtypen der Linien zu identifizieren.

Caco-2:

HLA-A2 (02011/0209/0243N), -B62, -Cw4
HLA-DR4 (*DRB1*0404*), -DQ8 (*DQB1*0302/0311*)

HT29:

HLA-A1, -A24, -B35, -B44, -Cw4
HLA-DR7 (*HLA-DRB1*07011*), -DR4 (*DRB*0402*)
HLA-DQ2 (*DQB1*0202*), -DQ8 (*DQB1*0302/0311*)

T84:

HLA-A2 (02011/0209/0243N,*2402101/24023/2409N/2411N), -A24,
-B18, -B35, -Cw4, -Cw7
HLA-DR1, -DR9, -DQ9, -DQ5

Tabelle 1: Ergebnisse der HLA-Typisierung.

In allen Zelllinien sind HLA Klasse I und II vertreten. Caco-2 und T84 exprimieren HLA-A2, diese entsprechen jedoch nicht dem beschriebenen Subtyp HLA-A 0201, der mit Zöliakie in Verbindung steht. Ebenso verhält es sich mit HLA-DQ2 bei den Caco-2 und HT29 Zellen, sie exprimieren lediglich die β -Kette jedoch nicht die entsprechende α -Kette. Diese beiden Zelllinien exprimieren den Zöliakie-assoziierten Subtyp HLA-DQ8.

Die, in den untersuchten Zelllinien gefundenen HLA-DQ2 und -DQ8 Subtypen entsprechen jedoch nicht exakt denen, die als Zöliakie-assoziiert beschrieben werden. Wie aus der Abbildung 1.3 zu entnehmen ist, tragen die meisten Zöliakiepatienten die Gene *DQA1*0501-DQB1*0201* oder *DQA1*0505-DQB1*0202* [Sollid et al. 1989; Sollid 2002]. In den HT29 Zellen liegt zwar die β -Kette HLA-*DQB1*0202*, jedoch nicht die entsprechende α -Kette vor. DQ2 Moleküle, die zusammen mit DR7 exprimiert werden, bestehen aus alpha 0201 und beta 0202. Diese Kombination steht nicht im Zusammenhang mit der Zöliakie. HLA-DQ8 besteht aus einer alpha-Kette 0301 und beta-Kette 0302, so dass Caco-2 und HT29 Zellen die Zöliakie-assoziierten Varianten tragen

[persönliches Gespräch mit F. Koning; 2006]. T84 Zellen exprimieren keine für die Zöliakie relevanten Subtypen der HLA Klasse II-Antigene. Die HLA-A2-Antigene in den Caco-2 und T84 Zellen entsprechen nicht dem Subtyp HLA-A*0201, der von Gianfrani und Kollegen beschrieben wurde [Gianfrani et al. 2003].

3.1.3 Analysen der HLA-Expression und –Lokalisation in den Zellen

Enterozyten exprimieren HLA Klasse I-Moleküle konstitutiv, wie es für nahezu jede andere Körperzelle der Fall ist (ausgenommen sind rote Blutkörperchen, Keim- und Nervenzellen). HLA Klasse II-Antigene wiederum werden hauptsächlich von professionell Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gebildet [Waßmuth 1995]. Unter inflammatorischen Bedingungen sind jedoch auch verschiedene Epithelzellen, wie z. B. die der Niere oder die des Dünndarms, in der Lage HLA II-Moleküle zu exprimieren. In der Zellkultur wurden die Zellen mit Interferon (IFN)- γ inkubiert, um die Expression dieser Proteine zu stimulieren.

Für die Analyse im Western Blot (siehe 2.2.6) wurden HLA Klasse II-Proteine aus Lysaten von unstimulierten und stimulierten HT29 Zellen, bzw. B-Lymphozyten nachgewiesen (siehe 2.1.1). Die B-Lymphozyten exprimieren homozygot den HLA II-Subtyp HLA-DR3 und dienen als Kontrolle für die Detektion von HLA II aus HT29 Zellen. HLA Klasse II-Dimere (ca. 60kD) sind SDS-stabil, zerfallen jedoch in ihre Untereinheiten (ca. 30kD), wenn sie vor dem Gellauf bei 95°C gekocht werden (siehe auch Kapitel 1.2.2).

Der eingesetzte Antikörper (CR3/43) erkennt ein Epitop der β -Kette, das homolog in allen HLA Klasse II-Molekülen vorkommt. In den B-Lymphozyten ist sowohl die dimere Form als auch die β -Untereinheit nachweisbar (Abb. 3.3, rechte Spuren). Auf der jeweils entsprechenden Höhe im Gel sind das Dimer und die Untereinheit auch in IFN- γ stimulierten HT29 Zellen zu detektieren (Abb. 3. 3; mittlere Spuren). In diesen Zellen liegen zwei verschiedene Glykosylierungsformen der β -Kette vor, da hier eine Doppelbande zu beobachten ist. Unstimulierte HT29 Zellen exprimieren keine HLA Klasse II-Antigene (linke Spuren).

Für die weitere biochemische Analyse der HLA-Expression wurden die Zellen metabolisch mit ^{35}S -Methionin markiert und anschließend lysiert. Die HLA-Komplexe wurden dann durch eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern isoliert und in der SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2).

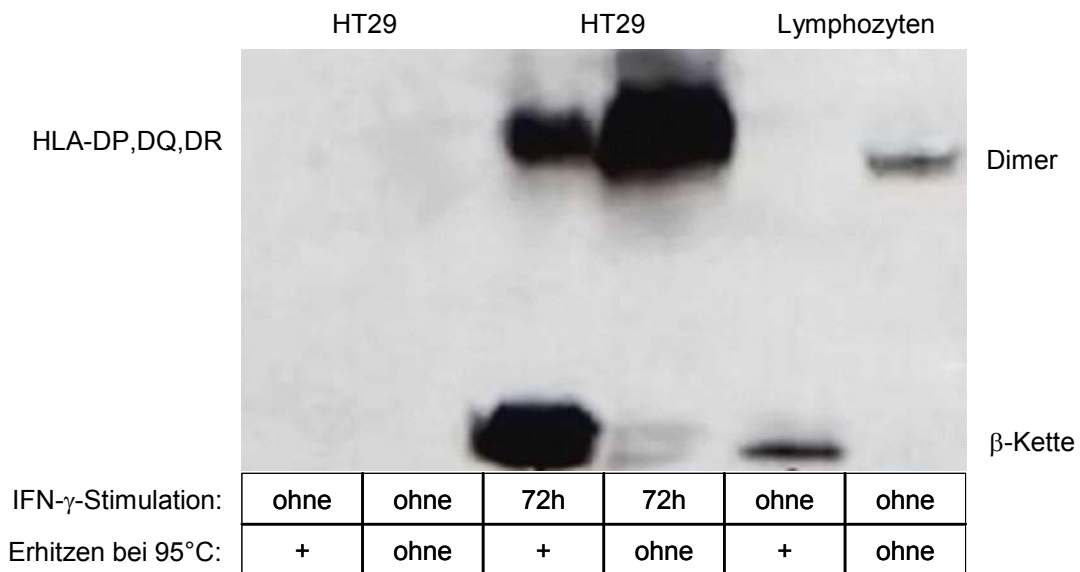


Abb. 3.3: *HLA-Expression in HT29 und B-Lymphozyten.*

Lysate von unstimulierten und IFN- γ (200U/ml) stimulierten HT29 Zellen sowie von DR3 homozygoten B-Lymphozyten wurden auf einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf PVDF-Membran geblottet und mit dem Maus-anti-HLA-II Antikörper CR3/43 detektiert. Die dimere Form und die β -Untereinheit von HLA Klasse II-Proteinen sind in den B-Lymphozyten und in stimulierten HT29 nachweisbar. Dagegen exprimieren unstimulierte HT29 Zellen kein HLA II.

Alle drei Zelllinien HT29 (Abb. 3.4), T84 und Caco-2 (Abb.3.5) exprimieren HLA Klasse I Moleküle. Hier ist sowohl die α -Kette als auch das assoziierte β_2 -Mikroglobulin nachzuweisen. Die Expression ist dabei unabhängig von der Stimulation mit IFN- γ .

HLA Klasse II-Moleküle können in HT29 nach 24-stündiger Stimulation mit IFN- γ nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Nach 72h ist die Expression deutlich erhöht. In den T84 und Caco-2 Zellen zeigen mittels IP auch nach 72h Stunden IFN- γ -Stimulation keine Expression (Abb. 3.5).

In HT29 Zellen konnte auch der HLA II-Subtyp HLA-DR nachgewiesen werden, wenn ein Antikörper verwendet wurde, der nur diesen Subtypen, nicht aber HLA-DQ oder -DP, erkennt (ohne Abbildung). Jedoch konnte der Nachweis von HLA-DQ allein nicht erzielt werden.

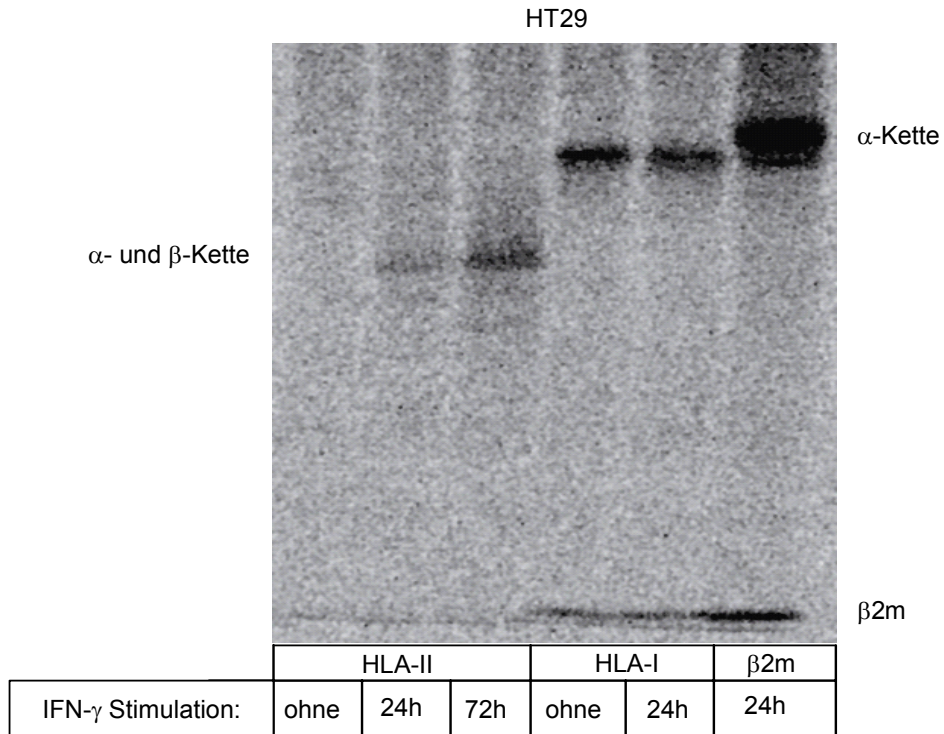


Abb. 3.4: *HLA Klasse I- und II-Expression in HT29 Zellen.*

Immunpräzipitation von HLA-I (W6/32) und II (CR3/43); bzw. β₂-Mikroglobulin in HT29 nach metabolischer Markierung. Ohne Stimulation mit IFN-γ können die Klasse II-Antigene nicht nachgewiesen werden (Spur 1). Klasse I hingegen wird auch ohne Stimulation exprimiert (Spur 4 und 5). HLA Klasse I in Spur 6 wurde durch das assoziierte β₂-Mikroglobulin präzipitiert.

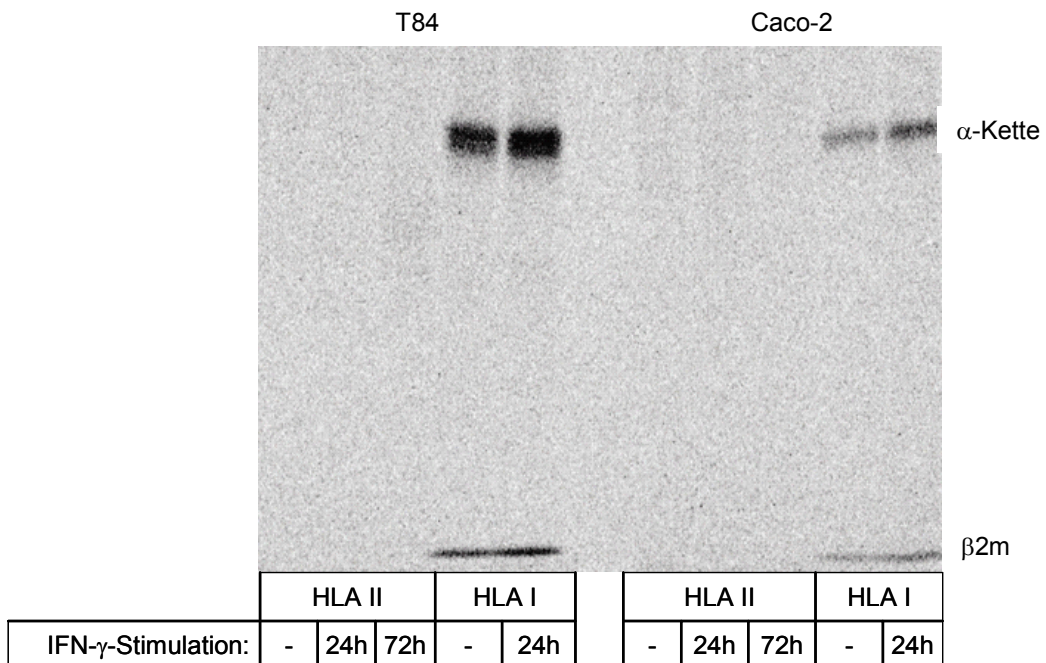


Abb. 3.5: *HLA Klasse I- und II-Expression in T84 und Caco-2 Zellen.*

Die HLA-Komplexe wurden nach radioaktiver Markierung immunpräzipitiert und auf einer 15%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. HLA I kann in beiden Zelllinien sowohl die α-Kette als auch das assoziierte β₂-Mikroglobulin nachgewiesen werden. Klasse II-Moleküle sind in der IP nicht zu detektieren.

Zusätzlich erfolgte die Analyse der Expression von HLA-Molekülen und β_2 -Mikroglobulin mittels konfokaler Lasermikroskopie (siehe 2.6.3). In der Abbildung 3.6 ist eine Kolokalisation zwischen der α -Kette der HLA Klasse I-Moleküle mit β_2 -Mikroglobulin in HT29 zu sehen (A; Pfeile), was für eine Assoziation der beiden Proteine spricht. HLA-II und β_2 -Mikroglobulin zeigen keine Kolokalisation in diesen Zellen (3.6, B).

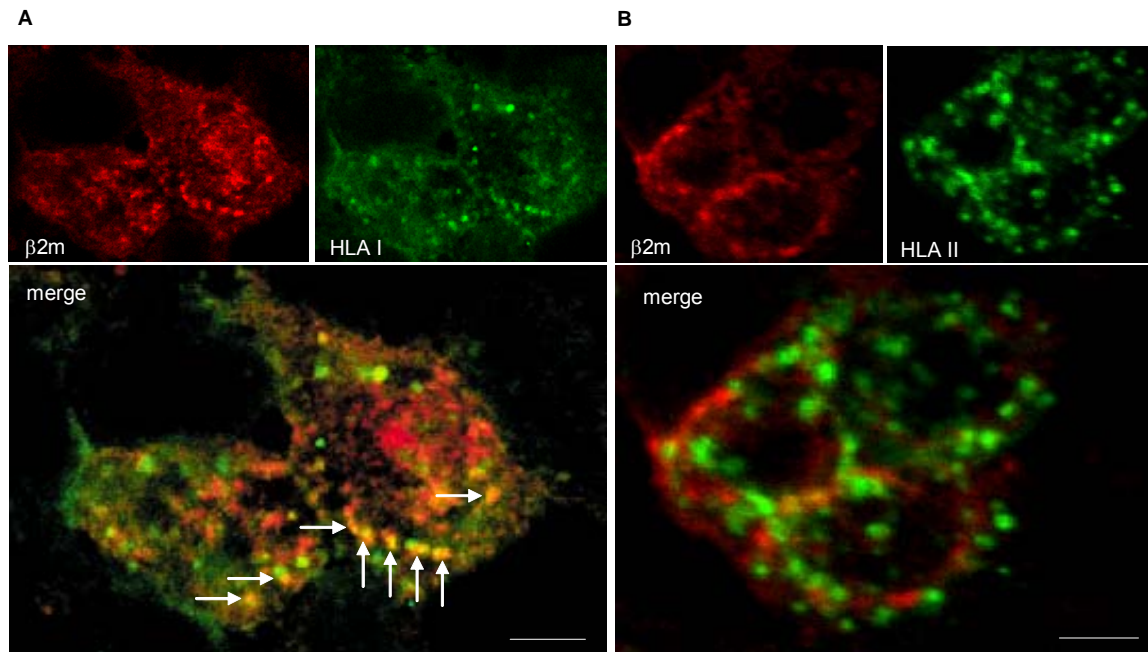


Abb. 3.6: *β_2 -Mikroglobulin kolokalisiert mit HLA Klasse I-Komplexen.* HT29 Zellen wurden mit 800U IFN- γ für 48h stimuliert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Alexa Fluor Farbstoffen 488 (HLA) und 568 (β_2 -Mikroglobulin). In Abb. A kolokalisiert HLA Klasse I mit β_2 -Mikroglobulin (Pfeile), wiederum liegen HLA II-Proteine und β_2 -Mikroglobulin getrennt voneinander in der Zelle vor (B). Scale = 5 μ m

3.1.4 HLA Klasse I-Antigene sind in frühen Endosomen lokalisiert

Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass HLA I-Komplexe in den frühen Endosomen zu finden sind [Chiu et al. 1999]. Da ein Zusammenhang zwischen HLA Klasse I-Molekülen und der Zöliakie beschrieben wurde [Gianfrani et al. 2003], wurde hier geprüft, ob in HT29 Zellen ebenfalls HLA I in frühen Endosomen lokalisiert ist. Dafür wurden diese Endosomen aus dem Gesamthomogenat mittels Immunpräzipitation mit anti-EEA-1-Antikörper isoliert (siehe 2.2.3). Hierzu wurden HT29 Zellen metabolisch mittels 35 S-Methionin radioaktiv markiert, homogenisiert und anschließend erfolgte aus dem PNS die Präzipitation früher Endosomen. Die isolierten Vesikel wurden lysiert und aus dem Lysat

wurden HLA I, bzw. β_2 -Mikroglobulin immunpräzipitiert. In einer SDS-PAGE wurden die isolierten Proteine aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 3.7; siehe auch Kapitel 2.2).

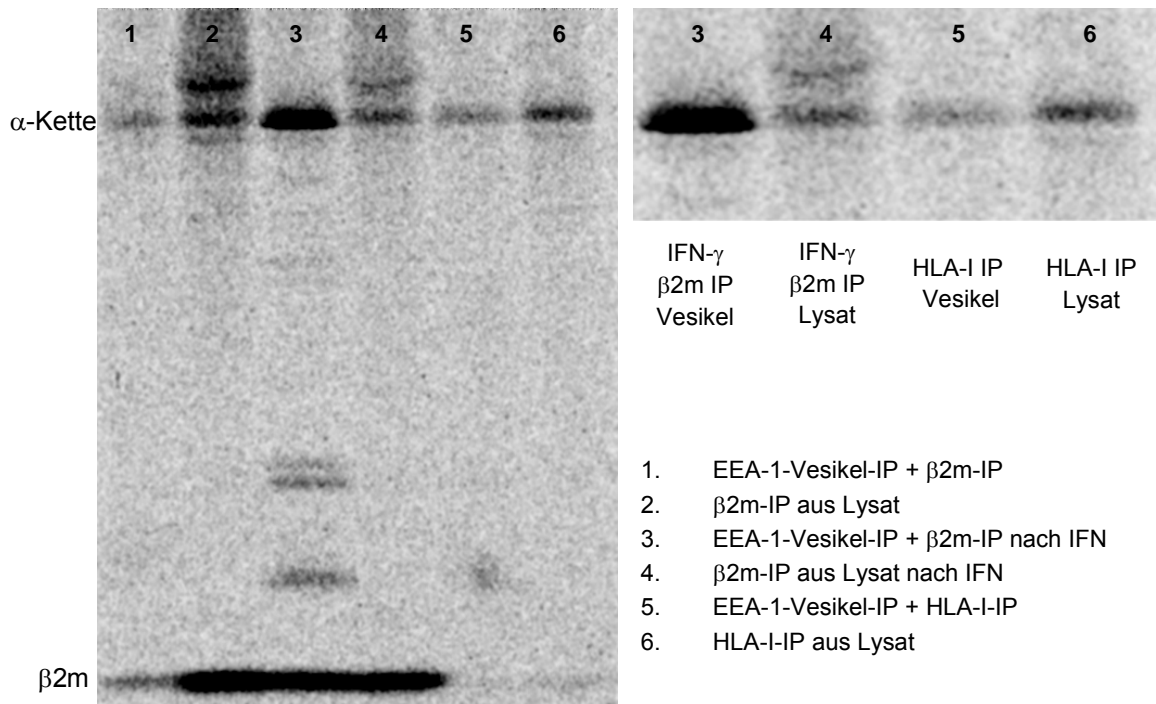


Abb. 3.7: *HLA Klasse I ist in frühen Endosomen lokalisiert.*

HT29 Zellen wurden mit 35 S-Methionin radioaktiv markiert und anschließend homogenisiert. Aus dem Homogenat wurden frühe Endosomen durch eine IP mit EEA-1 isoliert. Die Vesikel wurden darauf lysiert und aus dem Lysat wurden HLA Klasse I-Antigene mit Antikörper gegen HLA-I oder β_2 -Mikroglobulin immunpräzipitiert.

Als Kontrolle wurden ebenfalls aus dem Gesamtlisat HLA I und β_2 -Mikroglobulin immunpräzipitiert (Abb. 3.7 Spur 2, 4 und 6). In den Proben 1, 3 und 5 ist die α -Kette von HLA Klasse I aus dem Lysat von frühen Endosomen zu detektieren. Mittels IP mit dem β_2 -Mikroglobulin Antikörper (Spur 1-4) ist sowohl die α -Kette als auch β_2 -Mikroglobulin nachweisbar. Der HLA I-Antikörper (W6/32) bindet nur die α -Kette und β_2 -Mikroglobulin ist in diesen Proben nicht zu sehen (5 und 6).

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz (siehe 2.6.2) kann ebenfalls eine deutliche Kolo-kalisation von HLA I mit EEA-1 beobachtet werden (Abb.3.8 Bild A). In HT29 Zellen wurden dafür erst HLA I-Proteine mit Alexa Fluor 568 markiert und anschließend wurde EEA-1 mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 detektiert. In der Abbildung A zeigt die gelbe Fluoreszenz eine gemeinsame Lokalisation in den frühen Endosomen.

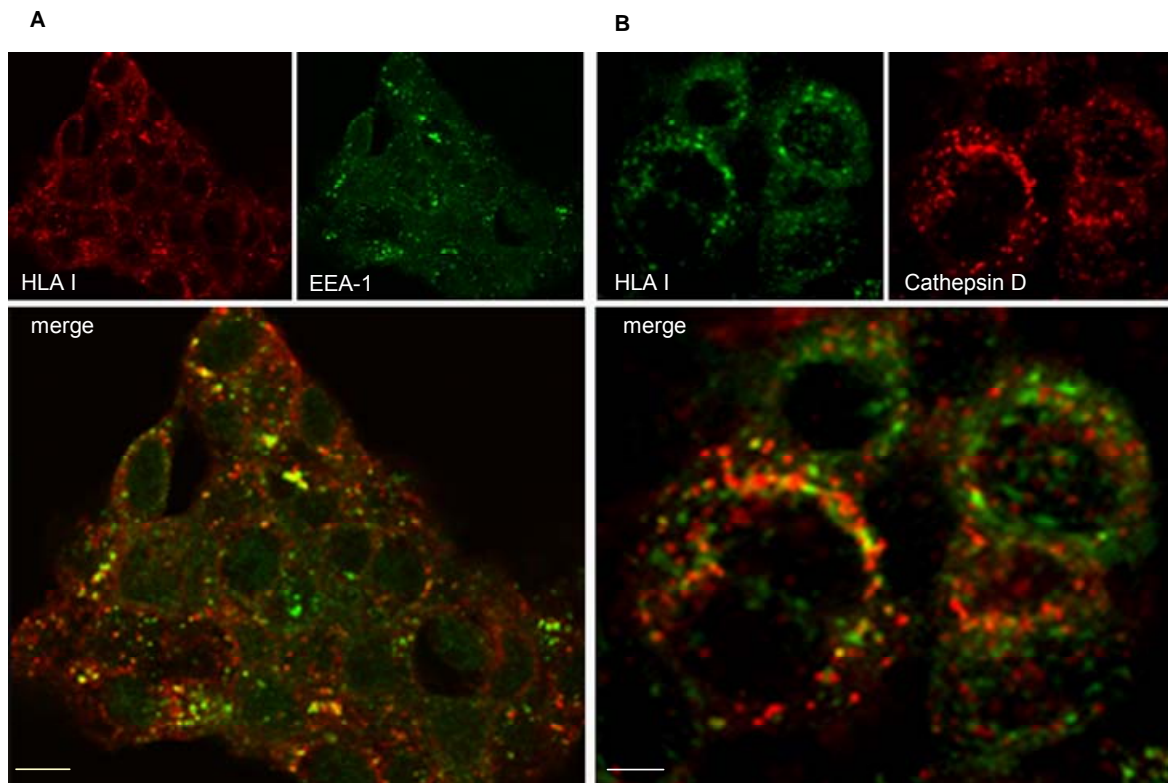


Abb. 3.8: *HLA Klasse I kolokalisiert mit EEA-1, nicht mit Cathepsin D.*

HT29 Zellen wurden mit 400U IFN- γ für 24h stimuliert, 30 min mit FF inkubiert und anschließend für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Alexa Fluor Farbstoffen 488 (grün) und 568 (rot). (A) HLA I ist kolokalisiert mit dem Marker für frühe Endosomen (EEA-1), jedoch nicht mit Cathepsin D in den späten Endosomen (B).

Scale = 10 μ m (A); 5 μ m (B)

HLA Klasse-I zeigt keine Kolokalisation mit Markern später Endosomen. Als solche wurde etwa Cathepsin D (grün), einer Peptidase aus den späten Endosomen oder Lysosomen, eingesetzt (Abb. 3.8B). Die HLA I-positiven, roten Vesikel sind deutlich von den Cathepsin D-positiven, späten Endosomen zu unterscheiden.

Der Nachweis für die Kolokalisation von HLA-Molekülen und späten Endosomen wurde nicht biochemisch durchgeführt, da kein Antikörper zur Verfügung stand, der zytosolische Epitope der Markerproteine bindet. Ohne diese Voraussetzung ist eine Vesikelpräzipitation aus dem Homogenat nicht möglich.

Die Antigene der HLA Klasse II wiederum sind deutlich in den späten Endosomen lokalisiert (Abb. 3.9A). Nach Markierung von HLA II-Proteinen und Cathepsin D sind in der Überlagerung (merge) der beiden einzelnen Signale die Kolokalisationen zu beobachten. Abb. 3.9B zeigt eine Doppelmarkierung der Proteine Lamp-2 und Cathepsin D, die beide Markerproteine für späte Endosomen darstellen. Hier sind ebenfalls starke

Kolokalisierungen zu erkennen. Damit befinden sich die beiden Proteine in denselben Vesikeln von HT29 Zellen und können somit als äquivalente Marker eingesetzt werden.

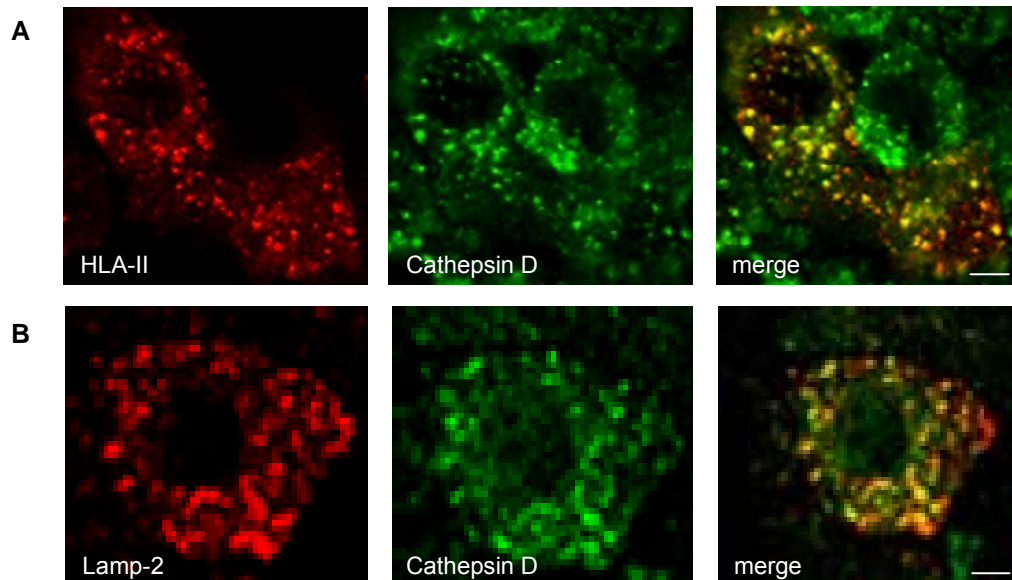


Abb. 3.9: *HLA-Klasse II kolokalisiert mit Cathepsin D in den späten Endosomen.*

HT29 Zellen wurden für 40h mit IFN- γ (400U) stimuliert und daraufhin fixiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem jeweiligen Primärantikörper und Alexa Fluor Farbstoffen 488 (Cathepsin D) und 568 (HLA-II und Lamp-2). A: HLA-II Komplexe sind in denselben Vesikeln mit Cathepsin D zu detektieren. HLA-II ist dementsprechend in späten Endosomen lokalisiert. B: Die beiden Markerproteine für die späten Endosomen oder Lysosomen, Lamp-2 und Cathepsin D, sind deutlich kolokalisiert. Sie stellen damit dasselbe Kompartiment dar und können äquivalent als Marker für die späten Endosomen verwendet werden.

Scale = 5 μ m

3.1.5 HLA I-Expression wird durch Inkubation mit FF erhöht

In anderen Studien konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass Gliadin einen Einfluss auf Enterozyten hat. So wurde beschrieben, dass das Zytoskelett sich unter Einwirkung von Gliadin verändert [Clemente et al. 2003; Sander et al. 2005] oder die Expression von MICA erhöht ist [Hue et al. 2004]. In den folgenden Experimenten sollte der Effekt des Gliadins auf die Expression der HLA-Moleküle in epithelialen Zellen untersucht werden. Dafür wurden HT29 Zellen mit oder ohne Frazer's Fraction über Nacht bei 37°C inkubiert und mit 35 S-Methionin metabolisch markiert.

Nach Lyse der Zellen und Immunpräzipitation der Antigene, erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung und autoradiographische Detektion (siehe 2.2) von HLA Klasse I und II-Antigenen (Abb. 3.10).

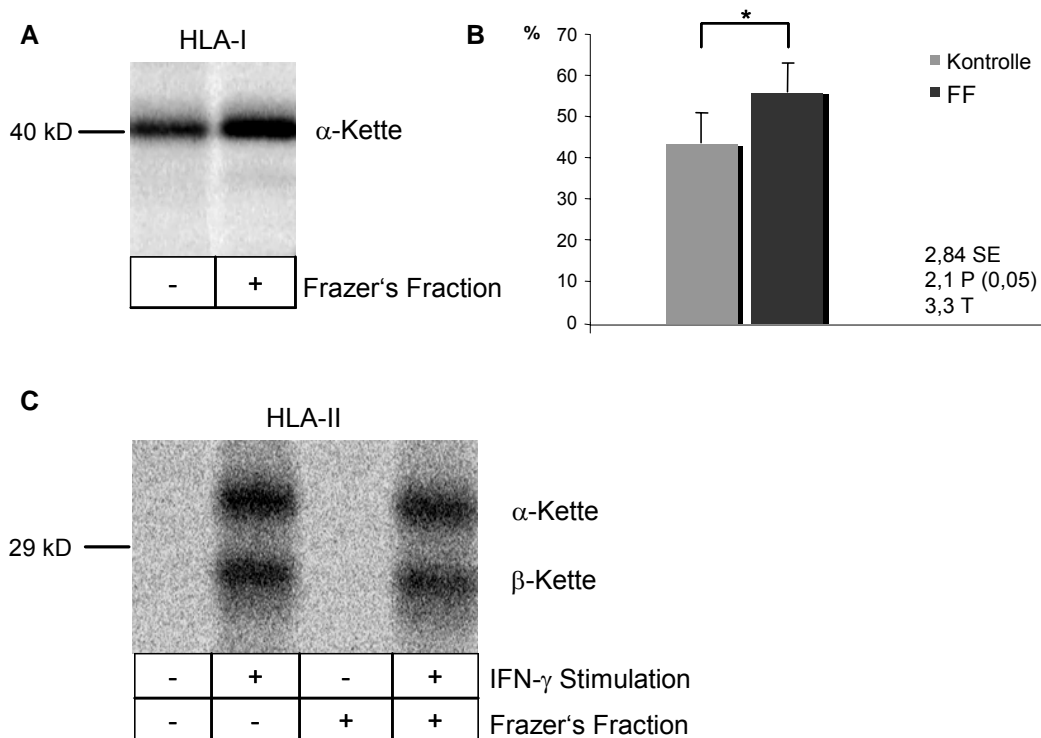


Abb. 3.10: HLA-Expression nach Inkubation mit Frazer's Fraction.

HT29 Zellen wurden für die radioaktive Markierung vorbereitet, mit ^{35}S -Methionin versetzt und mit oder ohne Frazer's Fraction (FF) über Nacht inkubiert. Nach anschließender Lyse wurden HLA Klasse I- und II-Antigene aus dem Lysat isoliert, in der SDS-PAGE (15%) aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen (A, B). A: Die linke Bande (ohne FF; -) ist deutlich schwächer als die rechte Bande nach Inkubation mit FF. Die HLA I-Expression in HT29 ist somit nach Einwirkung von Gliadin leicht gesteigert (siehe Quantifizierung B). C: Die HLA Klasse II-Expression ist allein durch die Stimulation mit IFN- γ zu erreichen (Spur 1 + 2) und ist durch die Inkubation mit FF nicht gesteigert (Spur 3+4). SE, standard error; P, probability, T, Signifikanz-Kennzahl für den Student -t-Test

Die HLA I-Expression lässt sich in den Zellen unabhängig von der Gliadinexposition nachweisen (Abb. 3.10 A), wobei die rechte Bande (nach FF Inkubation; A +) wesentlich intensiver ist als die der Kontrolle (A -). Die Expression von HLA I-Proteinen ist durch die Zugabe von Gliadin in Form von FF hoch reguliert. Nach wiederholter Durchführung und Quantifizierung der Ergebnisse (Abb. 3.10B) ist ein signifikanter Unterschied, da T größer ist als P, zwischen den behandelten Zellen und den Kontrollen zu beobachten.

Die Proteine der HLA Klasse II wiederum werden nicht durch die Zugabe von Gluten beeinflusst (Abb. 3.10C). HLA II-Moleküle können in epithelialen Zellen nur nach Stimulation mit IFN- γ nachgewiesen werden (siehe auch 3.1.2). Die alleinige Gabe von FF (Spur 3) zeigt keinen Unterschied zu den unbehandelten Zellen (Spur 1). Durch die Stimulation mit IFN- γ können HLA II-Proteine nachgewiesen werden (Spur 2), jedoch bleibt die Intensität der Banden nach zusätzlicher Inkubation mit FF (Spur 4) unverändert.

Sollid und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass die Expression von HLA II-Antigenen durch die Inkubation mit Trypsin verdautem Gliadin nicht beeinflusst wird [Sollid et al. 1987]. Die Expression der HLA Klasse I-Antigene ist somit nach Inkubation mit Frazer's Fraction im Gegensatz zu den Klasse II-Antigenen erhöht.

3.2 Lokalisation von Gliadin in Enterozyten

Enterozyten nehmen exogene Antigene durch Endozytose auf und prozessieren diese während der Transzytose, wobei die Antigene in der Mehrheit den degradierenden Weg über Endosomen und Lysosomen durchlaufen [Walker et al. 1972; Heyman 2001]. Während der Passage durch die Zelle verlaufen jedoch der Transport und die Prozessierung nicht für alle Antigene gleich [Heyman et al. 1989; Matysiak-Budnik et al. 2003].

3.2.1 Endozytose mit dem *Fluid Phase* Marker FITC-Dextran

Für die Aufnahme von Makromolekülen in Enterozyten sind aktive Clathrin-abhängige Endozytosevorgänge nachgewiesen, die durch spezifische oder unspezifische Rezeptorbindung an der Mikrovillusmembran vermittelt wird [Sanderson and Walker 1995]. Die Aufnahme luminaler Makromoleküle kann aber auch passiv durch sich ausbildende Invaginationen der apikalen Membran erfolgen, was als *Fluid Phase* Endozytose bezeichnet wird (siehe Abschnitt 1.4). Nutritive Makromoleküle binden zumeist unspezifisch oder werden durch *Fluid Phase* endozytiert [Bland and Warren 1986; Bland and Warren 1986].

Es ist bekannt, dass die Endozytoserate zwischen einzelnen Zelltypen und zwischen Kulturzellen und Gewebe variiert [Mullock et al. 1994; Luzio et al. 2000]. Aus diesem Grund wurde die Internalisierung zunächst mit einem Marker für *Fluid Phase* Endozytose, das Dextran, durchgeführt. Das Dextran ist bereits mit FITC (*fluorescein isothiocyanate*) konjugiert, so dass der intrazelluläre Nachweis durch direkte Immunfluoreszenz erbracht wurde. Dafür wurden HT29 und T84 Zellen für unterschiedliche Zeiten mit FITC-Dextran bei 37°C inkubiert, anschließend wurden überschüssige Dextranmoleküle durch waschen entfernt und die Zellen fixiert. In den T84 Zellen ist bereits nach einer Stunde vereinzelt

Dextran in vesikulären Strukturen nachweisbar (Abb. 3.11, erster Kasten). Die Anzahl der Vesikel nimmt mit der Inkubationszeit weiter zu, so dass nach zwei Stunden eine Vielzahl intrazellulärer Signale detektierbar sind. Nach 2,5 Stunden erscheinen die Vesikel größer und die Anzahl geringer als nach 2 Stunden (Kästen oben). Die Aufnahme von Dextran in HT29 Zellen verläuft im Vergleich zu den T84 langsamer. Selbst nach zwei Stunden sind lediglich vereinzelte Vesikel zu beobachten, jedoch erscheint das Zytosol leicht diffus leuchtend. Nach 2,5 Stunden sind ebenfalls deutliche, größere Vesikel in den HT29 nachweisbar (Abb. 3.11, untere Kästen).

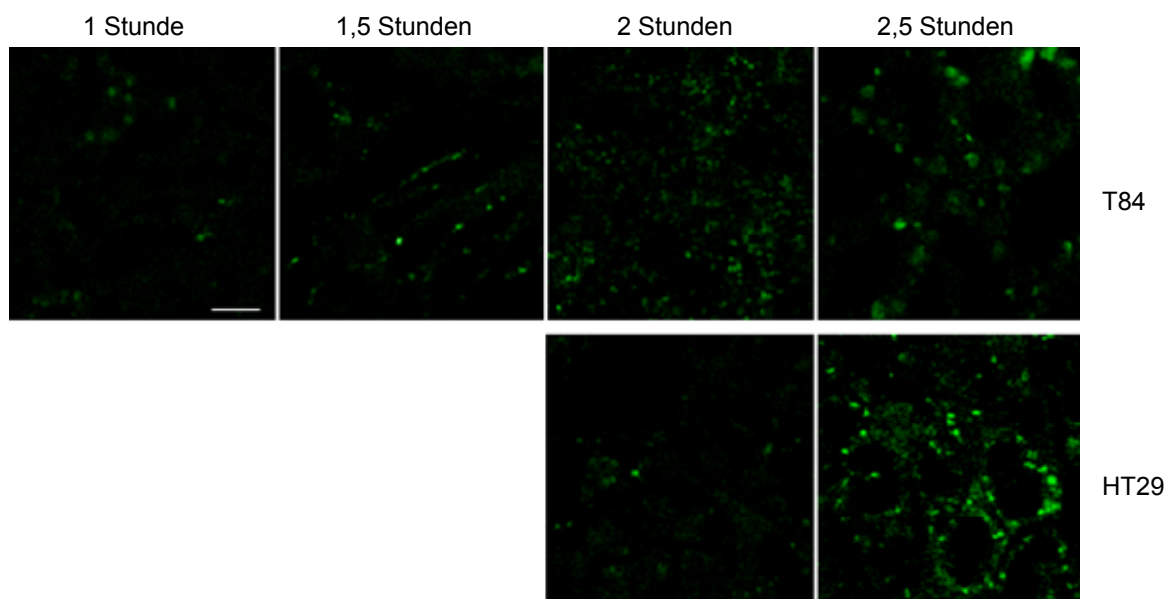


Abb. 3.11: *Endozytose von FITC-Dextran.*

T84 und HT29 Zellen werden für 1h; 1,5h; 2h oder 2,5h mit FITC-Dextran (70kD; 1mg/ ml) bei 37°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit PFA fixiert. Die Analyse erfolgte am konfokalen Mikroskop als direkte Immunfluoreszenz. In T84 Zellen (oben) kann bereits nach 1h Dextran vesikulär in den Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl nimmt bei 1,5h und 2h weiter zu. Nach 2,5h erscheint die Anzahl verringert, die Größe der Vesikel etwas erhöht. HT29 Zellen wiederum endozytieren Dextran langsamer als T84, hier sind vereinzelte Vesikel erst nach 2h zu beobachten. Nach 2,5h sind deutliche, ebenfalls etwas größere Vesikel zu detektieren (unten).

Scale = 10µm

3.2.2 Gliadin aus Frazer's Fraction (FF) ist lokalisiert in frühen und späten Endosomen in HT29 Zellen

Frazer's Fraction wird aus Gluten hergestellt (siehe 2.1.5), bei -20°C gelagert und jeweils Aliquots frisch für den Versuch aufgetaut. Analog dazu wurde der Verdau von Gliadin mit Pepsin und Trypsin (P/T-Gliadin) durchgeführt und eingesetzt. Für die Internalisierung wurde eine 1:20 Verdünnung in DMEM auf die Zellen gegeben. Die Internalisierung wurde mittels Immunfluoreszenz über die Zeit verfolgt. Dargestellt sind, wenn nicht anders angegeben, die Ergebnisse nach einer Inkubation von 2,5 Stunden.

Ein Unterschied in der Gliadinaufnahme nach IFN- γ -Stimulation konnte nicht festgestellt werden (ohne Abbildung). Die Menge an Interferon und die Dauer der Behandlung sind jeweils der Beschriftung der Abbildungen zu entnehmen.

Im Zellmodell wurde hier der intrazelluläre Transport von Gliadin mit Hilfe von morphologischen und biochemischen Untersuchungen verfolgt.

Gliadinpeptide wurden in HT29 Zellen in frühen Endosomen nachgewiesen (Abb. 3.12 A), hier zeigen EEA-1 und Gliadin (R5) [Osman et al. 2001; Mendez et al. 2005] nach Doppelmarkierung eine gelbliche Verfärbung im merge-Bild (Pfeile). Die elektronmikroskopische Aufnahme in Abb. 3.12 B zeigt Gliadin mit 12nm Goldpartikel markiert in späten Endosomen. Die Endosomen sind durch Lamp-2 (kleine Pfeile) gelabelt und innerhalb der membranösen Begrenzung des Vesikels ist ebenfalls Gliadin markiert (große Pfeile).

Gliadinpeptide aus den Frazer's Fraction wandern während ihres transzellulären Transports durch HT29 Zellen dementsprechend in frühe und späte Endosomen.

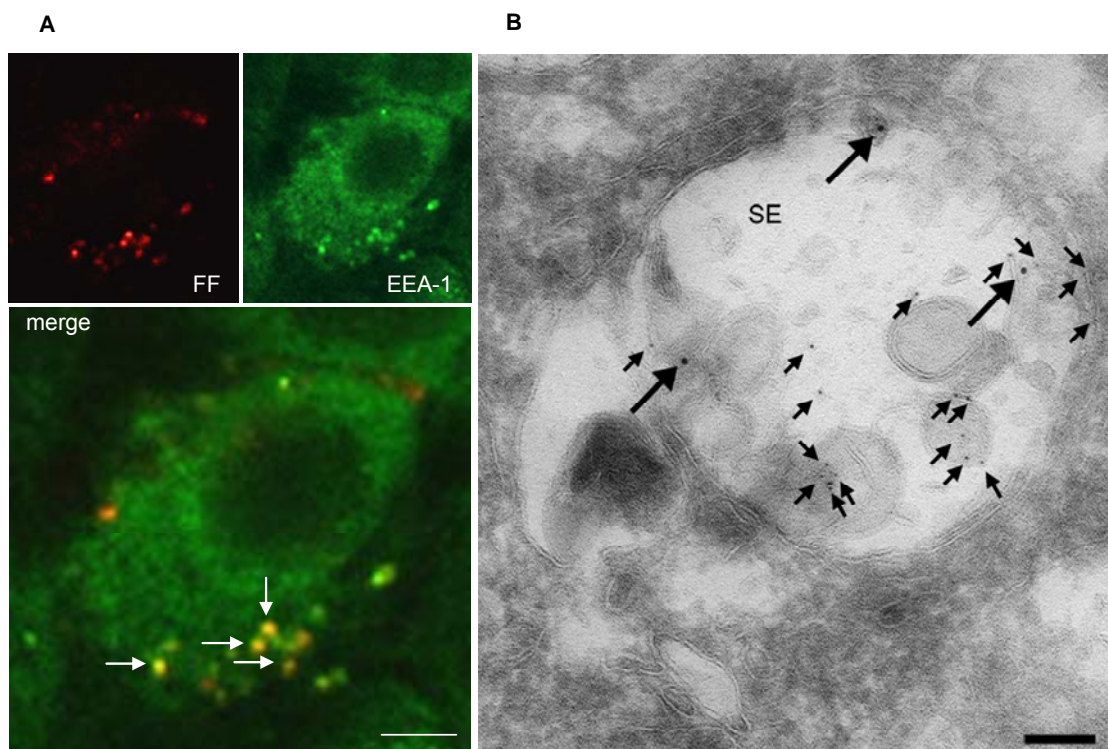


Abb. 3.12: *Frazer's Fraction gelangen sowohl in frühe als auch in späte Endosomen.*

HT29 Zellen wurden mit 800U IFN- γ für 48h stimuliert und für 30 min mit FF inkubiert und anschließend für die Immunfluoreszenz, bzw. -elektronenmikroskopie fixiert. A: Der Nachweis von Gliadin erfolgte mit dem m-anti-Gliadin Antikörper R5 und die Proteine wurden mit den Alexa Fluor Farbstoffen 488 (EEA-1) und 568 (Gliadin) markiert. B: Der Nachweis von Gliadin in der Elektronenmikroskopie erfolgte mittels Immunogoldmarkierung mit 12nm großen Goldpartikeln. Lamp-2 wurde durch 6nm großen Goldpartikeln markiert.

Gliadin aus FF kolokalisiert sowohl mit EEA-1 in frühen Endosomen (A, Pfeile) als auch mit Lamp-2 in späten Endosomen (B; Gliadin = große Pfeile; Lamp = kleine Pfeile).

Scale = 5 μ m (A); 100nm (B)

3.2.3 Intrazelluläre Lokalisation von Frazer's Fraction in HT29 Zellen

Bei den Untersuchungen mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte noch eine weitere Form der Gliadinaufnahme in den Zellen detektiert werden. Hierbei ist das Gliadin im gesamten Zytosol der Zellen verteilt (Abb. 3.13).

Diese Beobachtung wurde bereits in Patientenbiopsien gemacht und wurde als RACE (*rapid uptake of antigen into the cytosol of enterocytes*) beschrieben [Kersting *et al.* 2004]. In dieser Arbeit, sowie auch in den HT29 Zellen (Abb. 3.13.B) wurde beobachtet, dass diese Zellen keine apoptotischen Enterozyten darstellen.

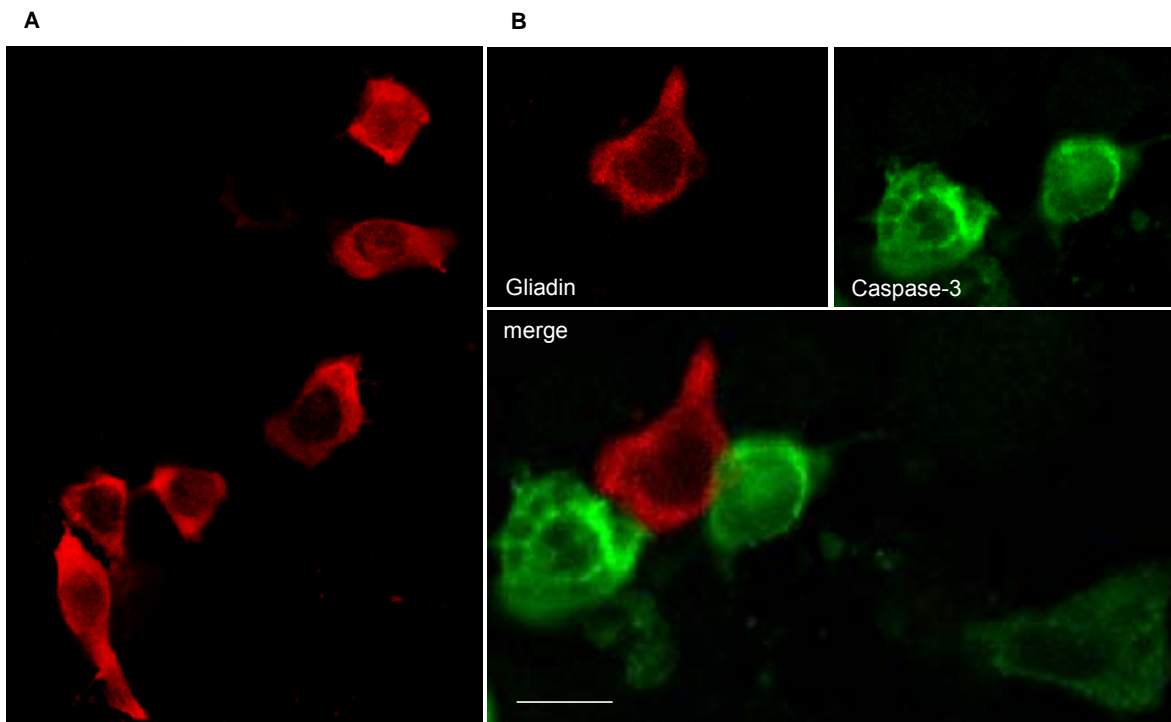


Abb. 3.13: *RACE-Zellen: Gliadin gelangt ins Zytosol der Zellen.*

HT29 Zellen wurden für 42h mit IFN- γ (400U) stimuliert, über Nacht mit P/T-Gliadin inkubiert, anschließend mit PFA fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Gliadinpeptide wurden mit dem monoklonalen Antikörper R5 markiert und mit dem Alexa Fluor Farbstoff 568 gefärbt. Der Apoptose-Marker Caspase-3 (aktiv) wurde mit einem polyklonalen Antikörper und Alexa Fluor 488 detektiert. A: Gliadin ist in großen Mengen im Zytosol von zahlreichen HT29 Zellen nachzuweisen. Bei dieser Antigenverteilung wurden intestinale Epithelzellen als RACE beschrieben. B: Caspase-3 kann in den HT29 nachgewiesen werden, jedoch sind die HT29/RACE negativ und folglich nicht in einem apoptotischen Zustand.

Scale = 10 μ m

Der Nachweis von Gliadin erfolgte auch biochemisch durch eine Dichtegradientenzentrifugation (Kapitel 2.2.3). Dafür wurde das Zellhomogenat auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen und die subzellulären Strukturen nach ihrer Dichte voneinander getrennt. Der Gradient wurde anschließend in Fraktionen geteilt und von jeder Fraktion gleiche Mengen in der SDS-PAGE, bzw. im folgenden Western Blot analysiert (2.2.5 und 2.2.6).

Für die Zuordnung der einzelnen Fraktionen zu den Zellkompartimenten wurden vorab verschiedene Markerproteine in den Gradienten analysiert. Damit konnten die jeweiligen Fraktionen charakterisiert und den subzellulären Strukturen zugeordnet werden (Abb. 3.14). So entsprechen die ersten, leichtesten Fraktionen denen des ERs (PDI, BiP) und den frühen Endosomen (Rab, EEA-1). Die Fraktionen 7 und 8 umfassen die Plasmamembran (HLA-Komplexe und SI, nicht abgebildet) sowie die Vesikel des Golgi Komplexes (GM130). Die späten Endosomen (Lamp-2) überschneiden diese Fraktionen ebenfalls, dehnen sich aber auch in die Fraktionen 6 und 9 aus.

Nach Inkubation der Zellen mit dem Gliadgemisch wurde überschüssiges Gliadin durch waschen mit PBS vor dem Homogenisieren entfernt. In den FF oder P/T-Gliadin befinden sich mehrere hundert verschiedene Peptide, die sich sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Größe unterscheiden.

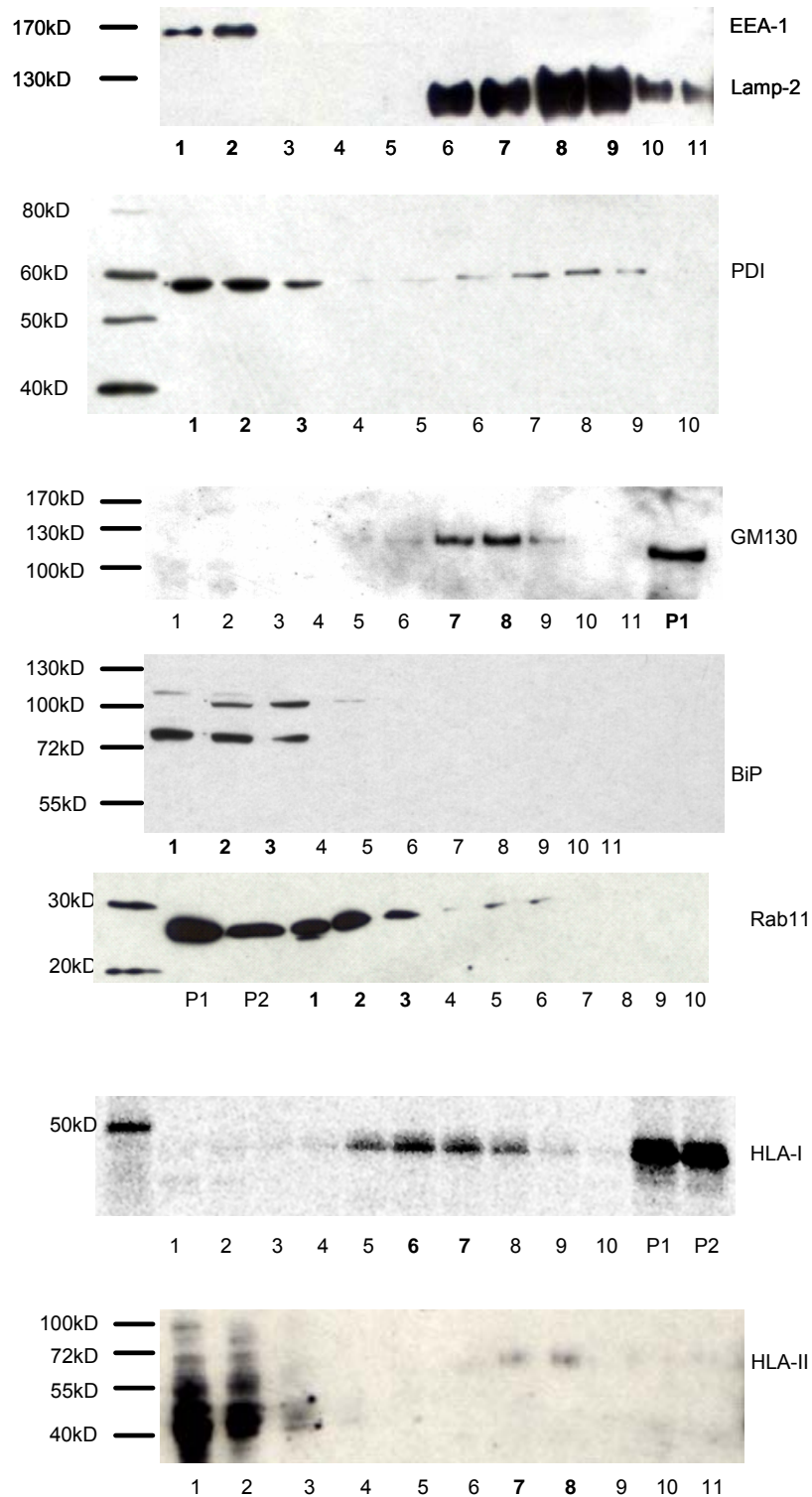


Abb. 3.14: *Verteilung der Kompartimente und Organellen im Dichtegradienten.*

Zellen wurden in Homogenisierungspuffer mechanisch aufgeschlossen und der PNS wurde auf einen Saccharose-Dichtegradienten (10-50%) geladen. Es folgte anschließend die Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 155.000xg für 2,5h. Im Western Blot wurden die einzelnen Fraktionen daraufhin mit dem jeweiligen Antikörper markiert. In den ersten Fraktionen (geringste Dichte) befinden sich Vesikel des ER (BiP, PDI) und der frühen Endosomen (EEA-1, Rab). Die mittleren Fraktionen 7 + 8 beinhalten Plasmamembranen (HLA) und Golgi-Vesikel (GM-130). In diesen Fraktionen befinden sich ebenfalls die späten Endosomen (Lamp-2), die sich aber auch über Fraktion 6 und 9 ausdehnen. P = Pellet; P1 = Pellet nach PNS; 1-11 = einzelne Fraktionen, 1 = niedrigste Dichte, 11 = höchste Dichte

Die Analyse im Western Blot zeigt einen Unterschied zwischen den Gradientenfraktionen zum Pellet 1 (P1) und zur zytosolischen Fraktion S2 (Abb. 3.15). Die einzelnen Fraktionen weisen viele Banden unterschiedlicher Größe auf, wobei die Fraktionen 2-11 sich sehr ähneln. Fraktion 1 zeigt die wenigsten und S2 (das Zytosol) dagegen die meisten Banden. Ein sehr großer Teil des Gliadins ist auch in P1 (Zelltrümmer und komplette Zellen, Kerne) zu finden. Hier sind die Banden sehr intensiv. Es lässt sich jedoch keine Aussage machen, ob Peptide bevorzugt in den frühen (Fraktionen 1-3) oder späten (Fraktionen 6-9) Endosomen lokalisiert sind. Da alle Fraktionen Gliadin beinhalten, ist eine Charakterisierung der Transportwege auf diesem Wege nicht möglich.

Eine Charakterisierung mit Hilfe definierter, synthetischer Peptide im Dichtegradienten war auf Grund der limitierten Verfügbarkeit der Peptide nicht möglich. Außerdem ist der Nachweis dieser sehr kleinen ($\leq 2\text{kD}$) Moleküle im Gel ein weiterer kritischer Aspekt.

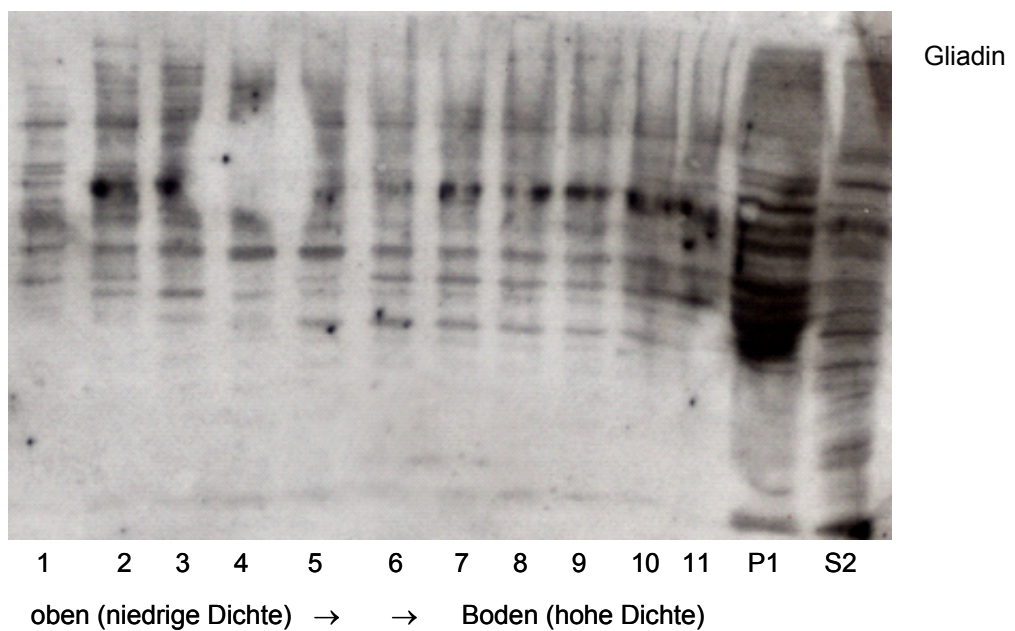


Abb. 3.15: *Verteilung von Frazer's Fraction im Dichtegradienten.*

HT29 Zellen wurden über Nacht mit FF inkubiert und anschließend homogenisiert. Der PNS wurde vor dem Gradienten bei 150.000xg ultrazentrifugiert, so dass die lösliche, zytosolische (S2) von der vesikulären Fraktion getrennt wurde. Das Pellet wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und auf einen Saccharose-Gradienten beladen. Im Western Blot wurden die einzelnen Fraktion (1-11), das Pellet 1 und die zytosolische Fraktion S2 analysiert.

Die Proben wurden auf einer 15%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion wurde der polyklonale Gliadinantikörper (Sigma) 1:2.000 eingesetzt.

3.2.4 Lokalisation von FF in Bezug auf HLA-Moleküle

Da die Zöliakie HLA- assoziiert ist, wurde die Lokalisation der Gliadinpeptide zu denen der HLA Klasse I und II-Antigene in den Epithelzellen mittels Immunfluoreszenz oder Immunelektronenmikroskopie untersucht (siehe Kapitel 2.6.2 bis 2.6.4). In der Fluoreszenzanalyse (Abb. 3.16A) können HLA I-Komplexe und Gliadin in denselben Kompartimenten nachgewiesen werden.

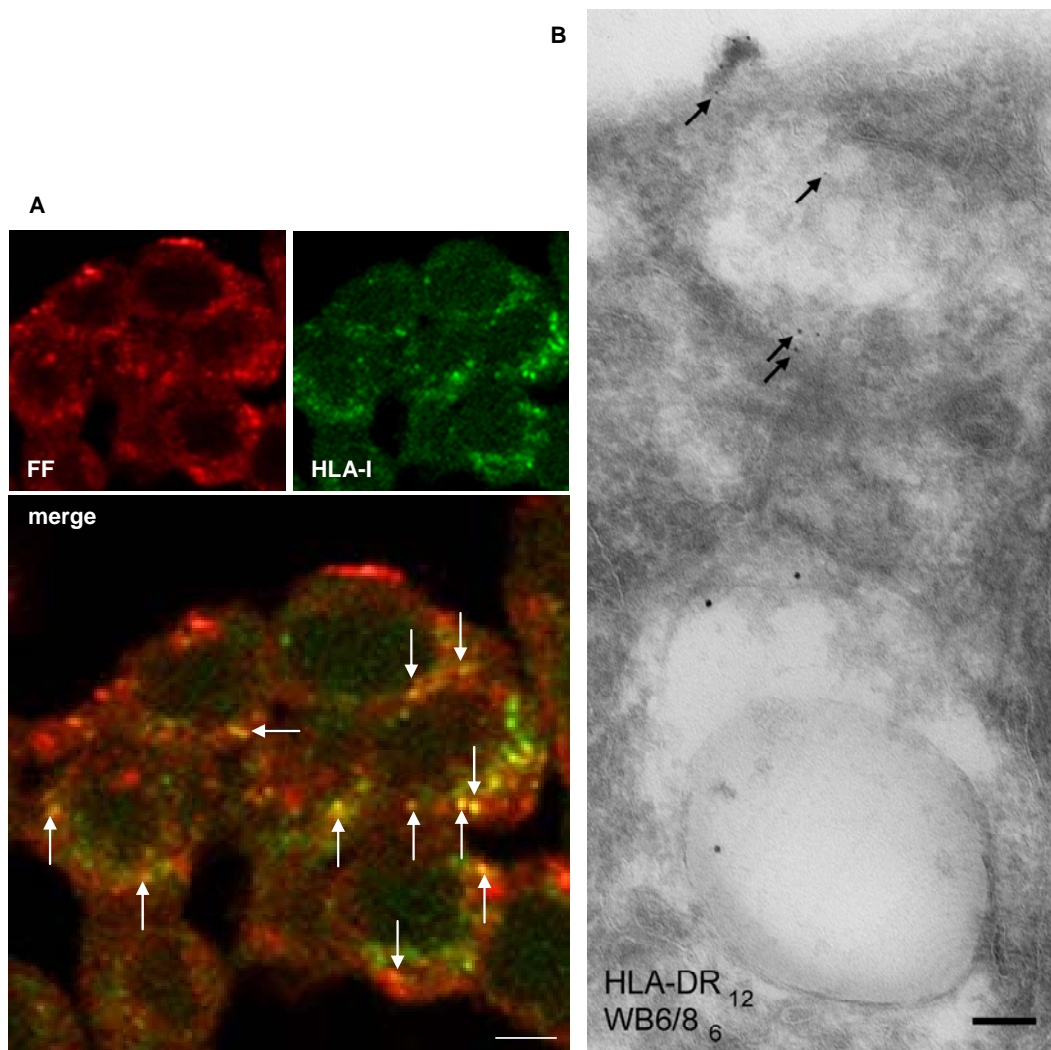


Abb. 3.16: Frazer's Fraction kolokalisieren mit HLA Klasse I, aber nicht mit Klasse II.

HT29 Zellen wurden über Nacht mit Frazer's Fraction inkubiert, anschließend fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz (A), bzw. für die Immunelektronenmikroskopie (B) vorbereitet. A: Gliadin wurde mit Hilfe des polyklonalen anti-Gliadin Antikörpers markiert und mit dem Alexa Fluor Farbstoff 568 angefärbt. Der anti-HLA-A,B,C Antikörper (Dianova) und Alexa Fluor 488 wurden für die Detektion der HLA-I Moleküle verwendet. In der Überlagerung der beiden Signale (merge) ist deutlich die gelbe Färbung durch Kolokalisation der beiden Antigene zu erkennen (Pfeile). B: Hier wurden Gliadinpeptide mit dem monoklonalen Antikörper WB6/8 und 6nm großen Goldpartikeln markiert. Dementsprechend wurde HLA-DR mit einem polyklonalen Antikörper und 12nm großen Goldpartikeln detektiert. Beide Antigene sind in unterschiedlichen Vesikelpopulationen zu finden und sind somit nicht kolokalisiert.
Scale = 10µm (A), 100nm (B)

Die Kolokalisation ist in intrazellulären, vesikulären Strukturen zu beobachten, die sich in der Nähe der Plasmamembran befinden (siehe Pfeile). In der elektronenmikroskopischen Aufnahme ist HLA-DR in Vesikeln im unteren Teil des Bildes zu erkennen (Abb. 3.16B; großes Gold). Die Gliadinpeptide wiederum befinden sich in einem anderen Vesikel nahe der apikalen Membran (Pfeile, kleines Gold). An der apikalen Plasmamembran selbst sind ebenfalls Gliadinmarkierungen zu finden. Gliadinpeptide aus den FF kolokalisieren somit teilweise mit HLA Klasse I-Antigenen, nicht aber mit den Klasse II-Molekülen in HT29 Zellen.

3.2.5 Lokalisation von OVA in Bezug auf HLA-Moleküle

Folgend wurde geklärt, ob die Beobachtung ein Phänomen für die Gliadinpeptide ist oder ob auch andere exogene Antigene nicht mit HLA Klasse II in den Epithelzellen kolokalisieren. Dafür wurden HT29 Zellen mit Ovalbumin (OVA) aus dem Hühnerei für die Internalisierung inkubiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet (Abb. 3.17).

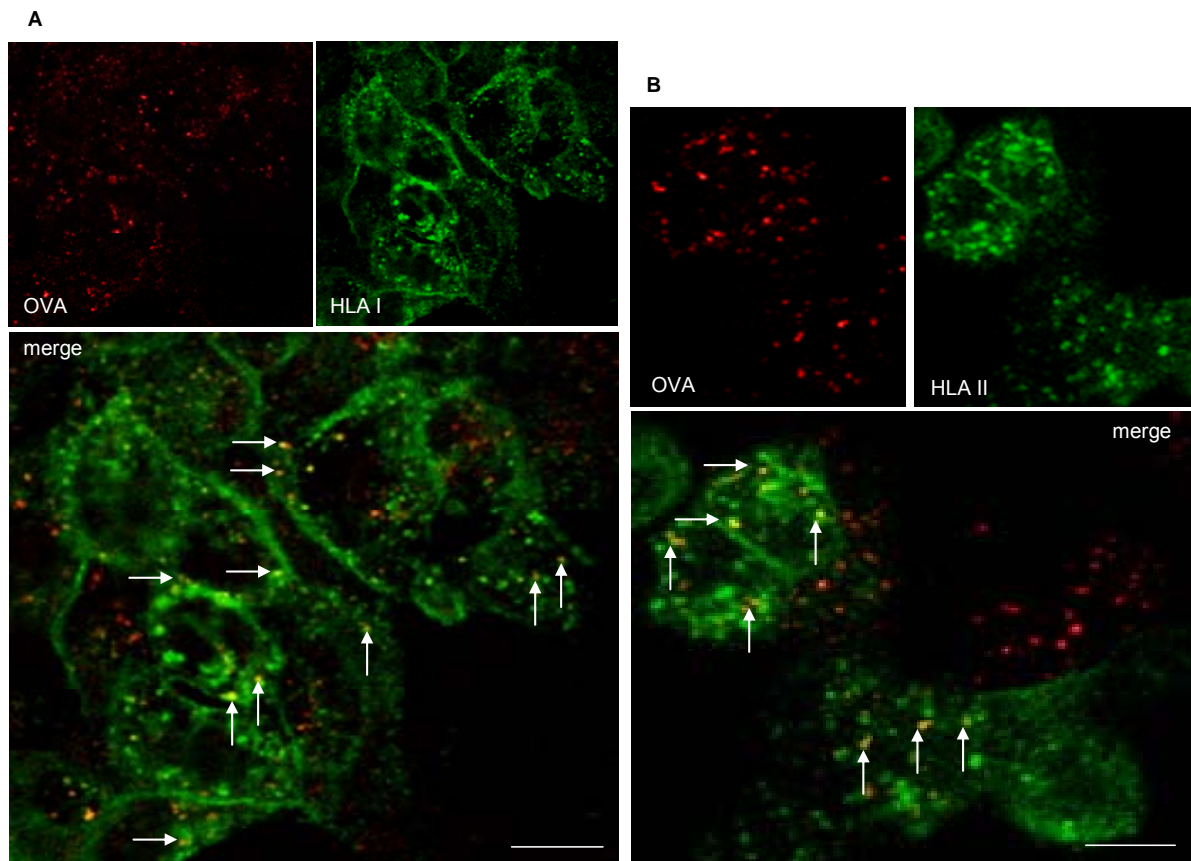


Abb. 3.17: OVA kolokalisiert sowohl mit HLA Klasse I als auch mit Klasse II.

HT29 Zellen wurden nach 48h IFN- γ (400U) Stimulation für 60min mit OVA (5mg/ml) inkubiert und anschließend für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Die Detektion von OVA erfolgte mit einem polyklonalen anti-OVA Antikörper und dem Alexa Fluor Farbstoff 568. HLA wurde mit dem jeweiligen monoklonalen anti-HLA-I (W6/32), bzw. anti-HLA-II (CR3/43) Antikörper markiert und anschließend mit Alexa Fluor 488 angefärbt. A: HLA-I und OVA erscheinen in denselben Vesikel innerhalb der Zellen. B: HLA-II und OVA kolokalisieren in denselben Vesikeln nahe der Plasmamembran. Scale = 10 μ m

Wie in Abb. 3.17A deutlich zu erkennen, kolokalisiert OVA mit HLA Klasse I-Molekülen nach der Überlagerung der beiden einzelnen Signale im merge-Bild (Pfeile). Im Unterschied zu den Gliadinpeptiden können zudem HLA Klasse II-Moleküle in Kolokalisation mit OVA beobachtet werden (Abb. 3.17B, Pfeile).

3.2.6 Synthetische Peptide I: das Kontrollpeptid gelangt in späte Endosomen

Da die Differenzierung der Peptidsequenzen aus den Frazer's Fraction oder P/T-Gliadin nicht möglich ist, wurden nachfolgend synthetische Peptide mit definierter Sequenz untersucht. In den letzten Jahren sind einzelne Sequenzen in den Fokus der Untersuchungen gelangt, die eine pathophysiologische Wirkung im Patienten oder in *in vitro* Studien gezeigt haben. Von besonderem Interesse ist das Peptid mit der Sequenz

56-68 des α -Gliadins, das als immunodominant oder –regulatorisch beschrieben wurde (siehe Einleitung) [Heyman et al. 1989; Arentz-Hansen et al. 2000; Anderson et al. 2000]. Ein anderes Peptid des α -Gliadins mit der Sequenz 31-49 wurde als toxisch beschrieben, da es nicht von T-Zellen erkannt wird, aber direkt im Zusammenhang mit der Zottenatrophie steht [Sturgess et al. 1994; Maiuri et al. 1996].

In den folgenden Experimenten werden das toxische Peptid 31-49, das immunodominante Peptid 56-68 und ein Kontrollpeptid der Sequenz 229-246 im intrazellulären Transport untersucht.

Da bisher vorwiegend der N-terminale Bereich, mit den sich wiederholenden QQPFP Sequenzen des α -Gliadins als toxisch beschrieben wurde [Osman *et al.* 2001], kann die C-terminale Sequenz 229-246 als Kontrolle verwendet werden.

Die synthetischen Peptide werden analog zu den Peptidgemischen im Medium gelöst und für die Internalisierung auf die Zellen gegeben, bei 37°C inkubiert und anschließend für die Immunfluoreszenz vorbereitet.

Das Kontrollpeptid M3 mit der Sequenz 229-246 konnte in HT29 Zellen sowohl in den frühen als auch in den späten Endosomen nachgewiesen werden (Abb. 3.18). In dem Überlagerungsbild sind die klaren gelben Signale für die Kolo-kalisation von Peptid mit EEA-1 in frühen (A, Pfeile) und Peptid mit Lamp-2 (B, Pfeile) in den späten Endosomen zu erkennen.

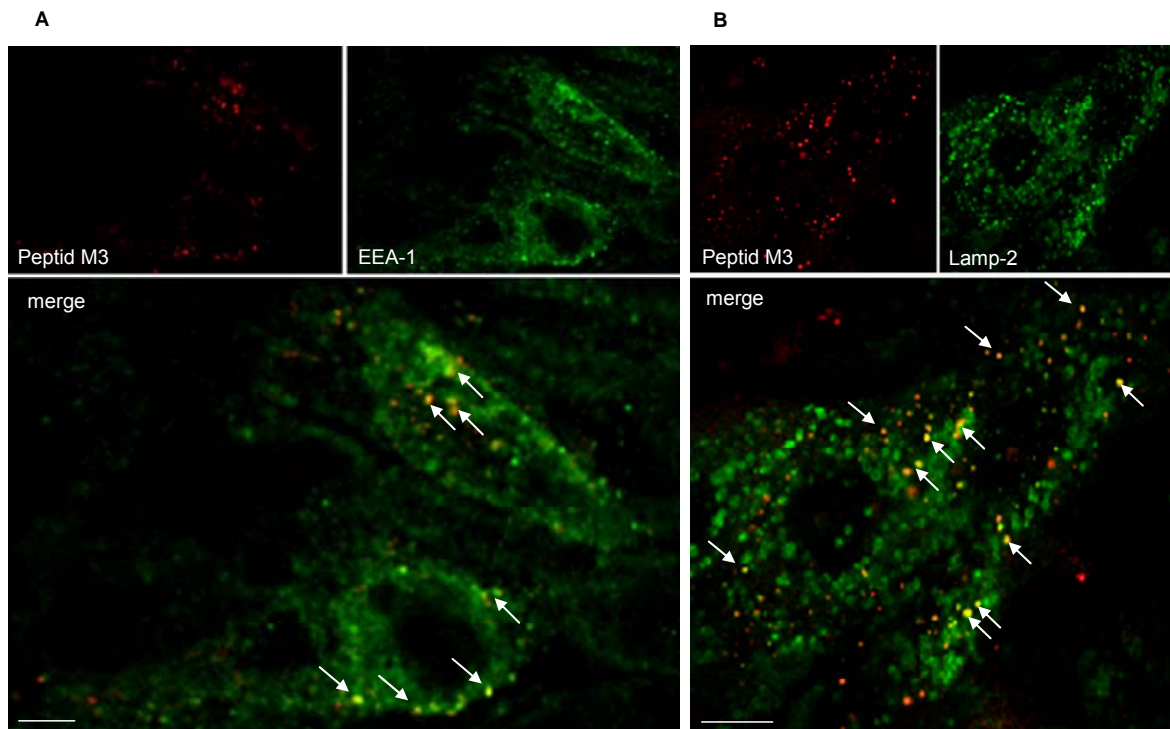


Abb. 3.18: *Das Kontrollpeptid wandert in frühe und späte Endosomen in HT29 Zellen.*

HT29 Zellen wurden für 2,5h mit 0,5mg/ml Peptid M3 (α 229-246) inkubiert, überschüssiges Peptid wurde entfernt, die Zellen fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Die Detektion von Gliadin erfolgte mit dem Alexa Fluor Farbstoff 568, sowie Alexa Fluor 488 für EEA-1 (A), bzw. Lamp-2 (B). Nach Überlagerung der einzelnen Signale (merge) ist die typische Gelbfärbung als Zeichen der Kolokalisation zu beobachten (A+B, Pfeile). Das Peptid M3 wandert somit in späte und frühe Endosomen.

Scale = 5 μ m (A); 10 μ m (B)

3.2.7 Synthetische Peptide II: das immundominante Peptid 56-68 gelangt in späte Endosomen

Das immundominante Peptid α 56-68 wandert ebenfalls in die frühen und späten Endosomen der HT29 Zellen (Abb. 3.19). In Abbildung A ist im merge-Bild eine deutliche Überlagerung von EEA-1 und Peptid in denselben vesikulären Strukturen zu beobachten. Auch Abbildung B zeigt überschneidende Signale von Cathepsin D mit dem Peptid. Außerdem sind auch Vesikel zu erkennen, die entweder nur Peptid oder nur Cathepsin D tragen.

Das Kontrollpeptid und das immundominante Peptid werden somit beide über frühe Endosomen zu den späten Endosomen oder auch Lysosomen transportiert und durchqueren dabei den kompletten endozytotischen Weg.

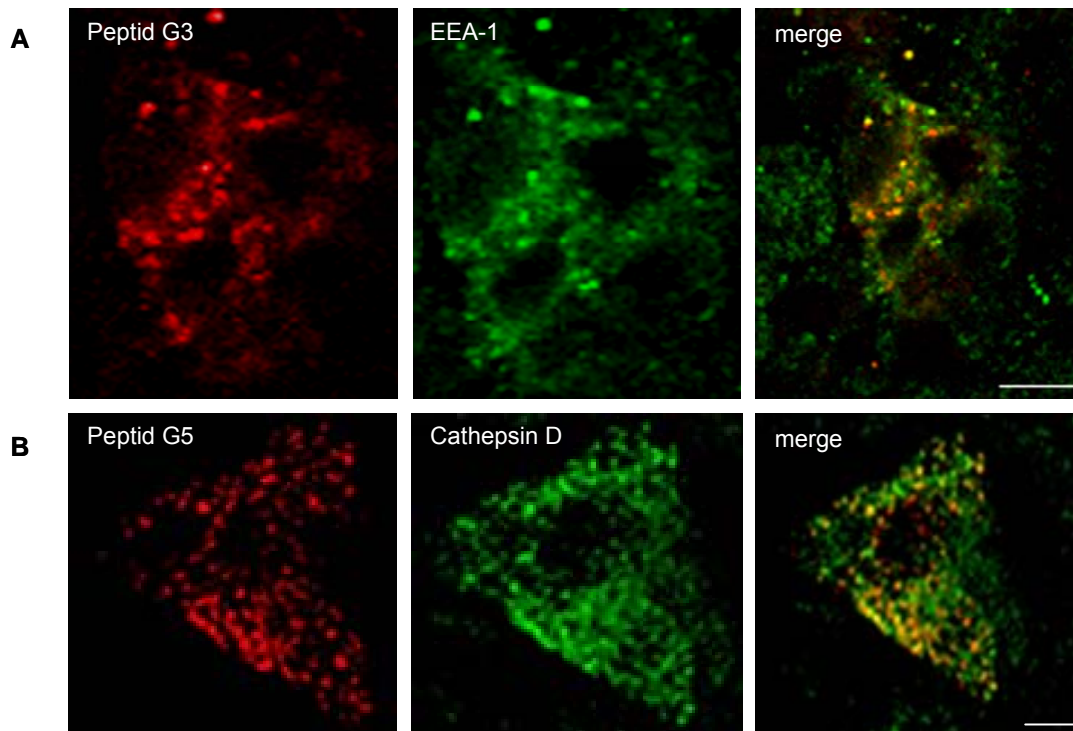


Abb. 3.19: *Das immundominante Peptid gelangt in frühe und späte Endosomen.*

HT29 Zellen wurden mit IFN- γ stimuliert und mit 1mg/ml Peptid für 30min inkubiert. Nicht aufgenommenes Peptid wurde entfernt und die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet. Der Nachweis von Gliadin erfolgte mit Alexa Fluor Farbstoff 568, bzw. Alexa Fluor 488 für die Markerproteine EEA-1 (A) und Cathepsin D (B). Das immundominante Peptid ist sowohl in den frühen (A) als auch in den späten (B) Endosomen lokalisiert. Scale = 10 μ m (A), 5 μ m (B)

3.2.8 Synthetische Peptide III: das toxische Peptid wird nicht in späte Endosomen transloziert

Das toxische Peptid 31-49 wird nach der Aufnahme ebenfalls in die frühen Endosomen transportiert. In der Abbildung 3.20A ist dieses Peptid mit EEA-1 anhand der gelben Signale in der Überlagerung (Pfeile) kolokalisiert. Im Gegensatz zu den anderen Peptiden und Frazer's Fraction ist das Peptid 31-49 jedoch nicht in den späten Endosomen lokalisiert (Abb. 3.20B). Die Vesikel der Endosomen sind deutlich von den Gliadin-positiven Vesikeln zu unterscheiden (Pfeile). Dieses Peptid ist außerdem nicht mit HLA Klasse II-Komplexen kolokalisiert. In der folgenden Abbildung sind einzelne Vesikel mit Gliadin zu beobachten, jedoch nicht zusammen mit HLA-II detektierbar (Abb.3.21 merge).

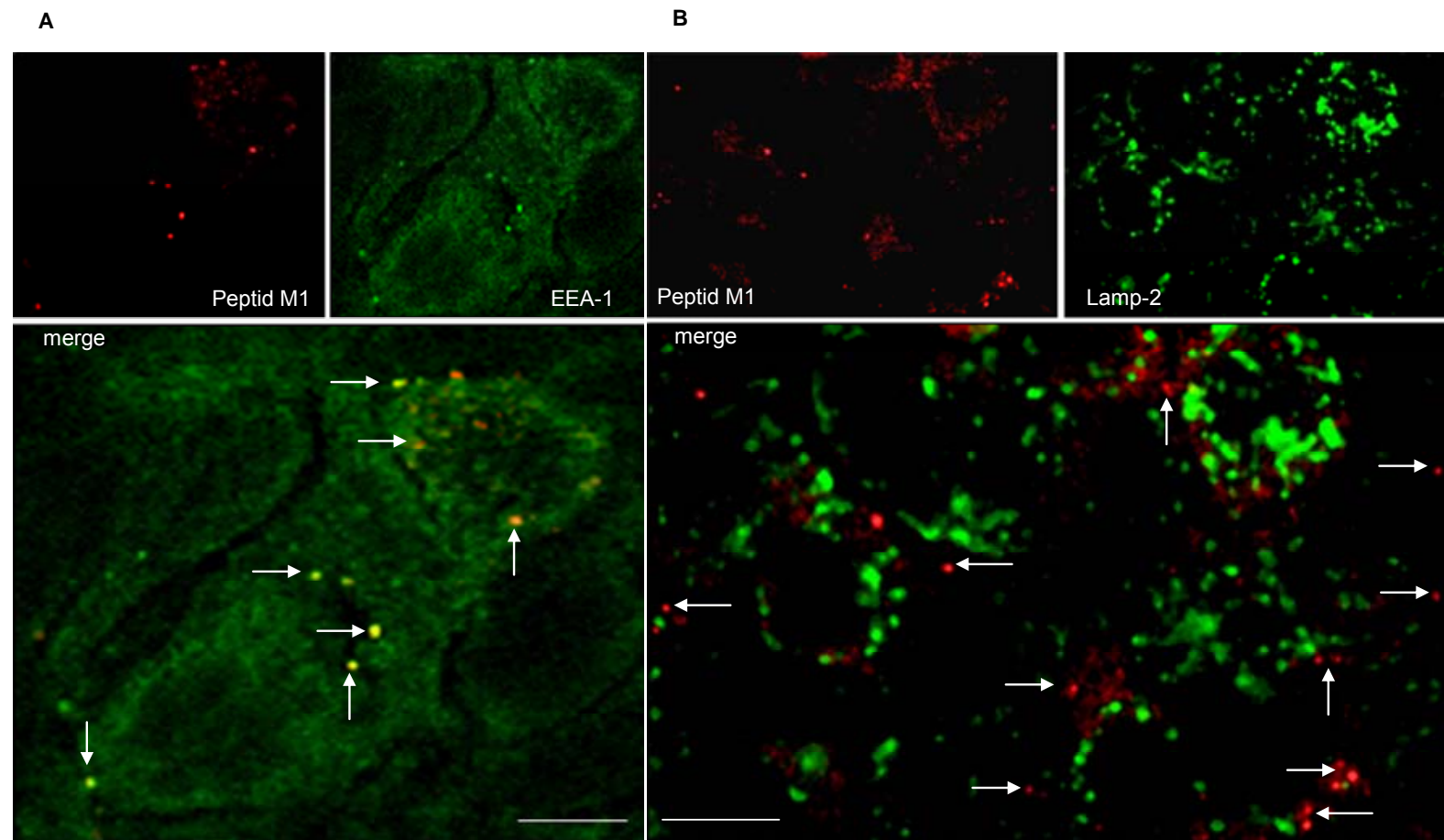


Abb. 3.20: *Das toxische Peptid gelangt in frühe, nicht aber in späte Endosomen.*

HT29 Zellen wurden über Nacht mit 1mg/ ml des Peptids α 31-49 inkubiert, anschließend wurde überschüssiges Peptid entfernt und die Zellen fixiert. Gliadinpeptide wurden mit dem monoklonalen Antikörper R5 markiert und mit dem Alexa Fluor Farbstoff 568 angefärbt. EEA-1 und Lamp-2 wurden mit Alexa Fluor488 nachgewiesen. A: Das Peptid 31-49 ist in den frühen Endosomen lokalisiert, was an den überlappenden Signalen zu erkennen ist (Pfeile). B: Hier gibt es kein überschneidendes Signal, die Gliadin-positiven Vesikel (Pfeile) erscheinen deutlich getrennt von den Lamp-positiven Vesikeln. Das toxische Peptid wandert somit nicht oder nur bedingt in die späten Endosomen.
Scale = 5 μ m (A); 10 μ m (B)

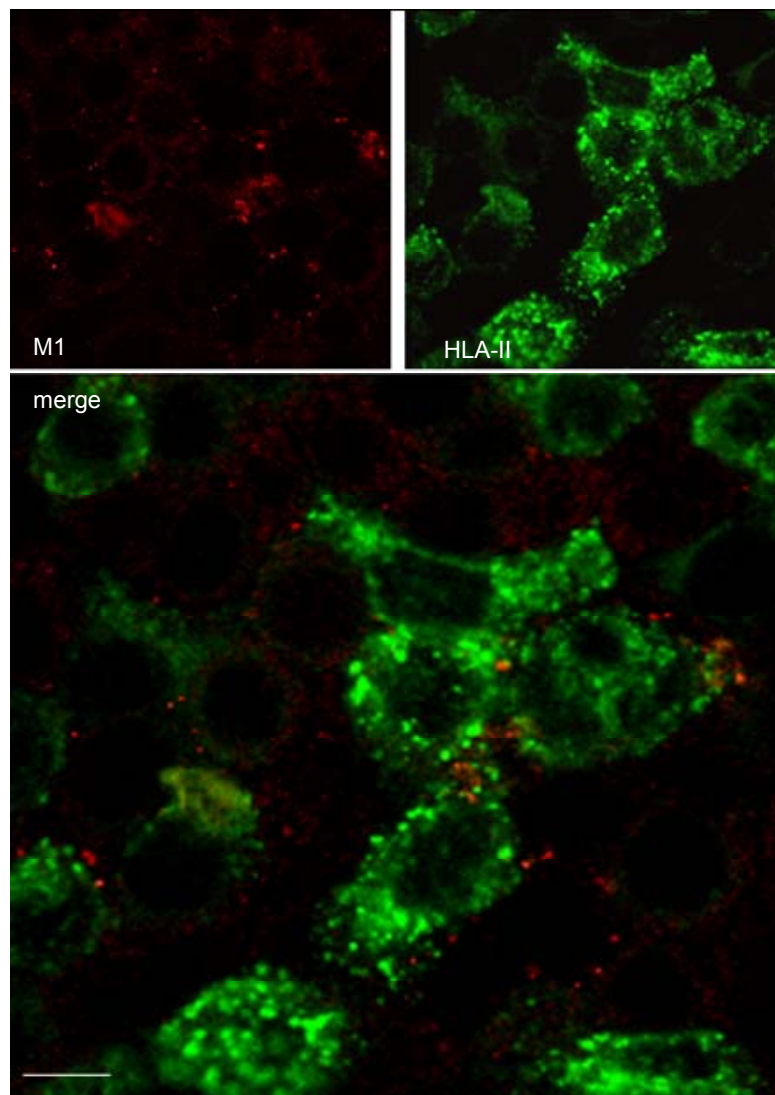


Abb. 3.21: Das toxische Peptid kolokalisiert nicht mit HLA-II Molekülen.

HT29 Zellen wurden 36h mit IFN- γ (400U) stimuliert und über Nacht mit 0,5mg/ml Peptid α 31-49 inkubiert. Anschließend wurde nicht aufgenommenes Peptid entfernt, die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz präpariert. Das Peptid wurde mit dem polyklonalen Antikörper markiert und mit Alexa Fluor 568 nachgewiesen. Für den Nachweis von HLA-II wurde der monoklonale Antikörper CR3/43 zusammen mit Alexa Fluor 488 verwendet. In dem überlagerten Bild sind die Signale von HLA-II von denen des Peptids getrennt. Folglich liegt keine Kolokalisation des toxischen Peptids mit HLA Klasse II-Moleküle vor. Scale = 10 μ m

Das toxische Peptid gelangt folglich nicht in späte Endosomen und MHC II-positive Kompartimente in HT29 Zellen.

3.2.9 Modulation des Transports von toxischen Peptiden in späte Endosomen

In anderen Studien wurden Antigene an die nicht-toxische Untereinheit B des Cholera Toxins (CTB) gekoppelt und so eine veränderte Immunantwort ausgelöst [Bergerot et al. 1997; Eriksson et al. 2003]. CTB hat sich als potentes Trägerprotein und Adjuvants für Immunisierungen herausgestellt [Sun et al. 1994]. Andere Arbeiten zeigten, dass ein gezieltes Steuern von exogenen Antigenen in die späten Endosomen die Induktion oraler Toleranz unterstützt [Rowell et al. 1995]. Experimente im Mausmodell untermauern diese Theorie [Zimmer et al. 2000].

In diesem Projekt wurde das toxische Peptid 31-49 (M1) an CTB mit Hilfe eines vernetzenden Reagens gekoppelt und anschließend im intrazellulären Transport analysiert. Die Vernetzung von CTB mit dem toxischen Peptid wurde von Dr. Wagner, AG von Prof. Dr. H. Breiteneder, Pathophysiologie, AKH Wien durchgeführt (Kapitel 2.1.5). Mit Hilfe der Dot Blot Analyse wurde überprüft, ob die Kopplung erfolgreich war, bevor die Untersuchungen in der Immunfluoreszenz begonnen wurden. Verschiedene Mengen an Konjugat und P/T Gliadin als Kontrolle wurden auf eine Nitrozellulosemembran „gedotet“ und anschließend immunologisch mit Gliadinantikörper detektiert (siehe Western Blot, 2.2.6). Gliadin, bzw. das toxische Peptid ist deutlich in den „Dots“ nachzuweisen (Abb.3.22). Die Konjugation des Peptids 31-49 mit CTB war somit erfolgreich und konnte für die Experimente verwendet werden.

Dafür wurden HT29 Zellen mit diesem Konjugat für die Internalisierung inkubiert und mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde das Peptid M1 nachgewiesen.

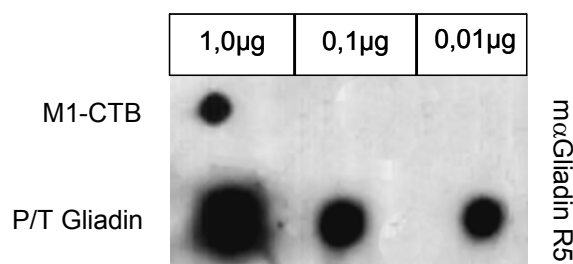


Abb. 3.22: *Das toxische Peptid 31-49 ist erfolgreich an CTB gekoppelt.*

Im Dot Blot wurde überprüft, ob das Peptid 31-49 an CTB gekoppelt wurde. Dafür wurden jeweils 1µg, 01µg und 0,01µg des Konjugats sowie 1µl, 0,1µl und 0,01µl des P/T Gliadins auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert (*Dot*). Anschließend erfolgte analog zum Western Blot die Detektion mit anti-Gliadin Primärantikörper (R5) und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper. In der Kontrolle (P/T Gliadin) sind alle „Dots“ deutlich markiert (untere Reihe). Bei M1-CTB ist das Peptid deutlich bei der aufgetragenen Menge von 1µg nachweisbar (obere Reihe).

Das Peptid konnte nach wie vor in den frühen Endosomen detektiert werden (ohne Abbildung). Interessanterweise ist das Peptid nun auch in den späten Endosomen zu finden (Abb. 3.23). In der Abbildung A sind kolokalisierte Vesikel (Pfeile) neben Lamp-positiven, aber Gliadin-negativen Vesikeln zu erkennen. Außerdem sind Vesikel zu beobachten, die Gliadin-positiv, aber Lamp-negativ sind. Auch mit dem zweiten Marker für späte Endosomen, Cathepsin D, sind klare Kolokalisationen mit M1-CTB zu sehen (Abb. 3.23B, Pfeile).

Das intrazelluläre Transportverhalten des toxischen Peptids 31-49 hat sich somit nach der Kopplung an CTB in den HT29 Zellen verändert.

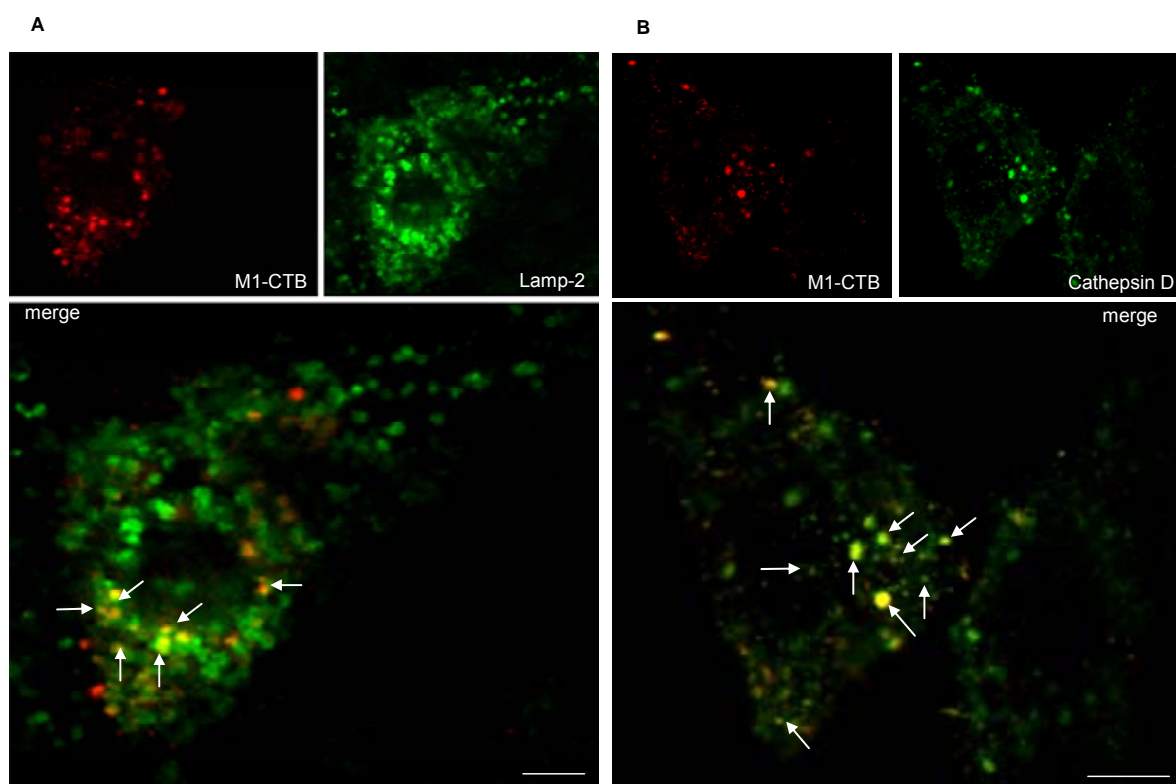


Abb. 3.23: *Das toxische Peptid an CTB gekoppelt wird in die späten Endosomen transportiert.*

HT29 Zellen wurden für 2,5h mit 50µg/ml Konjugat inkubiert, ungebundenes Protein wurde entfernt und die Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. A: M1 wurde mit dem polyklonalen anti-Gliadin Antikörper und dem Alexa Fluor Farbstoff 568 sowie Lamp-2 mit Alexa Fluor 488 nachgewiesen. B: M1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper R5 markiert und mit Alexa Fluor 568 detektiert. Der Nachweis von Cathepsin erfolgte mit Alexa 488. Das α 31-49-CTB Peptid wandert in die späten Endosomen und ist sowohl mit Lamp-2 (A) als auch mit Cathepsin D (B) kolokalisiert. Scale = 5µm

Um eine genauere Aussage darüber zu machen, wurde der Transport von M1 und M1-CTB in die späten Endosomen mit Hilfe von *ImageJ* quantifiziert. Hierbei wurden jeweils die Signale von Lamp-2 und Peptid allein gemessen sowie die Signale der Kolokalisation

der beiden Antigene. Die gemessenen Signale (Pixel) wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Prozentwerte (Abb. 3.24A) oder absolute Werte (Abb. 3.24B) ausgewertet. Abb. A zeigt die unterschiedlichen Mengen an endozytierten Peptiden in die HT29 Zellen. Das konjugierte Peptid M1-CTB wird deutlich (signifikant) mehr von den Zellen aufgenommen als das unkonjugierte Peptid M1 (Abb. 3.24A). M1-CTB wird ebenso signifikant mehr in die späten Endosomen transportiert, was durch die Kolo-kalisation von M1-CTB, bzw. M1 mit dem lysosomalen Marker Lamp-2 gemessen wurde (Abb. 3.24B). Der intrazelluläre Transportweg des toxischen Peptids 31-49 in HT29 Zellen ist folglich durch die Konjugation an CTB signifikant verändert.

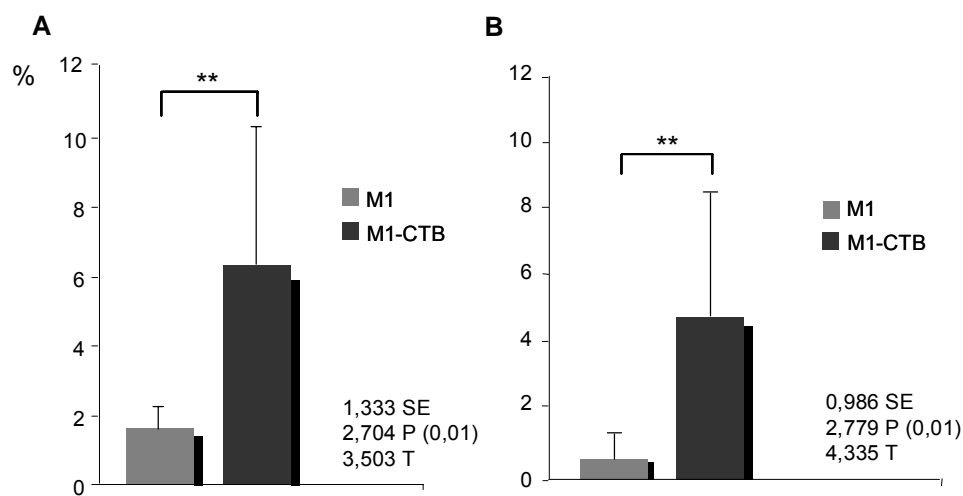


Abb. 3.24: Vergleich von M1 und M1-CTB in den späten Endosomen.

Der Transport in die späten Endosomen wurde für M1 allein und CTB gekoppeltem M1 verglichen. Hierfür erfolgte eine Auszählung der Peptidsignale, Lamp-2-Signale und der Kolo-kalisationen mit Hilfe des Programms *ImageJ*. Für die Quantifizierung wurde mit einem Freiheitsgrad von 23 (A), bzw. 26 (B) durchgeführt. (A) Endozytierte Gesamtmenge an Peptiden im Verhältnis zu den Signalen von Lamp. Das konjugierte toxische Peptid M1-CTB wird im Vergleich zu M1 effizienter internalisiert. (B) Hier wurden die Kolo-kalisation des jeweiligen Peptides mit Lamp gemessen. Das konjugierte Peptid M1-CTB wird im Gegensatz zu M1 allein in die späten Endosomen transportiert. Da in beiden Fällen $T > P$ ist, kann man hier von signifikanten Unterschieden sprechen.

SE, *standard error*; P, *probability*; T, Signifikanz-Kennzahl für den *Student -t-Test*

3.3 Expression von HLA-DR und tTG in Enterozyten von Patienten

In diesem Abschnitt wurde die Expression von HLA-DR und tTG in Biopsien von Patienten untersucht. Hierfür wurden RNA-Sonden generiert (Kapitel 2.5), die sich spezifisch an RNA-Sequenzen im Gewebe binden und damit den Nachweis erbringen, welche Zellen HLA-DR bzw. tTG exprimieren.

3.3.1 Kontrolle der Spezifität generierter Sonden mittels Northern Blot

Es wurde jeweils eine sense und eine anti-sense Sonde hergestellt, wobei die anti-sense diejenige ist, die an die zelluläre RNA bindet. Die sense-Sonden dienen lediglich zur Kontrolle der Spezifität.

Im Northern Blot wurde überprüft, ob die Sonden spezifisch an zelluläre RNA binden oder, ob es ebenfalls unspezifische Hybridisierungen an ribosomalen Untereinheiten gibt.

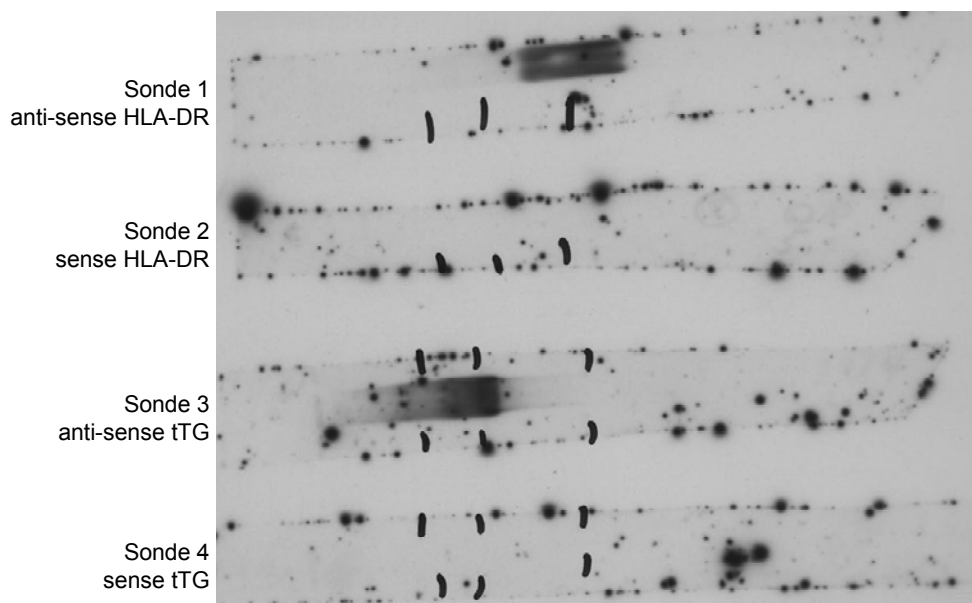


Abb. 3.25: *Northern Blot zur Kontrolle der Sonden.*

Isolierte RNA von HT29 für die Detektion von HLA-DR, bzw. RNA aus Fibroblasten für die Detektion von tTG wurden im Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die Membranen wurden jeweils mit einer Sonde inkubiert und anschließend detektiert. Sowohl die HLA-DR als auch die tTG anti-sense Sonde zeigt ein spezifisches Signal (Sonden 1 und 3). Die sense-Sonden (2 und 4) zeigen keine Signale, hybridisieren also nicht an zellulärer RNA.

Die Sonden zeigen im Northern Blot, dass sie spezifisch intrazelluläre RNA binden. Die anti-sense Sonden von HLA-DR (Sonde 1) und tTG (Sonde 3) detektieren ein eindeutiges Signal ohne unspezifisch an ribosomale Untereinheiten zubinden (Abb. 3.25). Die sense-Sonden (Sonde 2 und 4) hybridisieren nicht mit der RNA und unterstützen damit die Spezifität. Die generierten Sonden wurden daraufhin für die *in situ* Hybridisierung von Dünnschnitten der Patientenbiopsien eingesetzt.

3.3.2 Detektion von tTG und HLA-DR mittels *in situ* Hybridisierung in Patientenbiopsien

Das Ziel dieser Untersuchung besteht darin, die mRNA eines bestimmten Gens sichtbar zu machen, um auf diese Weise die gewebs- oder zellspezifische Expression von HLA-DR bzw. tTG nachzuweisen. Der Nachweis erfolgt durch die enzymatische Reaktion von BCIP/NBT durch die Alkalische Phosphatase, was zu einem braun-violetten Präzipitat führt (Kapitel 2.6). Das Präzipitat ermöglicht so die genaue Lokalisation für die spezifische Expression.

Die sense-Sonden von tTG und HLA-DR haben in allen Schnitten keine Signale gezeigt (ohne Abbildung), während die anti-sense-Sonden von HLA-DR und tTG2 spezifische Signale zeigen.

Die Expression von HLA-DR beschränkt sich im gesunden Patienten lediglich auf Zellen in der Lamina propria (Abb. 3.26A). Bei Patienten mit aktiver Zöliakie ist neben einer verstärkten Expression in der Lamina propria auch in den Enterozyten die Expression von HLA-DR zu detektieren (Abb. 3.26B).

Bei der Untersuchung wurden Biopsien von Zöliakiepatienten mit unbehandelter, aktiver Zöliakie und behandelte Patienten in Remission, die eine glutenfreie Diät einhalten, sowie Gewebe von gesunden Kontrollpatienten verwendet.

Die Expression von tTG ist bei behandelter Zöliakie (Abb. 3.26C) und Kontrollpatienten (ohne Abbildung) vorwiegend in der Lamina propria und nur selten in den Enterozyten zu beobachten. Bei Patienten mit unbehandelter Zöliakie, unter inflammatorischen Bedingungen, ist neben der Lamina propria eine deutliche Expression der tTG in der Epithelschicht zu detektieren (Abb. 3.26D).

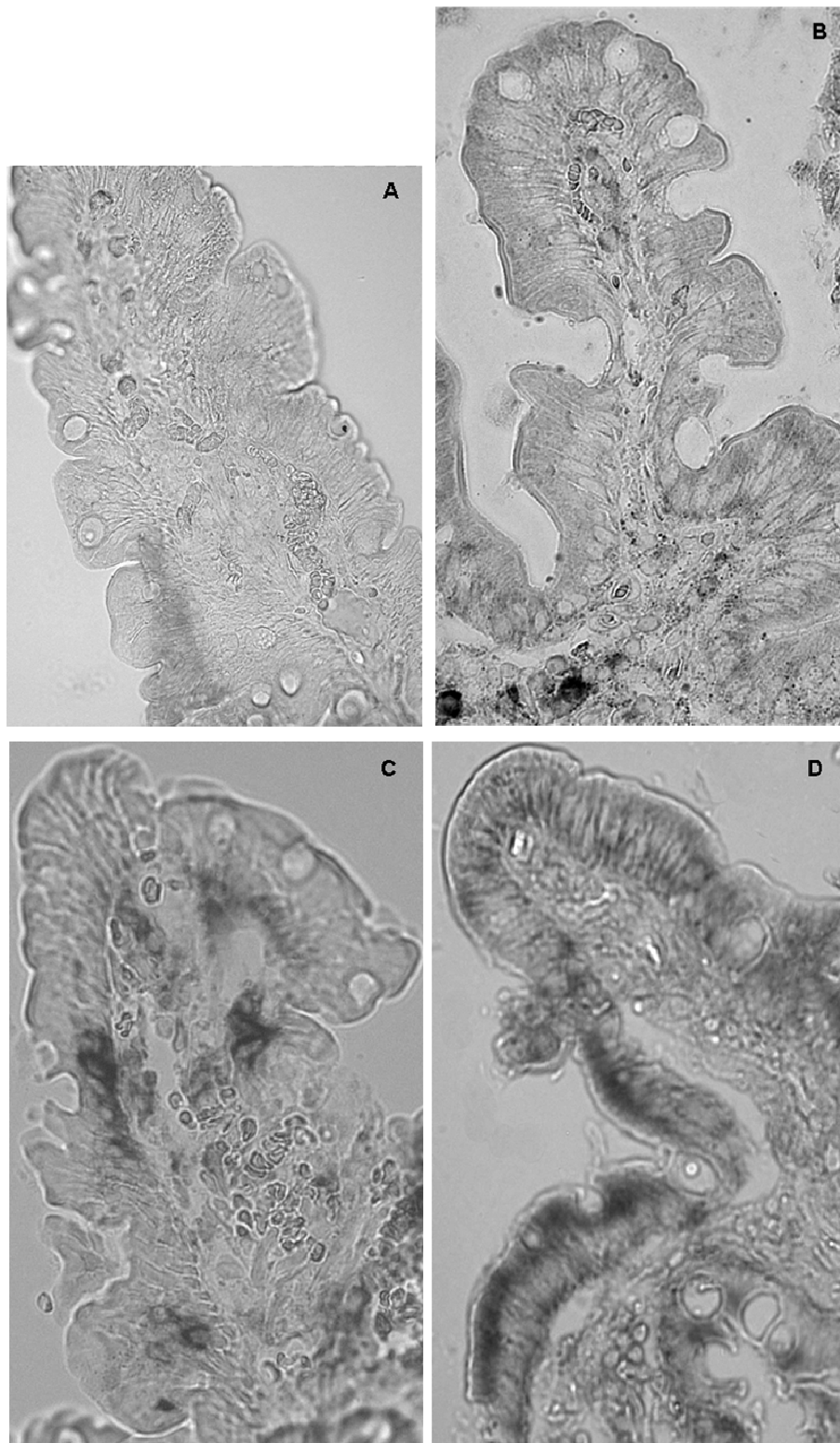


Abb. 3.26: Expression von HLA-DR und tTG2 in Enterozyten von Patientenbiopsien. Die Expression von HLA-DR ist in gesunden Patienten nur in Zellen der Lamina propria zu beobachten (A). Bei Enterozyten von Zöliakiepatienten ist sowohl im Villus als auch im Bereich der Krypten eine Expression von HLA-DR nachzuweisen (B). Die mRNA von tTG ist in den Zellen der Lamina propria (C) sowie in Enterozyten, die besonders in unbehandelten Zöliakiepatienten sehr stark ist (D), nachzuweisen. Die Expression von tTG ist bei behandelter Zöliakie nur bedingt in den Enterozyten zu beobachten (C). Wohingegen die Expression bei aktiver Zöliakie im Epithel deutlich zu erkennen ist (D).

Die Expression der Transglutaminase wurde ebenfalls durch *in vitro* Analysen mittels RT-PCR überprüft. Ebenso wie in den Enterozyten der Kontrollpatienten, kann in den HT29 Zellen unter normalen Bedingungen keine tTG-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.27, Spur 7). Jedoch exprimieren diese Zellen nach Stimulation mit IFN- γ (Spur 5), bzw. nach Inkubation mit FF (Spur 6) die Transglutaminase.

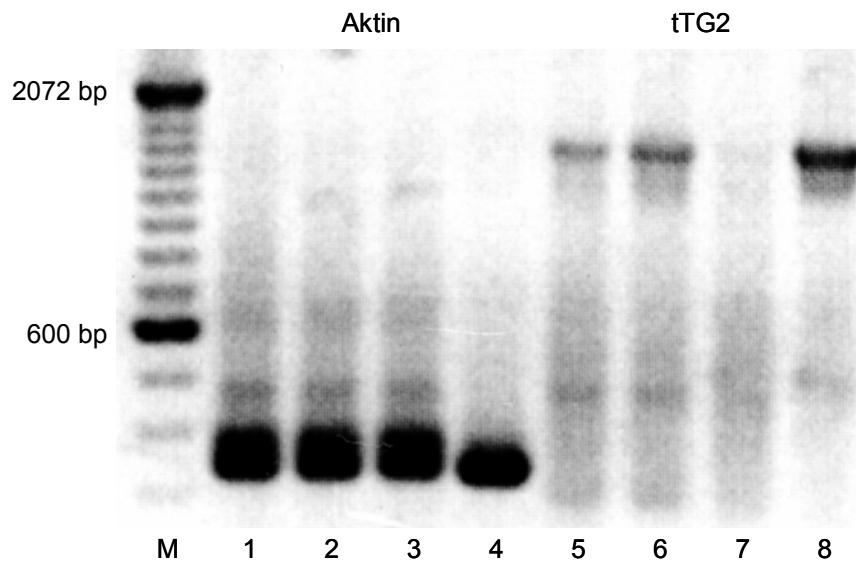


Abb. 3.27: Expression von tTG und Aktin in Fibroblasten und HT29 Zellen.

Die Expression der tTG2 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR in (un-) stimulierten HT29 Zellen überprüft (5-8). Als Kontrolle für die Menge der eingesetzten *template* cDNA wurden parallel RT-PCR mit Aktin-spezifischen Primern durchgeführt (1-4).

Die Expression von tTG in den HT29 Zellen wird durch die Stimulation mit IFN- γ (1 und 5) und nach Inkubation mit FF (2 und 6) induziert. Unstimulierte HT29 Zellen exprimieren keine Transglutaminase (3 und 7), wohingegen in Fibroblasten die tTG2 konstitutiv exprimiert wird (4 und 8).

4 Diskussion

Zur *in vitro* Studie humaner, intestinaler Epithelzellen eignen sich HT29, Caco-2 oder T84 Zellen. Obwohl diese Linien aus Kolonkarzinomzellen generiert wurden, zeigen sie den Phänotyp einer Dünndarmzelle. So werden von diesen Zellen Hydrolasen der Bürstensaummembran des Dünndarms wie z. B. Saccharase-Isomaltase (Caco-2), DPP IV (HT29, Caco-2) oder APN (HT29, Caco-2) exprimiert (3.1.1; Abb. 3.1) [Alfalah et al. 2005]. Studien mit Zellkulturen ermöglichen die Analyse der Reaktion eines bestimmten Zelltyps auf einen definierten Stimulus ohne den Einfluss umliegender Zellen des Gewebes. In diesem Modell wurde der intrazelluläre Transport von Gliadinpeptiden verfolgt und die Lokalisation von HLA-Molekülen analysiert.

4.1 HLA-Expression in intestinalen Zellen

Die konstitutive Expression von HLA-Komplexen der Klasse I ist auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltiger Zellen zu beobachten (1.2.1), wo sie als Zielantigen für CD8⁺ T-Zellen dienen [Pamer and Cresswell 1998].

HLA Klasse II-Antigene werden vorwiegend von spezialisierten Zelltypen exprimiert, die für die Antigenpräsentierung verantwortlich sind. Neben diesen so genannten klassischen APZ exprimieren auch verschiedene Epithelzellen HLA Klasse II-Moleküle, wie die der Niere oder die des Dünndarms (1.2.2).

HLA-Moleküle werden im Zusammenhang mit verschiedensten Erkrankungen, wie insulinabhängiger Diabetes, rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose, diskutiert [Thomson 1995]. Bei der Zöliakie besteht ebenfalls eine Assoziation mit HLA-Antigenen, die für die Präsentation von Gliadinpeptiden verantwortlich sind (Kapitel 1.1).

4.1.1 HT29 und Caco-2 tragen den Zöliakie-relevanten Subtyp HLA-DQ8

Die HLA-DQ-Regionen weisen die hochgradig polymorphen Gene *DQA1* und *DQB1* auf. Die Zöliakie ist assoziiert mit den HLA Klasse II-Subtypen HLA-DQ2 (*DQA1*0501/DQB1*0201*), bzw. -DQ8 (*DQA1*0301/DQB1*0302*) [Sollid et al. 1989; Sollid 2000].

Eine italienische Arbeitsgruppe postuliert zudem einen Zusammenhang mit einem HLA Klasse I-Subtypen, HLA-A2 (A^*0201) [Gianfrani et al. 2003].

Für die *in vitro* Studien dieser Arbeit wurden die drei in Frage kommenden Zelllinien hinsichtlich ihrer HLA-Expression typisiert (Tabelle 3.1). In allen drei Zelllinien konnten verschiedene Antigene der HLA Klasse I und II identifiziert werden. So exprimieren die HT29 Zellen HLA-DQ2 mit der β -Kette $DQB1^*0202$, das auf dem ersten Blick der Zöliakie-relevanten Form entspricht. Jedoch liegt nicht die entsprechende α -Kette des Dimers vor, da DQ2 Moleküle, die zusammen mit DR7 exprimiert werden, aus $DQA1^*0102$ und $DQB1^*0202$ bestehen. Zöliakiepatienten, die negativ für DQ2 sind, tragen häufig den Haplotyp DR4-DQ8 ($DRB1^*04/ DQA1^*03/ DQB1^*0302$) [Koning et al. 2005]. Das Gen für HLA-DQ8 $DQB1^*0302$ ist in HT29 sowie Caco-2 Zellen zu finden und entspricht dem Zöliakie-relevanten Haplotyp. Der von Gianfrani *et al.* beschriebene HLA Klasse I-Subtyp ist in keiner dieser Zelllinien exprimiert, da die HLA-A2-Moleküle in Caco-2 und T84 nicht dem Gen A^*0201 entsprechen (siehe 3.1.1).

Verschiedene Gliadinpeptide binden an HLA-DQ-Moleküle und lösen eine Immunantwort beim Zöliakiepatienten aus [Sollid 2002; Koning 2003; Mazzarella et al. 2003]. Für die HLA-DQ2/ DQ8-abhängige Präsentation von Gliadinpeptiden werden dendritische Zellen als wahrscheinlichste APZ postuliert, obwohl der Zelltyp bislang nicht identifiziert wurde. Die *in vivo* HLA-DQ-Expression in Enterozyten des Dünndarms ist schwächer, bzw. erfolgt nach Induktion später als die HLA-DR-Expression [Natali et al. 1986; Marley et al. 1987; Bonamico et al. 1989]. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit keine *in vitro* HLA-DQ-Expression in den intestinalen Zelllinien detektiert werden (3.1.3). Daher gehen wir davon aus, dass die Funktion der Epithelzellen DQ-unabhängig ist. Vielmehr ist eine HLA-DR-vermittelte Immunreaktion zu erwarten, da dieser HLA II-Subtyp in Enterozyten stark exprimiert wird und auch vermehrt in den späten Endosomen zu beobachten ist [Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 2000; Buning et al. 2006]. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Enterozyten eine modulatorische Funktion bei Immunreaktionen der Zöliakie und der Nahrungsmittelallergie gegen Eialbumin (OVA) haben. So entwickeln immunkompetente BALB/c-Mäuse im Gegensatz zu immundefizienten SCID-Mäusen eine orale Toleranz gegenüber diesem Agens [Zimmer et al. 2000; Buning et al. 2005].

Da die HLA-Proteine in so genannten Kopplungsgruppen auftreten, wären HLA-DR3 (HLA-DR3-DQ2), HLA-DR5, bzw. -DR7 (HLA-DR5/7-DQ2) oder HLA-DR4 bei HLA-DQ8-Trägern die jeweiligen DR-Subtypen [Sollid 2000; Koning et al. 2005]. Die angefertigten Studien dieses Projektes wurden primär als reines Zellmodell für Enterozyten betrachtet. Dabei war die Frage, ob HT29 den HLA-Typ der Zöliakie exprimieren oder nicht, eher im Hintergrund geblieben. Für weiterführende Experimente war an dieser Stelle allein

wichtig, die grundlegenden Eigenschaften der Zellen festzustellen, und ob die Zellen HLA Klasse I- und II-Proteine exprimieren, bzw. unter welchen Bedingungen dies der Fall ist. In vorangegangenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass HLA Klasse I und II unter inflammatorischen Bedingungen auch an der apikalen Membran von Enterozyten zu finden sind [Mayrhofer 1995; Zimmer et al. 2006]. In Biopsien von Zöliakiepatienten ist vorrangig eine erhöhte intrazelluläre Gliadinverteilung in Enterozyten zu beobachten, die ebenfalls eine starke Expression von HLA-Molekülen zeigen. Auf Grund dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass MHC-Komplexe möglicherweise als Rezeptor für die Bindung und Aufnahme von Gliadin in Enterozyten dienen [Zimmer et al. 2006]. Ebenso vermutet Mayrhofer, dass MHC II Moleküle, neben ihrer Funktion bei der Antigenpräsentation, eine Rolle bei der Gliadinaufnahme von Enterozyten spielen [Mayrhofer 1995]. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit aus den gewonnenen *in vitro* Ergebnissen diesbezüglich keine konkreten Rückschlüsse gezogen werden.

4.1.2 Expression von HLA Klasse I- und II-Komplexen in Enterozyten

HLA Klasse I:

HLA Klasse I-Moleküle werden bis auf wenige Ausnahmen in nahezu jeder Körperzelle konstitutiv exprimiert. So sind neuronale Zellen im Gehirn, Spermien und Trophoblastenzellen der Plazenta beispielsweise HLA-A, -B und -C negativ. Werden jedoch Genprodukte exprimiert, unterliegt die konstitutive Expression deutlichen Schwankungen. So sind Klasse I-Moleküle nur in geringen Maßen auf endokrinen Zellen, Hepatozyten und Muskelzellen exprimiert, während sie z. B. auf Zellen des Gastro- und Urogenitaltraktes deutlich nachweisbar sind [Waßmuth 1995].

HLA Klasse I-Antigene bestehen aus einem membranverankerten Glykoprotein (α -Kette), welches das polymorphe Produkt eines der HLA I-Gene ist und einem kleinen, löslichen Protein, das β_2 -Mikroglobulin. An diesen Komplex bindet in der Regel ein kurzes Peptid von 8-10 Aminosäuren [Pamer and Cresswell 1998].

In biochemischen Analysen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass HLA-Klasse-I Moleküle in den verwendeten Zelllinien synthetisiert werden. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Western Blots (ohne Abbildung) und mit biosynthetischer Markierung durch ^{35}S -Methionin und anschließender Immunpräzipitation (3.1.3; Abb. 3.4 und 3.5). Hierbei konnte der Nachweis durch die Bindung des anti- β_2 -Mikroglobulin oder des anti-HLA-A,B,C Antikörpers erbracht werden, da das β_2 -Mikroglobulin (11,5 kD) erst während

der Elektrophorese von der α -Kette (45 kD) getrennt wird (Abb. 3.4). Die Immunfluoreszenz bestätigt die Assoziation von β_2 -Mikroglobulin und der α -Kette, da diese beiden Antikörper eine Kollokalisierung in HT29 Zellen zeigen (3.1.3; Abb. 3.6).

Die Expression von HLA I erfolgt in T84, Caco-2 sowie HT29 konstitutiv und ist durch IFN- γ nicht induzierbar. Für HLA Klasse I-Komplexe wurde das Phänomen der *Cross-Presentation* beschrieben (siehe 1.5.5 und 4.2.6) und dieser Prozess ist nach heutigem Stand der Forschung für die Zöliakie nicht ausgeschlossen. Somit ist die HLA Klasse I-Expression unter normalen und inflammatorischen Bedingungen für die Interpretation für die folgenden *in vitro* Untersuchungen von Interesse (4.2.5; 4.3.2, 4.3.3).

HLA Klasse II:

Die Klasse II-exprimierenden Zellen können in zwei große Gruppen unterteilt werden: B-Lymphozyten und aktivierte T-Lymphozyten, die MHC Klasse II konstitutiv exprimieren und MHC Klasse II-induzierbare Zellen. Letztere benötigen einen externen Stimulus für die Expression. Hierzu zählen Monozyten/ Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans Zellen der Haut, Mikroglia, endotheliale sowie epitheliale Zellen und andere [Waßmuth 1995].

Eine Induktion der Klasse II-Expression in induzierbaren Zellen kann im Rahmen entzündlicher Veränderungen, bei autoimmunen oder infektiösen Prozessen, bei malignen Erkrankungen oder bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen auftreten. Sowohl bei der konstitutiven als auch der induzierten Expression von HLA Klasse II-Komplexen findet im allgemeinen eine Koexpression der Klasse II-Genorte HLA-DR, -DQ und -DP statt. Jedoch finden sich hier deutlich quantitative Unterschiede im Expressionsgrad zwischen den drei Genorten. Zumeist zeigt HLA-DR, gefolgt von DP und DQ, die stärkste Expression [Waßmuth, 1995].

In vitro Experimente in Maus- und Rattenenterozyten zeigten, dass diese gesteigerte Expression durch IFN- γ induzierbar ist [Cerf-Bensusan et al. 1984; Hughes et al. 1991]. Zudem spielt dieses Cytokin bei der Pathogenese der Zöliakie eine wichtige Rolle [al Dawoud et al. 1992; Bendix et al. 1997]. Konform dazu wurde in dieser Studie die Expression von HLA Klasse II-Komplexen in den humanen Kulturzellen HT29 durch IFN- γ -Stimulation erzielt (siehe Abbildung 3.2). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um HLA-DR7/4-Proteine (4.1.1). HLA-DR4 tritt ebenfalls bei HLA-DQ8-positiven Zöliakiepatienten auf, so dass sowohl in HT29 Zellen als auch in den *in vivo* Enterozyten der DQ8-positiven Patienten die Expression gleicher HLA-DR-Subtypen vorliegt. HLA-DQ kann mit einem anti-HLA-DQ Antikörper nicht in den verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden (ohne

Abbildung). In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Enterozyten gar keine oder eine sehr schwache Expression von HLA-DQ aufweisen [Natali et al. 1986; Sarles et al. 1987]. In Patientenbiopsien wurde in dieser Arbeit durch den Nachweis von mRNA, die HLA-DR-Expression auf transkriptioneller Ebene demonstriert (3.3.2; Abb. 3.27).

Bei den Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung (Kapitel 2.6.1) ist in Enterozyten von behandelten Zöliakiepatienten keine HLA-DR Expression nachweisbar (Abb. 3.27A). Jedoch ist bei unbehandelter, aktiver Zöliakie – unter entzündlichen Bedingungen – die Expression von HLA-DR im Epithel zu beobachten (Abb. 3.27 B). Damit ist ausgeschlossen, dass Enterozyten HLA-DR-Antigene durch Endozytose aufnehmen, wie es z. B. für T-Zell-Rezeptorunterheiten (CD8, α/β -TCR und γ/δ -TCR) bereits gezeigt wurde [Zimmer et al. 1998]. Beim Zöliakiepatienten ist der IFN- γ -Gehalt extrem erhöht, so dass die Enterozyten durch dieses Cytokin theoretisch zur HLA Klasse II-Expression angeregt werden können. Dieser Sachverhalt ist jedoch noch nicht geklärt. Bei der erhöhten HLA II-Expression könnte es sich ebenfalls um einen pathogenetisch relevanten Prozess infolge einer direkten Auseinandersetzung mit dem schädigenden Agens Gliadin handeln (4.1.4). Diese Befunde zeigen, dass Enterozyten in der Lage wären Antigene mittels HLA Klasse II-Komplexe an der (basolateralen) Zelloberfläche zu präsentieren, wenn die Expression von HLA II induziert wurde.

Es konnte ebenfalls eine konstitutive Expression von MHC II-Molekülen in Enterozyten von Guinea Ferkeln nachgewiesen und bald darauf für Mäuse und Ratten bestätigt werden [Wiman et al. 1978; Curman et al. 1979; Mason et al. 1981; Bland and Warren 1986]. Scott und Kollegen brachten den Nachweis von HLA-DR und HLA-DQ Expression in humanen Enterozyten des Dünndarms. Diese beschränkte sich, unter nicht entzündlichen Bedingungen, auf Enterozyten der oberen zwei Drittel der Darmzotten [Scott et al. 1980]. Enterozyten wären damit in der Lage auch ohne Stimulus, bzw. unter nicht inflammatorischen Bedingungen Antigene via MHC II zu präsentieren (siehe 4.3.1).

4.1.3 HLA Klasse I-Moleküle sind in frühen Endosomen lokalisiert

Die α -Kette der HLA Klasse I-Moleküle wird im ER translatiert, in die Membran inseriert, glykosyliert und assoziiert dort bereits mit β_2 -Mikroglobulin [Gromme and Neefjes 2002]. Die Bindung eines endogenen Peptides erfolgt beim klassischen Transportweg ebenfalls im ER und der Immunkomplex wird daraufhin über den Golgi-Apparat an die

Plasmamembran transportiert. Jedoch können auch exogene Antigene via MHC I-Komplexe präsentiert werden (siehe 1.5.5). Voraussetzung für solch einen Prozess ist ein Zusammentreffen von exogenen Antigenen mit den MHC I-Molekülen auf dem Weg an die Plasmamembran. Eine Möglichkeit, die beschrieben wurde, ist die Assoziation von MHC I mit einem exogenen Antigen in den Endosomen. HLA Klasse I-Moleküle konnten nach spontaner oder induzierter Internalisierung sowohl in den frühen Endosomen von B Lymphozyten nachgewiesen werden [Chiu et al. 1999] als auch im endosomalen Kompartiment von T-Zellen und Makrophagen [Reid and Watts 1990; Yewdell and Bennink 1992; Gromme et al. 1999].

Dafür wurden wiederum zwei verschiedene Transportwege von MHC I zu den Endosomen postuliert. Zum einen der direkte Transport der MHC I-Proteine vom ER zum endosomalen Kompartiment [Sugita and Brenner 1995; De Bruijn et al. 1995] und zum anderen das Recycling von MHC I-Proteinen durch Endozytose an der Plasmamembran und Transport zu den Endosomen [Reid and Watts 1990; Chiu et al. 1999]. Konform zu den Beobachtungen von Chiu konnten auch in dieser Arbeit HLA Klasse I-Proteine in den frühen Endosomen von stimulierten und unstimulierten HT29 Zellen lokalisiert werden (Abb. 3.7 und 3.8 A). Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen kann an dieser Stelle jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, auf welchem Wege die HLA I-Moleküle dorthin transportiert werden. Eine Kolokalisation von Cathepsin D und HLA I liegt nicht vor, dementsprechend sind späte Endosomen HLA Klasse I negativ (Abb. 3.8B).

Im spätendosomalen Kompartiment findet die Assoziation von MHC Klasse II-Molekülen mit exogenen Antigenen statt [Peters et al. 1991]. In der vorliegenden Arbeit können HLA Klasse II-Moleküle in Lamp-2/Cathepsin D-positiven, späten Endosomen der HT29 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.9).

Die Lokalisation von HLA Klasse I in frühen Endosomen konnte bereits in verschiedenen Immunzellen demonstriert werden [Harding 1995; Chiu et al. 1999; Rodriguez et al. 1999]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen dieses Phänomen jedoch erstmals für Enterozyten und unterstreichen die Rolle der Enterozyten als immunkompetente Zelle.

4.1.4 Die Expression von HLA Klasse I-Proteinen in Enterozyten wird durch Gliadinexposition erhöht

Enterozyten bilden die erste Kontaktstelle für oral aufgenommene Antigene und stellen in Form einer Barriere einen wichtigen Teil der angeborenen, unspezifischen Immunantwort dar. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Integrität des Epithels unter inflammatorischen Bedingungen, wie auch bei der Zöliakie, gestört ist. So konnte gezeigt werden, dass Gliadin einen direkten Einfluss auf Epithelzellen hat. Die Gliadinexposition (1mg/ml) von Caco-2 Zellen führt zur Reduktion der Barrierefunktion gemessen anhand des TER (*transepithelial electrical resistance*)-Wertes [Sander et al. 2005]. Nach 100 Minuten Exposition ist der TER-Wert um 40% reduziert und der Flux von 4kD-Dextran um das 3-fache erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Nach 4 Stunden Inkubation erhöht sich der Flux von 4kD-Dextran sogar auf das 6-fache, wohingegen der Flux größerer Moleküle (70kD-Dextran) keine Änderungen im Lauf der Experimente zeigt. Sander und Kollegen beobachteten, dass dies auf die Reduktion der Expression von Claudinen, ZO-1 und E-Cadherin zurückzuführen ist. Nach Entfernung des Gliadins war der normale TER über Nacht wieder hergestellt.

Weiterhin kommt es in intestinalen Rattenenterozyten nach Gliadinexposition zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und ebenfalls zur Reduktion des TER-Wertes [Clemente et al. 2003].

In Studien mit HT29 konnte gezeigt werden, dass auch die Expression der tTG nach Inkubation mit Frazer's Fraction hoch reguliert wird [Zimmer et al. 2006]. Ebenfalls konnte in dieser Arbeit mittels *in situ* Hybridisierung (2.6.1) in Enterozyten von unbehandelten Zöliakiepatienten nachgewiesen werden, dass die tTG-Expression im Vergleich zu den Kontrollpatienten stark erhöht ist (3.3.2; Abb. 3.26). Maiuri *et al.* beobachteten zudem, dass das toxische Peptid 31-43 in Organkulturen und T84 Zellen zu einer erhöhten tTG-Expression sowie Aktinreorganisation und erhöhter Tyrosinphosphorylierung führt [Maiuri et al. 2005].

In Enterozyten von Zöliakiepatienten ist die Expression von HLA-DR (Abb. 3.27), seltener HLA-DQ erhöht [Marley et al. 1987; Zimmer et al. 2006]. In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Einfluss von Gliadin auf die HLA-Expression von HT29 Zellen analysiert. Diese Zelllinie exprimiert konstitutiv HLA Klasse I-Moleküle (3.1.3; Abb. 3.3) und nach IFN- γ -Stimulation auch die Klasse II-Moleküle (Abb. 3.3 und 3.4). Die Expression von HLA Klasse II-Komplexen wird durch die alleinige Inkubation mit Frazer's Fraction nicht induziert (Abb. 3.10C). Auch die Stimulierung mit IFN- γ und zusätzliche Exposition mit Gliadin hat keinen Einfluss auf die Expression von HLA II (Abb. 3.10C).

Sollid *et al.* zeigten in Übereinstimmung dazu, dass die Inkubation mit Trypsin behandeltem Gliadin (T-Gliadin) in Abwesenheit von IFN- γ und immunkompetenter Zellen keine Induktion der Genexpression von HLA-DR in HT29 Zellen erzeugt [Sollid *et al.* 1987]. Ebenso wurde in einer neueren Arbeit demonstriert, dass die Expression der HLA Klasse II-Proteine in HT29 nicht aber in Caco-2 Zellen durch IFN- γ induziert wird. Diese Gruppe benutzte biotinyliertes Gliadin, das, wie in unseren Experimenten, kein immunregulatorischen Effekt (weder in An- noch in Abwesenheit von IFN- γ) auf die HLA II-Expression hat [Chirido *et al.* 2002]. Jedoch konnten Mothes und Kollegen abweichend feststellen, dass die Inkubation mit T-Gliadin oder Casein in Anwesenheit von IFN- γ zu einer gesteigerten Expression von HLA Klasse II in HT29 führt. Keinen Einfluss zeigten hier unverdautes Gliadin, Trypsin-verdautes Casein und β -Lactoglobulin. Der Nachweis erfolgte durch die Markierung von HLA Klasse II mit einem anti-HLA-DP,DQ,DR Antikörper. Die Expression wurde anschließend durch Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie bestimmt [Mothes *et al.* 1995]. Die Methode der Durchflusszytometrie ist eventuell sensitiver als die Analysen der Immunpräzipitation, so dass Unterschiede in der Expression von HLA Klasse II-Proteinen auch in unseren Studien vorliegen könnten, sie aber nicht messbar waren.

Im Kontrast zu den Zellkulturstudien ist in Villusenterozyten von Zöliakiepatienten (unter glutenfreier Diät) eine vermehrte HLA-DR Expression durch Gliadinexposition allein zu beobachten. Bereits nach einstündiger Inkubation der Biopsien mit P/T Gliadin zeigte sich eine signifikante Zunahme der HLA-DR Markierung [Maiuri *et al.* 1996].

Bezüglich der HLA I-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit auch in HT29 Zellen ein Effekt der Gliadinexposition detektiert werden. Die Zellen zeigen eine gesteigerte Expression der HLA Klasse I-Moleküle (3.1.3; Abb. 3.10A und B). Dieses Ergebnis deckt sich mit *in vivo* Befunden in Enterozyten von Zöliakiepatienten. Hier konnte ebenfalls eine Überexpression von HLA Klasse I beobachtet werden. In ultrastrukturellen Untersuchungen mittels Immunelektronenmikroskopie ist eine starke Markierung im Golgi-Apparat und auch an der apikalen Membran nachgewiesen [Zimmer *et al.* 2006].

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass im Zusammenspiel von Cytokin-vermittelten Interaktionen zwischen Enterozyten und Lymphozyten einzelne Nahrungspeptide die Präsentation von Antigenen hoch regulieren. Dies führt zu einer effizienteren Stimulation von Lymphozyten, was entweder zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (MHC I-vermittelt) oder supprimierender Th Zellen (MHC II-vermittelt) führen kann.

In Anbetracht der Beobachtungen von Gianfrani *et al.* 2003 wird der Fragestellung nachgegangen, ob die MHC Klasse I-Expression von Enterozyten eine pathophysiologische Relevanz für die Villusatrophie bei Zöliakiepatienten hat.

4.2 Lokalisation von Gliadin in Enterozyten

Ca. 10% der Nahrungsproteine entgehen während der gastrointestinalen Passage einer Degradation und erreichen die luminalen Enterozytenoberfläche im nativen Zustand. Sie entziehen sich dabei der physiologischen Barriere, bestehend aus unspezifischen Faktoren wie der Magensäure, digestiven Enzymen, Mukus und immunologisch spezifischen, sekretorischen Immunglobulinen IgA und IgM [Sanderson and Walker 1995]. Die Aufnahme luminaler Antigene im Darm erfolgt prinzipiell über den transzellulären oder parazellulären Transport durch das Epithel (1.4). Im gesunden, intakten Zustand des intestinalen Epithels sind die *Tight Junctions* gegenüber HRP undurchlässig [Powell 1981; Berin *et al.* 1997]. Lediglich Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 5,5 kD sind in der Lage, die *Tight Junctions* im Rahmen des so genannten *solvent drag* zu durchdringen. Dafür wird eine Porengröße von etwa 5nm kalkuliert [Pappenheimer and Reiss 1987].

4.2.1 Frazer's Fraction werden von HT29 Zellen aufgenommen

Für die Aufnahme von Makromolekülen in Enterozyten sind aktive Clathrin-abhängige Endozytosevorgänge nachgewiesen, die durch spezifische oder unspezifische Rezeptorbindung an der Mikrovillusbilddarmmembran vermittelt werden [Sanderson and Walker 1995]. Die Aufnahme luminaler Makromoleküle kann aber auch passiv durch sich ausbildende Invaginationen der apikalen Membran erfolgen, was als *Fluid Phase* Endozytose bezeichnet wird (siehe Abschnitt 1.4). Nutritive Makromoleküle binden zumeist unspezifisch oder werden durch *Fluid Phase* endozytiert. In *in vitro* und *ex vivo* Studien konnte für Makromoleküle wie BSA, β -Lactoglobulin oder OVA eine unspezifische Rezeptorbindung bzw. Adhärenz nachgewiesen werden [Stern *et al.* 1984; Bland and Warren 1986; Bland and Whiting 1989].

Für die Aufnahme von Gliadinpeptiden konnte bislang kein spezifischer Rezeptor identifiziert werden, so dass davon auszugehen ist, dass Gliadin ebenfalls unspezifisch absorbiert wird. Jedoch konnte bereits für Gewebe und Kulturzellen die Bindung und

Aufnahme von Gliadin durch Enterozyten gezeigt werden [Melter et al. 1988; Bendix et al. 1997; Bolte et al. 1999]. Zudem konnten in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe Zimmer konform zu den hier vorliegenden Ergebnissen mittels Immunfluoreszenzen und Elektronenmikroskopie intrazelluläre Lokalisationen von Gliadinpeptiden festgestellt werden [Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 1998; Zimmer et al. 2006]. In diesen Arbeiten wurde Gliadin in unterschiedlichen Kompartimenten, wie frühen und späten Endosomen, Golgi Apparat oder im Zytosol der Enterozyten von Patienten nachgewiesen.

HT29 Zellen bilden im konfluenten Zustand einen dichten Zellrasen, der für Makromoleküle nicht passierbar ist. Die Zellen endozytieren ebenfalls Makromoleküle wie FITC-Dextran (Abb. 3.11), Frazer's Fraction (Abb. 3.12 und 3.13) oder auch OVA (Abb. 3.17). Nach der Aufnahme eines exogenen Antigens gelangt dieses in frühe Endosomen und wird von dort zu seinem Bestimmungsort transportiert. Dabei wird ein Teil der aufgenommenen Antigene durch Transzytose direkt zu einer anderen Membrandomäne transportiert. So gelangen luminal Makromoleküle ohne enzymatische Degradation in intakter Form über die intestinale Barriere [Heyman and Desjeux 1992]. Die breite Mehrheit gelangt über den degradierenden Pfad in das spätendosomale Kompartiment. Die intrazelluläre Hydrolyse kleiner Peptide ist der wichtige terminale Schritt der Proteinverdauung [Gardner 1988]. Auch einer erfolgreichen Antigenpräsentation geht zunächst eine intrazelluläre Prozessierung und Komplexbindung des aufgenommenen Antigens in den späten Endosomen voraus [Peters et al. 1991; Geuze 1998].

Über die intrazellulären Transportvorgänge und Prozessierungsprozesse des Gliadins innerhalb der Enterozyten ist bis heute wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Transport von Gliadin *in vitro* verfolgt und auch verändert (4.2.4). Den erhaltenen Ergebnissen zufolge lassen sich zwei verschiedene Transportwege in HT29 Zellen differenzieren: a) die Aufnahme großer Mengen Gliadin ins Zytosol der Zellen - RACE (4.2.2) und b) der vesikuläre Transport (4.2.3 und 4.2.4).

4.2.2 RAC-Enterozyten

In Dünndarmbiopsien von Zöliakie-, Morbus Crohn- und Colitis Ulcerosa-Patienten sowie in BALB/c und SCID Mäusen wurde ein besonderer Typ von Enterozyten beobachtet. In diesen Zellen kann schon wenige Minuten nach oraler Zufuhr eine große Menge Antigen im Zytosol nachgewiesen werden, wobei in normalen Enterozyten die Antigene in vesikulären Strukturen detektiert wurden. Auf Grund dieser Eigenschaft nennen die Autoren diese Zellen RACE (*R*apid uptake of *A*ntigen into the *C*ytosol of *E*nteroocytes).

Die RACE zeichnen sich u. a. durch verkürzte Mikrovilli, elektronendurchlässiges Zytosol und reduzierte Konzentration der mitochondrialen ATP-Synthase von anderen Enterozyten ab [Schurmann et al. 1999; Kersting et al. 2004]. In jüngeren Studien stellte sich heraus, dass die RACE-Zellen nicht apoptotischen Ursprungs sind. In geringen Mengen wurde Caspase-3, ein Marker der Apoptose, jedoch in diesen Zellen nachgewiesen, so dass RACE-Zellen möglicherweise ein frühes Stadium der Apoptose darstellen. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass das Antigen OVA weder in Biopsien noch in HT29 Zellen eine Caspase-3 abhängige Apoptose induziert [Kersting et al. 2004]. Die hier vorliegenden Resultate demonstrieren ebenfalls eine OVA- (ohne Abbildung) und Gliadinaufnahme (Abb. 3.13A) ins Zytosol von HT29 Zellen. Dabei sind OVA und Gliadin teilweise in denselben RACE, aber auch in benachbarten RACE zu finden. Analog zu den Ergebnissen von Kersting *et al.* sind diese Zellen ebenfalls nicht apoptotisch. Caspase-3 kann nicht in den RACE, jedoch vereinzelt in benachbarten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.13B).

Ob den RACE eine bestimmte physiologische oder immunologische Funktion zuzusprechen ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Anzahl an RACE-Zellen in stark entzündeter Mukosa signifikant ansteigt [Schurmann et al. 1999]. Außerdem ist der Transfer exogener Antigene ins Zytosol ein entscheidender Prozess für MHC I-restringierte Antigenpräsentation (*Cross-Presentation*, siehe Kapitel 1.5.5). Zudem werden RACE-Zellen in das Darmlumen abgestoßen und hinterlassen einen Defekt in der Epithelschicht, so dass ein parazellulärer Transport luminaler Antigene erleichtert wird. Eine andere Hypothese ist die Endozytose dieser Zellen durch andere Zellen und damit eine wiederholte Aufnahme bereits internalisierter Antigene. Dies könnte durch erneute Prozessierung zur Bildung neuer oder Zerstörung tolerogener Antigenepitope führen. So unterscheidet sich z. B. auch die Prozessierung exogener Antigene nach apikaler und basolateraler Aufnahme. Die Antigene sind dadurch unterschiedlichen Proteasen ausgesetzt und so können auf diese Weise funktionell unterschiedliche Sequenzen im Hinblick auf die Erzeugung von T-Zell-Epitopen entstehen [Hershberg and Mayer 2000].

4.2.3 Toxische Gliadinpeptide gelangen nicht in späte Endosomen

Heyman *et al.* konnten in der Ussing Kammer unter Verwendung von jejunalen Kaninchenenterozyten den transzellulären Flux intakter HRP-Moleküle quantifizieren. Nach ihren Erkenntnissen wurden ca. 3% des apikal applizierten HRPs intakt transzytiert, wohingegen 97% intrazellulär degradiert wurden [Heyman *et al.* 1982; Heyman and Desjeux 1992]. Nachfolgende *in vitro* Studien an isolierten Enterozyten zeigten sogar 10% intakt verbliebenes HRP [Terpend *et al.* 1998; Heyman 2001]. In diesen Experimenten wurde jedoch nicht die Frage beantwortet, welche subzellulären Kompartimente in diesem Transportprozess involviert sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die an diesem Transzytosevorgang beteiligten subzellulären Kompartimente für Gliadinpeptide zu identifizieren. Die Aufnahme von exogenen Antigenen in *in vivo* Experimenten erfolgt innerhalb weniger Minuten, so dass z. B. OVA bereits nach 5 Minuten in endosomalen Vesikeln nachweisbar ist [Zimmer *et al.* 2000; Buning *et al.* 2006]. Es ist bekannt, dass die Endozytoserate zwischen einzelnen Zelltypen und zwischen Kulturzellen und Gewebe variiert [Mullock *et al.* 1994; Luzio *et al.* 2000]. HT29 Zellen unterscheiden sich diesbezüglich stark von den *in vivo* Eigenschaften der Enterozyten (siehe auch 3.2.1). In den hier durchgeführten Untersuchungen hat sich eine Inkubationszeit von mindestens 2,5 Stunden als angemessen gezeigt.

Gliadin aus Frazer's Fraction wird während der intrazellulären Passage in frühe und späte Endosomen von HT29 Zellen transportiert (Abb. 3.12). Das Gliadin unterliegt somit den degradierenden Prozessen verschiedener endosomaler Proteasen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass Gliadin sowohl in die frühen als auch späten Endosomen von Zöliakiepatienten gelangt [Zimmer *et al.* 1995; Zimmer *et al.* 2006]. In diesen Arbeiten wurde zwischen toxischen und nicht-toxischen Peptiden sowie zwischen Zöliakie- und Kontrollpatienten unterschieden. Toxische Peptide gelangten nicht in späte Endosomen und waren bei Zöliakiepatienten sehr stark im Golgi-Apparat sowie in RACE Zellen nachzuweisen. In den Kontrollpatienten konnte deutlich weniger Gliadin in den Enterozyten detektiert werden, meist nur in kleinen Vesikeln an der apikalen Membran, aber auch hier waren toxische Peptide nicht in späten Endosomen zu finden.

Die bisherige Zöliakie-Forschung mit synthetischen Peptiden hat sich auf die α -Gliadine fokussiert, wobei *in vivo* und *in vitro* Modelle eine schädigende Wirkung der aminoterminalen Region des α -Gliadins zeigten [De Ritis *et al.* 1988; Sturgess *et al.* 1991]. Die Peptide werden entweder als immundominant, bzw. immunregulatorisch oder als toxisch eingestuft (Kapitel 1.1.7).

Die immundominanten Peptide rufen eine CD4⁺ T-Zellantwort hervor, während den toxischen Peptiden eine direkt schädigende Wirkung auf die Mukosa (es wurde kein intestinaler T-Zellklon identifiziert) zugeschrieben wird [Arentz-Hansen et al. 2000; Maiuri et al. 2003].

Die Arbeitsgruppe von Martine Heyman hat mit Hilfe von HPLC Radiochromatographie die Prozessierung von verschiedenen radioaktiv markierten α -Gliadinpeptiden (31-49; 57-68 und 33-mer 56-89) analysiert. Parallel dazu wurde in der Ussing Kammer deren transzellulärer Flux durch Gewebeproben von Kontroll- und Zöliakiepatienten (behandelt und unbehandelt) gemessen [Matysiak-Budnik et al. 2003]. Während hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Zöliakiepatienten und Kontrollpatienten beobachtet wurden, gab es erhebliche Unterschiede beim intestinalen Transport zu den Patienten mit aktiver Zöliakie. In den Kontrollpatienten wurden alle drei Peptide während des Transports nahezu vollständig degradiert (~90%). Nach der transzellulären Passage von Biopsien mit aktiver Zöliakie wurde das Peptid 57-68 extensiv degradiert, während das Peptid 31-49 resistent gegenüber der Degradation war. 50% im Vergleich zu 9% bei den Kontrollen blieben nach der Passage im intakten Zustand. Gleichzeitig war die transportierte Menge dieses Peptides zweimal so hoch wie bei den Kontrollpatienten. Die Autoren schlossen anhand der gewonnenen Daten einen generellen Defekt beim intestinalen Transport von Gliadinpeptiden bei der Zöliakie aus. Sie vermuten vielmehr einen spezifischen Transportweg für das toxische Peptid 31-49.

Diese Ergebnisse sprechen für einen unterschiedlichen intrazellulären Transport- und Prozessierungsweg der toxischen gegenüber den nicht-toxischen Peptiden und des Weiteren für einen raschen Transport des toxischen Peptides in den Interzellulärspalt. Die Studie zeigt jedoch nicht, welche intrazellulären Kompartimente von den einzelnen Peptiden durchlaufen werden.

In den vorliegenden Studien und in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden die intrazellulären Transportwege von Gliadinpeptiden charakterisiert. In Patientenbiopsien konnte der indirekte Nachweis erbracht werden, dass toxische Peptide in frühe Endosomen (Lamp-negative Vesikel) gelangen. Es konnte dort ebenfalls gezeigt werden, dass toxische Peptide im Golgi-Apparat und nicht-toxische Peptide in Lamp- und MHC II-positive Endosomen transportiert werden [Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 2006]. Hierbei wurde Gliadin in Form von Frazer's Fraction verwendet, während in den vorliegenden *in vitro* Untersuchungen zusätzlich synthetische Peptide mit definierter Sequenz eingesetzt wurden. Dafür wurden die oben beschriebenen Peptide 56-68 und 31-49 sowie ein Kontrollpeptid des α -Gliadins verwendet (1.1.7 und 2.1.4).

Da bevorzugt die N-terminale Region des α -Gliadins die sich wiederholenden toxischen Sequenzen beinhaltet (Kapitel 1.1.7), wurde für das aktuelle Projekt eine Peptidsequenz des C-terminalen Endes als „nicht-toxisches“ Kontrollpeptid (α -Gliadin 229-246) gewählt. Übereinstimmend mit den vorangegangenen Ergebnissen in den Patientenbiopsien sind nicht-toxische Peptide, das immundominante Peptid 56-68 und das Kontrollpeptid, sowohl in frühen als auch späten Endosomen von HT29 Zellen lokalisiert (Abb. 3.18 und 3.19). Der Nachweis von Peptiden in frühen Endosomen erfolgte, anders als in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen, hier direkt durch die Markierung mit EEA-1. Im Gegensatz dazu wurden in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen Endosomen nach morphologischen Eigenschaften und Lamp-Negativität, als frühe Endosomen definiert. Konform zu den Ergebnissen von Zimmer *et al.* 2006 kann das toxische Peptid in frühen Endosomen, nicht aber in den späten Endosomen von HT29 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Das Peptid ist auch nicht mit HLA Klasse II kolokalisiert (Abb. 3.21). Wenn das toxische Peptid nicht in das späte endosomale Kompartiment gelangt, könnte das erklären, warum dieses Peptid während des transzellulären Transports intakt bleibt.

Das toxische Peptid kolokalisiert mit HLA Klasse I-Molekülen in den frühen Endosomen (4.1.3), gelangt jedoch nicht in späte Endosomen, wo die Assoziation mit HLA Klasse II-Molekülen stattfindet. Eine Präsentation des toxischen Peptides durch HLA II-Komplexe ist somit nahezu ausgeschlossen und ein wichtiger Prozess für die orale Toleranzinduktion nicht möglich (siehe 4.3.2).

Der Nachweis, dass späte Endosomen bei der Präsentation exogener Antigene durch Enterozyten involviert sind, wurde für Rattenenterozyten [Bland and Whiting 1989] und für die humane Zelllinie T84 [Hershberg *et al.* 1997] erbracht. Beide Gruppen zeigten eine Inhibierung der T-Zell-Stimulation durch Enterozyten nach Inkubation mit den lysosomotrophischen Agenzien Chloroquin, Ammoniumchlorid oder Bafilomycin. Die schwachen Basen greifen in die pH-Regulation der aziden Kompartimente ein und führen zu einer Funktionsstörung. Zudem gelang auch der morphologische Nachweis von MHC II-Komplexen in spätendosomal Kompartimenten von Rattenenterozyten [Mayrhofer and Spargo 1990]. Die Autoren konnten mittels Simultanmarkierung von MHC II und saurer Phosphatase MHC II-Moleküle in späten, lysosomalen Endosomen nachweisen. Zusätzlich konnten sie auf elektronenmikroskopischer Ebene MHC II-Komplexe in multivesikulären Körpern und in supranukleär lokalisierten, unterschiedlich großen Vesikeln nachweisen.

Folglich belegen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Matysiak-Budnik *et al.* einen differentiellen Transport- und

Prozessierungsweg von toxischen und nicht-toxischen Peptiden in Enterozyten. Als Folge des unterschiedlichen Transports könnte es durch die Komplexbildung mit MHC I Molekülen in den frühen Endosomen zur zytotoxischen Lyse und Apoptose der Enterozyten (*Cross-Presentation*) kommen (4.2.6). Andererseits würde eine Transzytose des intakten Peptides bedeuten, dass dieses Peptid in der Lamina propria oder interepithelial vorliegt. Hier könnten toxische Peptide von Makrophagen oder dendritischen Zellen der Lamina propria aufgenommen und prozessiert werden. Jedoch erscheint die Aufnahme und Präsentation des toxischen Peptides durch klassische APZ der Lamina propria mit anschließender T-Zell-Antwort eher unwahrscheinlich, da das Peptid 31-49 nur moderat an HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 bindet und bisher kein entsprechender intestinaler T-Zellklon identifiziert wurde [Shan et al. 2002; Brandtzaeg 2006]. Wahrscheinlicher ist, dass die Präsenz des intakten Peptides in der Lamina Propria zu einer unspezifischen Immunantwort des angeborenen Immunsystems führt. Wie bereits gezeigt, induziert das Peptid 31-43 in Zöliakiepatienten eine schnelle Expression von IL-15 in Zellen der Lamina propria, CD83 auf dendritischen Zellen, COX-2 (auf Makrophagen und Monozyten) und CD25 von CD3⁻ Zellen sowie Apoptose der Enterozyten und Infiltration von CD8⁺T-Zellen [Maiuri et al. 2003; Londei et al. 2005]. Im Weiteren begünstigt die Präinkubation von Peptid 31-43 und folgende Inkubationen mit den immundominanten Peptiden $\alpha 2$ und $\alpha 9$ (siehe Kapitel 1.1.7) die Aktivierung von T-Zellen durch die immundominanten Peptide. Diese Phänomene waren nicht bei den Kontrollpatienten zu beobachten, so dass es sich dabei um Zöliakie-spezifische Reaktionen handelt. Genauso zeigte die alleinige Inkubation von Peptid $\alpha 2$ oder $\alpha 9$ für bis zu 24h keine wesentlichen Veränderungen. Das toxische Peptid 31-49 induziert ebenfalls die Expression von MICA in Enterozyten von Zöliakiepatienten. Diese Induktion ist hauptsächlich abhängig von einer Antwort des angeborenen Immunsystems, ausgelöst durch das Peptid selbst und vermittelt durch IL-15 [Hue et al. 2004].

Schlussfolgernd favorisieren die Autoren ein Zusammenspiel aus angeborener und spezifischer Immunantwort, wobei das toxische Peptid 31-49/43 die initialen Prozesse vermittelt.

Welche immunologischen Konsequenzen der unterschiedliche Transport von Gliadinpeptiden in Enterozyten mit sich bringt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Im Folgenden wurde versucht, das toxische Peptid gezielt in die späten Endosomen zu steuern (4.2.4).

4.2.4 Modulation des Transports des toxischen Gliadin-Peptids in späte Endosomen

Es besteht die Möglichkeit, den Transport von Proteinen oder Peptiden gezielt zu verändern, bzw. in ein bestimmtes Kompartiment zu lenken. Dies kann geschehen, in dem man eine Signalsequenz durch Klonierung anhängt [Rowell et al. 1995] oder durch chemische Vernetzung der Proteine/Peptide [Bergerot et al. 1997]. Als ein sehr effizientes Trägermolekül hat sich die B-Untereinheit des Cholera Toxins etabliert, die entweder chemisch oder genetisch an ein Antigen konjugiert wird.

Cholera Toxin (CT) wird vom Bazillus *Vibrio cholerae* produziert und löst schwere Durchfälle mit massivem Wasserverlust aus. Dabei interagiert CT mit den intestinalen Epithelzellen und induziert eine Chloridsekretion auf Grund von Toxin-vermittelter Aktivierung der Adenylatcyclase und Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts [Lencer and Tsai 2003]. CT gehört zu der Familie der AB₅-Toxine: fünf identische 11-kD große Peptide sind zu einer ringförmigen Struktur assoziiert und formen die pentamere B-Untereinheit (CTB). Diese B-Untereinheit ist ein Lektin, das an GM1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet. Die A-Untereinheit beinhaltet zwei funktionelle Domänen, ein KDEL-Motiv (A2-Kette) für den retrograden Transport von der Plasmamembran zum ER und eine ADP-Ribosyltransferase (A1-Kette) zur Aktivierung der Adenylatcyclase. Während CT als ein potentes Adjuvants beschrieben wird [Sanchez et al. 2002; Bregenholt et al. 2003; Verdonck et al. 2005], ist CTB ein sehr effizienter mukosaler Träger für verknüpfte Antigene [Bergerot et al. 1997; Ploix et al. 1999; George-Chandy et al. 2001].

Die Untereinheit B des Cholera Toxins ist nicht pathogen, ist jedoch diejenige Struktur, die für die Bindung an die Zellmembran verantwortlich ist. Die Bindung an GM1 ist essentiell für die Immunentwicklung von CTB und führt zur zellulären Internalisierung von CTB in Vesikel [Lencer et al. 1999]. CTB-Antigen-Konjugate zeigten in verschiedenen Studien, dass die Immunantwort gegen das konjugierte Antigen sehr viel effizienter verlief und zu einer oralen Toleranzinduktion führt. Ausgewählte CTB verknüpfte Antigene wurden auf diese Weise im Tiermodell eingesetzt, um T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen [Bergerot et al. 1997; Ploix et al. 1999; Petersen et al. 2003], IgE-vermittelte allergische Reaktionen [Wiedermann et al. 1999; Rask et al. 2000] und durch Infektion ausgelöste Entzündungsreaktionen [McSorley et al. 1998] zu unterdrücken. Erstmals wurde bereits ein CTB-Antigen-Konjugat für die klinische Phase I/II bei der Bechterew-Krankheit angenommen, was die Bedeutung und die bestehenden Möglichkeiten dieser Strategie für Therapien unterstreicht [Stanford et al. 2004]. Das mikrobielle HSP65 und das homologe,

humane HSP60 werden für die Ätiologie von Bechterew verantwortlich gemacht. Das Peptid 336-351 wurde als T-Zell-Epitop identifiziert und als krankheitsspezifisches Peptid bestätigt. Dieses Peptid p336-351 wurde an rekombinantes CTB (rCTB) gekoppelt und zeigte nach oraler Applikation in Ratten eine signifikant reduzierte Entwicklung von Uveitis (eine assoziierte Erkrankung bei Bechterew) [Phipps et al. 2003]. In Patienten mit Bechterew zeigte sich, dass die behandelten Patienten seltener einen Rückfall für Uveitis oder anderer Symptome erlitten [Stanford et al. 2004].

Der Einsatz von Peptid-CTB Konjugaten ist wesentlich effizienter bei der tolerogenen Wirkung als die Applikation des Antigens allein und erfordert geringere Dosen des Antigens. Die bisherigen Untersuchungen erfolgten mit dendritischen Zellen oder Makrophagen als APZ und Analysen der induzierten Immunantwort sowie pathologischer Folgeeffekte. Jedoch konnte bisher nicht demonstriert werden, welcher Zelltyp für eine modifizierte Immunreaktion letztendlich verantwortlich ist. Auch das Schicksal von Peptid-CTB-Konstrukten während der epithelialen Passage wurde bislang nicht untersucht. Bei der Cholera-Infektion wurde für das Toxin der retrograde Transport vom Golgi zum ER und der Transport der Untereinheit A ins Zytosol zur Aktivierung der Adenylatcyclase beschrieben [Lencer and Tsai 2003]. In Hepatozyten und Caco-2 Zellen konnte wiederum eine proteolytische Aktivierung des Toxins durch Cathepsin D in den Endosomen beobachtet werden [Merlen et al. 2005]. Dabei zeigten das native CT und das CTB die höchste Affinität für Cathepsin D. Damit wurde demonstriert, dass CTB eine Transportkompetenz für das spätendosomale Kompartiment besitzt.

Da Cholera Toxin Untereinheit B (CTB) die Immunreaktion gegenüber einem Antigen steigert und zu einer erhöhten peripheren Toleranzinduktion führt, wäre eine Translokation von CTB konjugierten toxischen Gliadinpeptiden von frühen Endosomen - ohne Bindung an HLA-Klasse I-Proteine - in späte Endosomen und Präsentation durch HLA-Klasse II-Proteine an CD4⁺ T-Lymphozyten, ein Ansatz für die Induktion einer (sekundären oder auch primären) oralen Toleranz.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das toxische Peptid 31-49 durch CTB-Konjugation einen anderen, intrazellulären Transportweg in den HT29 Zellen eingeht. Wie oben beschrieben wurden toxische Peptide in Zöliakiepatienten und HT29 Zellen in frühen, nicht aber späten Endosomen lokalisiert. Nach Konjugation der Peptidsequenz 31-49 an rCTB kann dieses Peptid stark vermehrt in Lamp-2- und Cathepsin D-positiven, späten Endosomen nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Dieses Kompartiment könnte relevant für die orale Toleranzinduktion sein.

Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass bereits die Passage von Antigenen über ein Epithel einer Veränderung unterliegt. Dies wiederum könnte einen Einfluss auf die

folgende, tolerogene Immunantwort nehmen. Dieser Frage sollte in weiterführenden Experimenten, z. B. durch *Proliferationsassays* mit Zöliakie-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten oder Transportanalysen des Konstruktes in Biopsien (*ex vivo* Experimente), nachgegangen werden. Außerdem wäre eine weitere Quantifizierung von konjugierten und unkonjugierten Peptiden innerhalb der Transportwege in einem etablierten System notwendig. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass das toxische Peptid durch die Verknüpfung mit CTB entweder nicht mehr durch Transzytose in den Interzellularspalt gelangt oder aber dort nach Aufnahme von Makrophagen oder dendritischen Zellen ebenfalls abweichend prozessiert wird (4.2.3). Letzteres würde ebenfalls bedeuten, dass die Induktion einer sekundären Toleranz gegenüber Gliadin in Zusammenarbeit von Enterozyten und anderen Immunzellen erreicht werden kann (4.3.2).

4.2.5 Kolokalisation von Gliadin mit HLA-Molekülen

HLA Klasse I:

HLA Klasse I-Komplexe präsentieren in der Mehrheit endogene Antigene an zytotoxische CD8⁺ T Lymphozyten. Jedoch konnte bereits für unterschiedlichste exogene Antigene eine MHC I-restringierte Präsentation und Stimulation von zytotoxischen T-Zellen demonstriert werden (*Cross-Presentation*, siehe 1.5.5; 4.2.6). Die große Majorität der IEL sind vom CD8⁺ Typ und es erfolgt eine extensive Infiltration von diesen Zellen im Epithel von Zöliakiepatienten [Halstensen and Brandtzaeg 1993; Maiuri et al. 1996].

Für die Pathogenese der Zöliakie sind in den letzten Jahren weitere Zusammenhänge mit HLA Klasse I-Antigene beobachtet worden. So wurde von Gianfrani und Kollegen ein HLA-A2-restringiertes Gliadinepitop (α -Gliadin 123-132) identifiziert, das auch von T Lymphozyten aus der intestinalen Mukosa von Zöliakiepatienten erkannt wird [Gianfrani et al. 2003]. Außerdem wurde dem MICA (*MHC class I complex-related sequence A*) eine Rolle bei der Villusatrophie der Zöliakie zugesprochen [Hue et al. 2004].

Neben der Zöliakie wurden weitere Krankheiten wie IDDM oder Multiple Sklerose beschrieben, die eine Assoziation mit HLA Klasse I zeigen. So wurde für die Multiple Sklerose eine Expansion von CD8⁺T-Zellen im Gehirn und im peripheren Blut berichtet.

Dies lässt vermuten, dass die direkte Zytolyse und die Sekretion inflammatorischer Cytokine durch CD8⁺T Lymphozyten in der Zerstörung von Myelin im Gehirn des Patienten involviert sind [Jurewicz et al. 1998].

In den HT29 Zellen ist eine Kolokalisation von HLA Klasse I-Molekülen mit exogenem Gliadin aus den Frazer's Fraction zu beobachten (Abb. 3.16), wie es auch in Enterozyten von Zöliakiepatienten gezeigt wurde [Zimmer et al. 2006]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Möglichkeit einer MHC I-vermittelten Präsentation von Gliadin durch Enterozyten. Das Zusammentreffen von HLA Klasse I und exogenen Gliadinpeptiden ist zum einen in den frühen Endosomen beobachtet worden (4.1.3). Zum anderen kann exogenes Gliadin in den RACE Zugang zum konventionellen Transportweg von HLA I-Molekülen erlangen (siehe 4.2.6).

HLA-Klasse II:

Eine Antigenpräsentation über MHC II-Komplexe setzt die Prozessierung eines aufgenommenen, exogenen Antigens voraus. Es wird postuliert, dass diese Prozessierung und die Bindung des Antigens an MHC II in den späten Endosomen stattfindet [German et al. 1996; Watts 1997; Geuze 1998]. In Zellkulturstudien von klassischen APZ konnten so genannte MIIC-Kompartimente differenziert werden, die sich als zugänglich für internalisierte Peptide erwiesen und dort prozessiert und umgehend an MHC II-Komplexe gebunden werden [Peters et al. 1991; Harding 1995; Watts 1997]. Die Anwesenheit spätendosomalere Marker wie Lamp oder Cathepsin D ermöglichte die Abgrenzung von frühen Endosomen. Morphologisch erschienen sie vakuolär, angefüllt mit multiplen Vesikeln, Membranstapeln und amorphem elektronendichten Material. Nach Harding und Geuze sind MIIC-Kompartimente deshalb späten Endosomen zuzuordnen. Für Enterozyten der Ratte konnte ebenfalls der Nachweis erbracht werden, dass MHC II-Moleküle mit spätendosomalere/lysosomalere Kompartimenten assoziiert sind [Mayrhofer and Spargo 1990]. In anderen Studien wurde *in vitro* gezeigt, dass mit Hilfe von Chloroquin bzw. Bafilomycin die MHC II-abhängige T-Zellstimulation inhibiert werden kann. Beide Reagenzien greifen in die pH-Regulation der Endosomen ein und stören so deren Enzyme und Funktionen. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass späte Endosomen an der Prozessierung exogener Antigene in Enterozyten beteiligt sind [Bland and Whiting 1989; Hershberg et al. 1997]. Gestützt wird diese Folgerung durch Ultrastrukturstudien an Enterozyten von Zöliakiepatienten, in denen endozytiertes Gliadin in MHC II- und Cathepsin D-positive Vesikel transportiert wurde [Zimmer et al. 1995]. In *in vivo* Studien von Mausenterozyten gelangt OVA innerhalb von 10 Minuten nach transösophagealer Verabreichung in Lamp-1-positive Vesikel. Diese entsprechen hinsichtlich ihrer Morphologie MIIC-Kompartimenten und enthalten große Mengen von MHC II [Zimmer et al. 2000; Buning et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Transport von Gliadin in HT29 Zellen untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit dem Gliadinegemisch in Form von FF, kann Gliadin sowohl in frühen (A) als auch späten (B) Endosomen nachgewiesen werden (Abb. 3.12). In Abbildung A wurden Gliadinstrukturen mit dem Maus-anti-Gliadin R5-Antikörper markiert. Auf Grund der Spezifität dieses Klons kann man den Rückschluss ziehen, dass es sich hierbei um immunregulatorische, toxische Sequenzen handelt [Kahlenberg et al. 2006]. In der Abbildung B wiederum wurde der polyklonale Antikörper eingesetzt, der sowohl die toxischen als auch nicht-toxischen Sequenzen erkennt. Gliadin befindet sich hier in einem Lamp-2-positiven Vesikel mit den oben beschriebenen morphologischen Eigenschaften. Peptide der FF gelangen dementsprechend in spätendosomale/lysosomale Kompartimente von HT29 Zellen, die ebenfalls HLA Klasse II-Moleküle enthalten (Abb. 3.9; 3.14). Wiederum sind toxische Sequenzen, die hier durch Maus-anti-Gliadin WB6/8-Antikörper markiert wurden, nicht mit HLA-DR im selben Kompartiment zu finden (Abb. 3.16). Gliadin und HLA-DR sind hier in der ultrastrukturellen Aufnahme in zwei deutlich voneinander getrennten Vesikeln lokalisiert.

OVA wiederum ist sowohl in frühen als auch in späten Endosomen zu finden (ohne Abbildung) und kolokalisiert mit HLA Klasse I und II-Proteinen (Abb. 3.17).

Man kann daraus folgende Schlussfolgerung ziehen: Toxische und nicht-toxische Gliadinpeptide kolokalisieren mit HLA Klasse I-Molekülen in frühen Endosomen, während nicht-toxische Peptide mit HLA Klasse II-Molekülen in späten Endosomen zu finden sind. Welche immunologischen Konsequenzen dies für die *in vivo* Situation haben kann, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.2.6 Cross-Presentation exogener Peptide durch HLA Klasse I

Die große Mehrheit exogener Antigene wird durch HLA Klasse II-Moleküle gebunden und an der Oberfläche der APZ präsentiert. Die exogenen Antigene gelangen durch Endozytose in das saure endosomale Kompartiment und werden dort durch Proteasen, die bei saurem pH-Wert aktiv sind, gespalten. Diese Prozessierung wird durch lysosomotrophische Agenzien, die die endosomale Ansäuerung verhindern, oder Inhibitoren saurer Proteasen (Leupeptin) gehemmt [Gromme and Neefjes 2002]. Es wurde jedoch vielfach beschrieben, dass es auch zu einer Präsentation exogener Peptide durch HLA I-Moleküle kommt. Die Präsentation exogener Antigene

durch MHC I-Komplexe wird als *Cross-Presentation* bezeichnet und konnte bereits für verschiedene Antigene demonstriert werden (siehe Kapitel 1.5.5). Zum einen treten dabei exogene Antigene über das Zytosol in den konventionellen Prozessierungsweg von MHC-Proteinen ein [Kovacsovics-Bankowski and Rock 1995; Shen et al. 1997], zum anderen findet die Assoziation von MHC-Komplexen mit exogenen Antigenen im endosomalen Kompartiment statt [Chiu et al. 1999; Gromme and Neefjes 2002].

Die in dieser Arbeit gezeigten Resultate demonstrieren eine Lokalisation von HLA Klasse I-Molekülen in den frühen Endosomen, nicht aber in späten Endosomen von HT29 Zellen (Abb. 3.7 und 3.8). Für den Transport von MHC I zum endosomalen Kompartiment werden unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Neu synthetisierte MHC I-Komplexe können zum einen direkt zu den Endosomen transportiert werden [De Bruijn et al. 1995]. Eine weitere Möglichkeit des direkten Transports vom ER zu den Endosomen, wird direktioniert durch die invariante Kette, analog zu den MHC II-Komplexen [Sugita and Brenner 1995]. Außerdem wurde das Recycling von MHC I-Komplexen von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen beobachtet. Dabei werden MHC I-Moleküle endozytiert, gelangen in das endosomale Kompartiment und werden an die Plasmamembran zurück transportiert [Hochman et al. 1991; Abdel Motal et al. 1993; Chiu et al. 1999; Gromme et al. 1999].

Generell sind MHC Klasse I-Moleküle für die Präsentation endogener Antigene verantwortlich. Jedoch demonstrieren verschiedene *in vitro* Experimente, dass antigene Epitope, die von exogenen Antigenen stammen, von MHC I-Molekülen präsentiert werden und eine zytotoxische T-Zell Antwort induzieren. Bedeutend ist, dass die Prozessierung und Präsentation dieser exogenen Antigene für die MHC I-restringierte T-Zell-Erkennung auch *in vivo* geschieht [Grant and Rock 1992; Kovacsovics-Bankowski and Rock 1995; Wijburg et al. 1998; Gromme and Neefjes 2002].

In der vorliegenden Arbeit wäre insbesondere eine Präsentation der toxischen Peptide durch HLA Klasse I-Komplexe denkbar, da toxische Peptide sowohl in HT29 Zellen als auch in den von Zimmer *et al.* 2006 beschriebenen Patientenbiopsien in frühen Endosomen kolokalisieren. Dies geht einher mit den oben beschriebenen Beobachtungen der Assoziation von HLA Klasse I-Komplexen in den frühen Endosomen. Wobei hier keine Aussage getroffen werden kann, ob HLA I durch Endozytose oder direkten Transport in dieses Kompartiment gelangt. Da die Kolokalisation der toxischen Peptide insbesondere bei Zöliakiepatienten beobachtet wurde, könnte dies eine zytotoxische CD8-vermittelte Immunantwort hervorrufen, die an der Induktion des epithelialen Mukosaschadens der Zöliakie beteiligt ist. Übereinstimmend mit dieser Hypothese stehen die Beobachtungen von Gianfrani und Kollegen. In der durchgeführten Studie konnte mittels IFN- γ -

Bestimmung der Nachweis erbracht werden, dass das Peptid der Aminosäuresequenz 123-132 des α -Gliadins von CD8⁺T Lymphozyten (aus dem peripheren Blut von behandelten Zöliakiepatienten) erkannt wird und diese eine zytotoxische Aktivität besitzen [Gianfrani et al. 2003]. Gleichfalls zeigten intestinale CD8⁺T Lymphozyten aus jejunalen Gewebebiopsien der Zöliakiepatienten eine IFN- γ -Produktion. Dies war sowohl bei Lymphozyten von Personen unter glutenfreier als auch glutenhaltiger Diät festzustellen und ist somit unabhängig von der Krankheitsaktivität. Folglich könnte die *Cross-Presentation* des Gliadins einen initialen Schritt zur Induktion des Mukosaschadens darstellen. Zusammenfassend postulieren die Autoren konform mit unseren Ergebnissen, dass Sequenzen des exogenen Antigens Gliadin komplexgebunden mit MHC I-Moleküle an CD8⁺T Lymphozyten präsentiert werden.

In der vorliegenden Arbeit, zusammen mit den vorangegangenen Untersuchungen von Zöliakiepatienten, wurden Hinweise gewonnen, die eine mögliche Antigenpräsentation von Gliadin durch Enterozyten unterstützen. Weiterführende *in vitro* Studien von Kokulturen mit intestinalen Zellen und CD8⁺T Lymphozyten in An- oder Abwesenheit von kostimulierenden Faktoren sollten die Frage klären, ob Enterozyten in der Lage sind diese Lymphozyten zu stimulieren.

Weiterhin liegen in den RACE-Zellen eine hohe Antigenkonzentration im Zytosol vor (Abb. 3.13), infolgedessen könnte auch durch diesen Umstand eine HLA I-Präsentation induziert werden. In solchen Enterozyten können exogene Gliadinpeptide in den klassischen Prozessierungsweg von HLA Klasse I-Molekülen gelangen (Kapitel 1.5). Das zytosolisch vorliegende Gliadin wird im Proteasom degradiert und über TAP Transporter ins ER transloziert. Dort findet die *de novo* Synthese der HLA I α -Kette, ihre Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin und die Beladung dieses Komplexes mit einem Antigen statt. Für die Erkennung von T Lymphozyten wird der Immunkomplex an die Plasmamembran transportiert und dort präsentiert. Auf diesem Wege würde ebenfalls das exogene Gliadin über *Cross-Presentation* an CD8⁺T Lymphozyten präsentiert werden.

4.3 Die Rolle der Enterozyten in der Pathogenese der Zöliakie

4.3.1 In Enterozyten von Zöliakiepatienten wird tTG exprimiert

1997 wurde die Transglutaminase 2, tTG2, im Rahmen der Zöliakie als das Autoantigen identifiziert [Dieterich et al. 1997] und hat sich als wichtiger Mitspieler in der Pathogenese herausgestellt. Eine weitere entscheidende Entdeckung war die Modifikation von Glutenpeptiden durch die tTG2 (Kapitel 1.1.5 und 1.1.6). Das Enzym katalysiert die Deamidierung von Glutamin zu Glutaminsäure innerhalb der Sequenz der immundominanten Gliadinepitope und erzeugt so eine hohe Affinität für die Bindung an HLA-DQ2-Moleküle. Damit wird eine bereits definierte pathogenetische Kaskade gestartet, die in der Präsentation an CD4⁺ T-Zellen durch HLA Klasse II-Komplexe (DQ2 oder DQ8) mündet [Molberg et al. 1998; van de Wal et al. 1998; Arentz-Hansen et al. 2000]. Piper *et al.* demonstrierten durch *in vitro* Experimente, dass Gliadinpeptide ein besonders spezifisches Substrat für die tTG2 darstellen und, dass es eine Korrelation zwischen toxischen Peptiden und ihrer hohen Spezifität für die Transglutaminase gibt [Piper et al. 2002]. Die tTG-Spezifität für Peptide aus dem (nicht-toxischen) Reis ist mehr als das 9-fache geringer als das natürliche Substrat (hier γ -Fibrinogen) und mehr als 45-fach niedriger als das effektivste Gliadinsubstrat (γ -Gliadin Sequenz 139-152).

Die tTG2 hat sehr viele verschiedene biologische Funktionen und ist ein weit verbreitetes Enzym, das in unterschiedlichsten Geweben zu finden ist. Genauso wenig ist seine zelluläre Verteilung definiert, da die tTG sowohl in der extrazellulären Matrix [Akimov and Belkin 2001], aber ebenso intrazellulär, vorrangig im Zytoplasma, aber auch im Kern und an der Plasmamembran zu finden ist [Fesus and Piacentini 2002; Lorand and Graham 2003; Maiuri et al. 2005].

Die Expression der tTG2 ist in jejunalen Biopsien von Zöliakiepatienten um das Dreifache erhöht, wobei umstritten ist, welcher Zelltyp dafür verantwortlich ist, nämlich ob Epithelzellen das Enzym in die Lamina propria sezernieren oder Fibroblasten der Ursprung sind oder gar beide. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass in Enterozyten aus Biopsien von Zöliakiepatienten die Expression der tTG2 induziert wurde (3.3.2; Abb. 3.26). Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung (2.6.1) ist die Expression in behandelten Zöliakiepatienten nur vereinzelt in den Enterozyten zu beobachten, während bei aktiver Zöliakie das gesamte Epithel betroffen ist. Durch den Nachweis von tTG-mRNA kann gezeigt werden, dass Enterozyten die tTG2 selber synthetisieren und das Enzym nicht durch Endozytose aufnehmen. Durch *in vitro* Analysen (RT-PCR) in HT29

konnten wir ebenfalls zeigen, dass in diesen Zellen nicht nur nach Stimulation durch IFN- γ , sondern auch nach Inkubation mit FF eine Expression der tTG2 induziert wird (Abb. 3.27). Übereinstimmend dazu wurde bereits in intestinalen Zellen der Ratte (IEC-6 Zellen) eine gesteigerte Expression durch IFN- γ -Stimulation und eine verminderte Expression nach TGF- β -Behandlung (24h) beobachtet [Kim et al. 2002]. Nach langfristiger IFN- γ -Stimulation war die Expression nach drei Tagen um das 5-fache gestiegen und blieb bis zu fünf Tage erhöht erhalten. Die Resultate von Kim *et al.* und der eigenen Arbeiten lassen vermuten, dass die erhöhte tTG2-Expression bei Zöliakiepatienten durch Gliadinpeptide und IFN- γ induziert und unterhalten wird.

Das toxische Peptid 31-43 induziert in Organkulturen (isoliert aus Zöliakiepatienten) eine schnelle und starke Hochregulation von tTG2 Proteinen und enzymatischer Aktivität, im Gegensatz zu den immundominanten Peptiden. Diese Induktion war ebenso wenig in den Kontrollen zu beobachten. Hier wurde außerdem eine Expression auf der Zelloberfläche der Enterozyten gezeigt, wobei diese Proteine keine enzymatische Aktivität besaßen. Die tTG auf der Zelloberfläche dient vielmehr als Bindungsstelle für Gliadinpeptide, was weiterführende pathophysiologische Konsequenzen mit sich bringt. Diese beinhalten sowohl die T-Zellantwort auf immundominante Peptide als auch die Induktion einer Aktinreorganisation, epitheliale Phosphorylierung und Apoptose durch das toxische Peptid [Maiuri et al. 2005]. Die in unseren eigenen Versuchen beobachtete Induktion der tTG-Expression durch FF in den HT29 (Abb. 3.27) könnte nach den Resultaten von Maiuri *et al.* folglich auf das toxische Peptid in den FF zurückzuführen sein.

Eine jüngere Studie unterstützt unsere und Maiuris Beobachtungen, dass die epitheliale Verteilung der tTG ein spezifisches Phänomen für die Zöliakie darstellt und dabei Gluten-abhängig ist. Die Gruppe zeigt, dass in allen Proben eine Markierung von tTG2 in der Lamina propria und im unterliegenden Gewebe nachzuweisen ist. In 8 von 10 unbehandelten, 1 von 8 behandelten und 3 von 5 potenziellen Zöliakiepatienten konnte tTG2 ebenfalls an der Oberfläche von Enterozyten (apikal und basolateral) nachgewiesen werden. Dahingegen zeigte keine der Kontrollen diese epitheliale Verteilung [Biagi et al. 2006].

Das multifunktionale Enzym ist in verschiedensten zellulären Prozessen involviert und hat dabei üblicherweise eine schützende und stabilisierende Rolle für Zellen und Gewebe. Eine Abwesenheit der tTG führt zu beeinträchtigter Wundheilung, Autoimmunität und Diabetes. Unter pathologischen Bedingungen jedoch ändert die unkontrollierte Aktivierung die schützende Funktion der tTG2 in eine Gewebeschädigende, wie für Fibrosen, die Huntington Krankheit oder Zöliakie gezeigt wurde [Fesus and Piacentini 2002]. Für die

Pathogenese der Zöliakie werden der Transglutaminase bereits verschiedene Funktionen zugeschrieben. So produziert die tTG stimulatorische T-Zell-Epitope [Molberg et al. 1998; Arentz-Hansen et al. 2000], die Oberflächen-tTG dient als Bindungsstelle für Gliadinpeptide [Maiuri et al. 2005] oder ein Teil der Autoantikörper gegen tTG erkennt auch weitere Eigen-Antigene [Zanoni et al. 2006]. Außerdem wurde in den ultrastrukturellen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe die intrazelluläre Verteilung der tTG in den Enterozyten von Kontroll- und Zöliakiepatienten ermittelt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die tTG bei der intrazellulären Translokation und Prozessierung von Gliadin eine funktionale Rolle spielt [Zimmer et al. 2006]. Gleichfalls bestünde auch die Möglichkeit, dass Enterozyten die tTG auf Grund eingeleiteter Apoptose oder zur Reparatur des Epithels [Fesus and Piacentini 2002] im Rahmen der Villusatrophie exprimieren.

Obwohl die Expression der tTG durch Enterozyten noch nicht verstanden ist, zeigen all diese Beobachtungen, dass die Enterozyten eine kritische Rolle innerhalb der Pathogenese der Zöliakie spielen. Dies macht es notwendig, die Funktionen von Enterozyten im Rahmen oraler Toleranz weiter zu untersuchen.

4.3.2 Orale Toleranz

Bei der Zöliakie kommt es zum Verlust der oralen Toleranz gegenüber Gluten aus verschiedenen Getreidesorten wie beispielsweise Weizen, Roggen oder Gerste. Dabei wird die Unverträglichkeit sowohl von Peptiden der Prolamine (z. B. Gliadin) als auch von Peptiden der Glutenine unterhalten (Kapitel 1.1.6).

Nach aktuellem Stand der Forschung vollzieht sich die Toleranzinduktion im Bereich des intestinalen Epithels und dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) [Weiner et al. 1994; Strobel and Mowat 1998; Strobel and Mowat 2006]. Die Induktion oraler Toleranz ist ein aktiver Prozess, der eine Präsentation durch MHC Klasse II-Komplexe an CD4⁺T Lymphozyten beinhaltet (1.6.2).

Obwohl viele Faktoren der Pathogenese der Zöliakie bereits identifiziert wurden, ist noch nicht geklärt, wie das Toleranzversagen gegenüber toxischen Gliadinpeptiden bei der Zöliakie zustande kommt. Die genetische Prädisposition von HLA-DQ2, bzw. HLA-DQ8 ist allein nicht ausreichend, da ca. 30% der westlichen Bevölkerung diese Allele tragen, aber nur ~5% davon eine Zöliakie entwickeln. Es müssen also weitere Mechanismen für die Pathogenese existieren, die zum Verlust der Toleranz führen, bzw. Mechanismen, die bei gesunden Personen eine Toleranz induzieren. Eine wichtige Frage ist auch, ob eine

(sekundäre) orale Toleranzinduktion für Zöliakiepatienten auf therapeutischem Wege zu erreichen ist.

Im Rahmen der Pathogenese ist die Funktion der Enterozyten nur unzureichend verstanden. Da Enterozyten die erste zelluläre Kontaktstelle mit Gliadin darstellen, ist es möglich, dass nicht nur entscheidende Prozesse der Immunpathogenese der Zöliakie im intestinalen Epithel ablaufen, sondern dass auch durch deren gezielte Beeinflussung innovative therapeutische Optionen bestehen.

Die antigenpräsentierenden Zellen, die für die Prozessierung und Präsentation von Gliadin im Immunsystem verantwortlich sind, sind bisher noch nicht im Detail identifiziert. Es gibt Hinweise, dass Enterozyten eine bedeutende Rolle bei der Antigentranslokation und -prozessierung spielen [Friis et al. 1992; Zimmer et al. 1995; Zimmer et al. 2000]. In Biopsien von Patienten mit aktiver Zöliakie konnte gezeigt werden, dass Gliadinpeptide von Enterozyten endozytiert werden und sowohl in Vesikeln als auch im Golgi Apparat lokalisiert sind [Friis et al. 1992; Zimmer et al. 1998]. Bei behandelten Patienten war hingegen kein Gliadin in den Biopsien nachweisbar und bei Kontrollpatienten waren nur geringe Mengen an Gliadin in einzelnen Vesikeln in der Nähe der apikalen Membran zu beobachten. Außerdem wurden in Biopsien von Zöliakie-Patienten CD8, γ/δ -TCR und α/β -TCR in Vakuolen und im Trans-Golgi-Netzwerk nachgewiesen, was für eine Interaktion von Enterozyten und anderen Immunzellen spricht [Zimmer et al. 1998].

In vivo Transportstudien im Mausmodell zeigten, dass oral appliziertes OVA nach erstmaliger Fütterung bei immunkompetenten BALB/c Mäusen in MHC Klasse II-positive, späte Endosomen der Enterozyten direktioniert wird. Hingegen prozessieren SCID-Mäuse mit fehlender MHC II-Expression der Enterozyten, die keine orale Toleranz gegen OVA aufbauen, OVA über frühe Endosomen dieser Zellen; dabei erreicht OVA weder die späten Endosomen noch den Golgi-Komplex [Zimmer et al. 2000].

Ein direkter Einstrom der Antigene durch eine transzelluläre Passage über das Epithel ist nach den Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe nicht zu erwarten [Zimmer et al. 2000; Zimmer et al. 2006]. Den Enterozyten könnten, neben ihrer Barrierefunktion, verschiedene Funktionen für die orale Toleranz zugeschrieben werden:

1. Enterozyten transportieren und prozessieren Antigene nach der Aufnahme unterschiedlich.
2. Enterozyten als APZ können Antigene durch HLA Klasse I oder II präsentieren.
3. Enterozyten präsentieren Antigene indirekt durch die Exozytose von beladenen HLA-Antigen-Komplexen oder Exosomen.

1. Enterozyten transportieren und prozessieren Antigene nach der Aufnahme unterschiedlich

Ein kleiner Teil der Nahrungsproteine entzieht sich der finalen Degradation durch die Enterozyten und gelangt im intakten Zustand oder in Form größerer Peptide in die Lamina propria (4.2.3). Über die physiologische Wirkung dieser intakt aufgenommen Nahrungsantigene weiß man bis heute nur sehr wenig. Innerhalb der Enterozyten fällt die Entscheidung, wie Antigene transportiert und prozessiert werden, bevor sie ins Körperinnere gelangen.

Das toxische Peptid 31-49 wird nur bedingt in die späten Endosomen von HT29 Zellen transportiert. Auch der Transportweg für toxische und nicht-toxische Peptide in Enterozyten von Patienten unterscheidet sich (4.2.3). Unterstützend zeigten die Arbeiten von Martine Heymans Gruppe, dass dieses Peptid bei der Translokation durch das Epithel isolierter Enterozyten von Zöliakiepatienten zu 50% intakt bleibt. Im Vergleich dazu bleiben in Kontrollpatienten nur 9% der Peptide erhalten. Zudem ist die translozierte Menge an Peptiden bei aktiver Zöliakie doppelt so hoch wie in den Kontrollpatienten [Matysiak-Budnik et al. 2003]. Die unvollständige Degradation bzw. der geschützte Transport können damit den toxischen Effekt des Peptides unterstützen.

Das Peptid 31-49 ist ein Beispiel für einen unterschiedlichen Transport im Vergleich zu anderen Peptidsequenzen. Dieser Transportweg kann jedoch auch auf andere Peptide zutreffen oder aber von nicht bekannten Faktoren beeinflusst werden. Entscheidend ist jedoch, dass Enterozyten in der Lage sind, Antigene unterschiedlich zu transportieren und damit auch zu prozessieren. Werden Antigene nach luminaler Aufnahme und Prozessierung an der basolateralen Membran in den Interzellularspalt und die Lamina propria wieder exozytiert, besteht die Möglichkeit einer erneuten Aufnahme durch andere Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen o. ä.). Die Enterozyten würden auf diesem Wege einen Einfluss auf das antigene Epitop haben, das dann letztendlich durch klassische APZ präsentiert wird.

So könnte ein veränderter Transport innerhalb der Enterozyten, wie für M1-CTB gezeigt (3.2.3), nach Exozytose und Aufnahme durch klassische APZ zu einer ebenfalls modifizierten Prozessierung und Präsentation des Antigens in der APZ führen. Damit wäre die Immunantwort indirekt durch die Epithelzellen und in Zusammenarbeit mit klassischen APZ beeinflusst. In weiterführenden Studien müsste der Frage nachgegangen werden, ob beispielsweise das M1-CTB durch Enterozyten direkt an T-Lymphozyten präsentiert werden kann (4.3.3) oder, ob das Konstrukt exozytiert wird und in wie weit es transzellulär prozessiert wurde.

2. Enterozyten als APZ können Antigene durch HLA Klasse I oder II präsentieren

Speziell für Enterozyten konnte gezeigt werden, dass eine immunologisch suffiziente Antigenprozessierung erst in den späten endosomalen Kompartimenten stattfindet [Hershberg et al. 1997].

Im Zuge der Toleranzinduktion kann es, abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, zur Aktivierung von CD4⁺T Suppressorzellen oder einem anergen Zustand von CD4⁺ Th Zellen kommen [Strobel and Mowat 1998; Weiner 2000]. Dieser Prozess wird durch MHC II-Komplexe vermittelt, wobei der Induktionsprozess sich im GALT vollzieht. Welche Strukturen des GALT involviert sind, wird jedoch kontrovers diskutiert.

Die Mehrheit der Autoren macht die klassischen APZ der Peyerschen Plaques für die notwendige Antigenprozessierung verantwortlich [Mowat 2003; Dubois et al. 2005]. Entgegen dieser Hypothese konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Mäuse ohne PP zur Induktion oraler Toleranz fähig sind [Enders et al. 1986]. Deshalb gelangen Enterozyten, die in ihrer Gesamtheit 99% der mukosalen Oberfläche und Kontaktstelle für potenzielle Antigene einnehmen, als beteiligte APZ immer mehr in den Blickpunkt (4.3.2).

3. Enterozyten präsentieren Antigene indirekt durch die Exozytose von beladenen HLA-Antigen-Komplexen oder Exosomen

In den letzten Jahren wurde eine weitere Möglichkeit der Antigenpräsentation durch Enterozyten diskutiert, die Sekretion von Exosomen oder „Tolerosomen“ [Karlsson et al. 2001; van Niel et al. 2001]. Exosomen entstehen durch die Fusion von multivesikulären späten Endosomen und der Plasmamembran [They et al. 2002]. Es bilden sich membranumschlossene Vesikel mit einem Durchmesser von 30 bis 100 nm, die in den Extrazellularraum sezerniert werden.

Es wurde gezeigt, dass auch IEC Exosom-ähnliche Vesikel freigegeben, die morphologisch den Exosomen von klassischen APZ wie B-Zellen oder dendritischen Zellen entsprechen [van Niel et al. 2001; Van Niel et al. 2003]. Epitheliale Exosomen werden an der basolateralen Membran freigelassen und tragen eine große Menge an MHC Klasse I- und II-Molekülen (letzteres ist nach IFN- γ Stimulation hoch reguliert). Außerdem sind verschiedene andere Proteine wie A33-Antigen, DPP IV, CD63, Aktin und Tubulin in den Vesikeln zu finden. Für die Antigenpräsentation durch Exosomen ist folglich der Transport eines exogenen Antigens in späte Endosomen genauso relevant. Luminale Antigene werden in den späten Endosomen der IEC auf MHC II-Komplexe beladen und in

Exosomen basolateral entlassen. Karlsson *et al.* postulieren zwei verschiedene Möglichkeiten für die Wirkungsweise von „Tolerosomen“. Zum einen könnten „Tolerosomen“ in die Zirkulation gelangen, wo sie von dendritischen Zellen der Leber endozytiert werden, die wiederum in die Lymphknoten wandern. Alternativ schlagen die Autoren eine Aufnahme der „Tolerosomen“ durch sinusoidale Endothelzellen vor, die als APZ fungieren [Karlsson *et al.* 2001]. Van Niel und Kollegen vertreten die Meinung, dass die freigelassenen Exosomen von dendritischen Zellen der Lamina propria aufgenommen werden. Nach der Reifung der Exosom-beladenen dendritischen Zelle findet entweder eine lokale Präsentation statt oder die Zelle wandert zu abführenden (*draining*) Lymphknoten [van Niel *et al.* 2001].

In den ultrastrukturellen Untersuchungen der Zöliakiepatienten gab es bislang wenig Anzeichen für die Sekretion von Exosomen. Jedoch zeigten (bisher nicht publizierte) Beobachtungen der Arbeitsgruppe Zimmer für OVA und Gliadin membrangebundene MHC/Antigen-Komplexe im parazellulären Raum von Patientenbiopsien. Der Frage, ob Enterozyten via Exosomen eine immunmodulatorische Funktion übernehmen, sollte in weiterführenden Experimenten erörtert werden. Die Arbeiten von Karlsson und van Niel befassten sich mit T-Zelllinien sowie Maus- und Rattengewebe, so dass die *in vivo* Situation im Menschen eventuell davon abweicht.

Für humane CEC (*colon epithelial cells*) konnte ebenfalls eine antigenpräsentierende Funktion beschrieben werden. Hier wurde der OVA-Transport nach *in vivo* Exposition in den CEC von Patienten mit Morbus Crohn und in Kontrollpatienten verfolgt. Die Autoren vermuten die basolaterale Sekretion von OVA-beladenen MHC II-Komplexen ohne vesikuläre Strukturen bei den Morbus Crohn Patienten. Die sezernierten Immunkomplexe sind zugänglich für Lymphozyten und andere Immunzellen. Auch für CEC wird vermutet, dass sie eine Funktion bei der MHC II-abhängigen Antigenpräsentation bei Morbus Crohn haben könnten [Buning *et al.* 2006].

Ob solch eine Sekretion von Immunkomplexen auch für die Zöliakie in Frage kommt, könnte durch weiterführende Experimente analysiert werden. Durch *in vitro* Experimente mit HT29 Zellen könnte man eine inflammatorische Situation z. B. durch IFN- γ -Stimulation erzielen und im Zellkulturüberstand die Anwesenheit von MHC-Komplexen überprüfen. Für eine zukünftige Therapie von Zöliakiepatienten ist das Verständnis für die orale Toleranzinduktion von entscheidender Bedeutung. Wenn dieser Vorgang besser verstanden wird, ließe sich vielleicht die Frage beantworten: Kann man eine sekundäre orale Toleranz für Gliadin auf therapeutischem Wege induzieren?

Die Konjugation von CTB mit dem toxischen Peptid 31-49 hat in den vorliegenden *in vitro* Studien eine Veränderung im transzellulären Transport in HT29 Zellen hervorgerufen. Das toxische Peptid konnte durch diese Kopplung in die späten Endosomen direktioniert werden. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, welche immunologischen Konsequenzen diese Translokation in Enterozyten hat. Erfolgt hier eine Beladung des toxischen Peptides auf HLA Klasse II-Komplexe? Was geschieht mit diesen Immunkomplexen? Können Enterozyten direkt als APZ das toxische Peptid an supprimierende T-Zellen präsentieren? Die Funktion der Enterozyten als APZ wird im Folgenden diskutiert.

4.3.3 Können Enterozyten als APZ eine Rolle spielen?

Es wird kontrovers diskutiert, ob Enterozyten tatsächlich als APZ in Frage kommen. Doch mehren sich die Hinweise, dass diese Zellen durchaus aktiv Einfluss auf die immunregulatorischen Prozesse nehmen.

Enterozyten bilden die erste Kontaktstelle für oral aufgenommene Antigene und bilden als Epithel eine Barriere, die einen wichtigen Teil der angeborenen, unspezifischen Immunantwort darstellt. Untersuchungen von Bland und Warren demonstrierten die Fähigkeit isolierter Enterozyten, aufgenommene Antigene zu prozessieren und *geprimten* T Lymphozyten zu präsentieren [Bland and Warren 1986; Bland and Warren 1986; Mayer and Shlien 1987]. Bei den (durch Enterozyten) stimulierten T Lymphozyten handelte es sich um antigenspezifische T Suppressorzellen. Enterozyten sind im konstitutiven Zustand jedoch nicht in der Lage, Th Zellen zu stimulieren und somit eine IL-2 Sekretion hervorzurufen [Zhang and Michael 1990; Hoyne et al. 1993]. Bis heute existieren jedoch noch keine *in vivo* gewonnenen Hinweise für eine unmittelbare Interaktion zwischen Enterozyten und Lymphozyten. Ebenso sind die genauen molekularbiologischen Vorgänge der oralen Toleranzinduktion weiterhin ungeklärt.

Präsentation durch HLA Klasse II:

Eine erfolgreiche Antigenpräsentation über MHC II setzt die Aufnahme und Prozessierung des exogenen Antigens voraus. Für die Aufnahme von Makromolekülen in Enterozyten sind Clathrin-abhängige sowie *Fluid-Phase* Endozytosevorgänge nachgewiesen [Stern et al. 1984; Bland and Whiting 1989; Sanderson and Walker 1995].

Die Assoziation exogener Antigene mit MHC Klasse II-Molekülen erfolgt in den späten Endosomen, wie es für verschiedene Zelltypen und auch Enterozyten gezeigt wurde [Peters et al. 1991; Harding 1995; Hershberg et al. 1997]. Beladene MHC II-Antigen-Komplexe werden von dort an die Plasmamembran transportiert und präsentieren Antigene an CD4⁺T Lymphozyten. Durch *in vitro* Experimente konnte bereits die erfolgreiche Antigenpräsentation von Enterozyten an T Lymphozyten demonstriert werden [Bland and Warren 1986; Hershberg et al. 1998].

In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Enterozyten eine Funktion bei Immunreaktionen der Zöliakie und der Nahrungsmittelallergie gegen Eialbumin haben. Dabei steht vor allem die Translokation von exogenen Antigenen in das spätendosomale Kompartiment im Zentrum. Aufgenommenes OVA gelangt in BALB/c-Mäusen, nicht aber in SCID-Mäusen, in das spätendosomale Kompartiment. Im Gegensatz zu den SCID-Mäusen entwickeln BALB/c-Mäuse eine orale Toleranz gegenüber dem Allergen [Zimmer et al. 2000]. Nach Stimulation mit IFN- γ kann die Translokation von OVA auch in SCID-Mäusen induziert werden [Buning et al. 2005]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Gliadin in HLA-DR positive späte Endosomen von Zöliakiepatienten transportiert wird, was bei Kontrollpatienten nicht beobachtet wurde [Zimmer et al. 1995]. Außerdem wurden TCR-Untereinheiten in Enterozyten von Zöliakiepatienten nachgewiesen, was eine Interaktion von Lymphozyten und den Epithelzellen voraussetzt [Zimmer et al. 1998]. Neuere Studien und Experimente der vorliegenden Arbeit ergaben einen unterschiedlichen Transport von toxischen und nicht-toxischen Gliadinpeptiden in Patientenbiopsien und in HT29 Zellen (4.2.3). Der gezielte Transport des toxischen Peptides 31-49 durch die Kopplung an CTB in das spätendosomale Kompartiment in HT29 (4.2.4) unterstreicht die Wichtigkeit der Transportprozesse in Enterozyten.

Die kontroverse Diskussion über die Enterozyten als APZ hat verschiedene Ursachen. Zum einen liegen keine *in vivo* Beweise vor und zum anderen gibt es keine naiven Lamina propria oder intraepitheliale T Lymphozyten, was eine initiale Immunantwort ausschließt [Blumberg et al. 1999]. Humane IEC stehen im engen Kontakt mit CD8⁺T Lymphozyten, die vorrangig den α/β -TCR, seltener den γ/δ -TCR exprimieren [Pitman and Blumberg 2000]. Nur eine sehr geringe Anzahl an IEL und ungefähr zwei Drittel der Lamina propria Lymphozyten sind CD4⁺ [Hershberg and Mayer 2000]. Dennoch besitzen IEC verschiedene Requisiten für die HLA Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation. Sie exprimieren immunregulatorische Moleküle wie Cytokine (IL-1, IL-6, TGF α und TGF β),

Cytokinrezeptoren (für IFN- γ , TNF und verschiedene IL-Rezeptoren) sowie Moleküle für T-Zellbindungen und -stimulierung (CD58, CD80, CD86 oder ICAM) [Blumberg et al. 1999; Hershberg and Mayer 2000]. Nach heutigem Kenntnisstand wird normalen Enterozyten eine Rolle im Induktionsprozess der oralen Toleranz zugeschrieben. Es wird vermutet, dass oral aufgenommene Antigene durch MHC II, aber in Abwesenheit von kostimulierenden Molekülen wie CD80 und CD86, präsentiert werden. Mögliche Kontaktzellen stellen dabei CD4⁺ IEL oder Lamina propria Lymphozyten dar. Als Resultat käme es nicht zur Aktivierung, sondern vielmehr zu einem anergen Zustand von CD4⁺ Th Zellen oder einer Proliferation antigenspezifischer T Suppressorzellen [Blumberg et al. 1999; Shao et al. 2001]. Hier stellt sich die Frage, ob eine gezielte Translokation des toxischen Gliadinpeptides in die späten Endosomen eine solche supprimierende Immunantwort in Zöliakiepatienten durch die IEC auslösen könnte. Diese Fragestellung sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Dies kann durch *in vitro* Experimente in Kulturen und unter Einsatz zusätzlicher Cytokine erfolgen, um eine möglichst *in vivo*-getreue Situation aufzubauen. Genauso wäre die Analyse des M1-CTB Konstruktes in Patientenbiopsien (*ex vivo*) angebracht, um dort den transzellulären Transport in den Enterozyten zu studieren. Eine *in vivo* Installation wie sie von Buning *et al.* durchgeführt wurde [Buning et al. 2006], ist aus ethischen Gründen beim jetzigen Stand der Forschung nicht vertretbar. Für eine *in vivo* Untersuchung würde sich die ösophageale Verabreichung im Mausmodell anbieten mit anschließender ultrastruktureller Analyse der Peptidverteilung im Gewebe und intrazellulärer Verteilung in den Enterozyten.

Präsentation durch HLA Klasse I:

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Lymphozyten können an der Entwicklung der Mukosaläsionen beteiligt sein, da Infiltrationen von CD4⁺ Lamina propria Lymphozyten und CD8⁺ intraepithelialen Lymphozyten zu beobachten sind [Halstensen and Brandtzaeg 1993]. Die Spezifität und Rolle der CD8⁺T-Zellen innerhalb der Pathogenese der Zöliakie ist bisher wenig verstanden (1.1.3 und 1.3.3). Die ersten Hinweise auf eine HLA I-restringierte Gliadinpräsentation wurden von Gianfrani *et al.* erbracht [Gianfrani et al. 2003]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Peptid 123-132, durch HLA-A2 präsentiert und CD8⁺T-Zellen aktiviert. Es konnte jedoch noch keine Zytotoxizität untersucht werden und es bleibt offen, welche APZ *in vivo* für die Präsentation verantwortlich ist.

Die Interaktion von CD8⁺T Lymphozyten mit Enterozyten und die damit verbundene HLA Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation wird viel diskutiert. Nach dem heutigen Stand der Forschung sind IEC jedoch nicht in der Lage, eine antivirale CTL-Antwort zu instruieren

(*prime*), obwohl sie selber ein gutes Ziel für MHC I-restringierte, Virus-spezifische, zytotoxische T-Zellen sind [Hershberg and Mayer 2000]. Speziell die *Cross-Presentation* von exogenen Antigenen durch HLA I-Komplexe in Enterozyten ist wenig untersucht.

In den letzten Jahren konnte eine Stimulation von CD8⁺T-Zellen durch Enterozyten mittels MHC I-verwandten Molekülen CD1d, MICA oder MICB gezeigt werden [Groh et al. 1998; Steinle et al. 1998; Campbell et al. 1999]. Die nicht-klassischen MHC I-Moleküle MICA und MICB werden von IEC unter zellulärem Stress exprimiert und können γ/δ -TCR tragende T-Zellen stimulieren. Die Stimulierung scheint unabhängig von der konventionellen MHC I-Prozessierung zu sein und keine Präsentation eines Peptidliganden zu beinhalten [Groh et al. 1998]. In jüngerer Zeit konnte bereits für MICA ein Zusammenhang mit der Pathogenese der Zöliakie beschrieben werden, der für die Zerstörung der Epithelzellen verantwortlich sein kann (siehe 1.1.3).

Die Liganden von CD1d-Molekülen klassischer APZ sind hauptsächlich Glyko- und Phospholipide [Brutkiewicz 2006; Tsuji 2006], wohingegen CD1d-Moleküle in IEC nicht in der Lage sind Glykolipide zu prozessieren [Kaser et al. 2004]. CD1d ist in den Endosomen lokalisiert, sodass die Assoziation mit Antigenen (Peptide oder Lipide), so wird vermutet, in den MIIC-Kompartimenten stattfindet [Campbell et al. 1999]. Das CD1d-Molekül assoziiert zudem noch mit gp180, einem CD8-Ligand zu einem Komplex, der in der Lage ist, eine Subpopulation von CD8⁺ regulatorischen T-Zellen zu aktivieren. Ko-Kulturen von T-Zellen und intestinalen Enterozyten zeigten eine Stimulation von CD8⁺CD28⁻T-Suppressorzellen. Diese Zellen sind nicht zytotoxisch und exprimieren keine Marker für NK Zellen, sondern sind vom TCR α/β ⁺, CD28⁻ und IL-2R⁺ Phänotyp [Campbell et al. 1999]. Für das CD1 aus der Maus wurde die Bindung längerer Peptide mit hydrophoben und *bulky* Aminosäuren demonstriert. Dabei wurde eine CD1-restringierte, Antigen-spezifische CTL-Antwort klassischer APZ *in vivo* beobachtet, die durch exogene Antigene ausgelöst wurde [Castano et al. 1995; Lee et al. 1998].

Anhand dieser verschiedenen Beobachtungen könnte man vermuten, dass eine Translokation des toxischen Peptides in späte, MIIC Endosomen in Enterozyten eine CD1d-restringierte Suppression durch CD8⁺CD28⁻T-Zellen verursachen könnte. Somit wird nachfolgend die toxische Eigenschaft der Sequenz 31-49 verhindert.

Die Funktion der Enterozyten als APZ bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Jedoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse und die vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Zimmer, dass die Enterozyten einen wesentlichen Teil zu Immunreaktionen beitragen können. Welche weiterführenden Konsequenzen die gezeigten, unterschiedlichen Transportwege von Nahrungsmittelantigenen, die HLA- und tTG-Expression sowie deren intrazelluläre Verteilung haben, wird Gegenstand zukünftiger Untersuchung sein.

4.4 Perspektiven

Die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen wurden in einem etablierten Zellmodell für intestinale Enterozyten zur Erforschung der transepithelialen Passage des Nahrungsmittelantigens Gliadin vorgenommen. Mit den hier angewendeten Methoden ist erstmalig der veränderte Transport eines CTB-konjugierten Antigens innerhalb von Enterozyten gezeigt worden. Die Translokation des toxischen Peptides in späte Endosomen und die damit verbundene Assoziation mit HLA Klasse II-Komplexen könnte ein wesentlicher Schritt für die Induktion oraler Toleranz als Prophylaxe oder auf therapeutischem Wege sein. Zudem erlauben Kollokalisierungen von Gliadinpeptiden mit HLA-Molekülen und Markerproteinen des endosomalen Kompartiments Aussagen bezüglich Lokalisation und Mechanismen der Antigenprozessierung in diesen Zellen. Viele Fragestellungen im Zusammenhang mit der oralen Toleranz sowie der Rolle von Enterozyten als nicht klassische APZ bleiben jedoch weiterhin unbeantwortet oder werfen weitere Fragen auf.

Wie es zum Verlust der oralen Toleranz gegenüber Weizenprodukten beim Zöliakiepatienten kommt, ist bis heute nur wenig verstanden. Deswegen sollten die Aufklärung des Mechanismus und der beteiligten Zellen der oralen Toleranzinduktion weiterhin im Zentrum zukünftiger Untersuchungen stehen. Viel versprechend ist eine weitere Analyse des intrazellulären Transports des konjugierten Peptides in Enterozyten. Vergleichend zu den Ergebnissen in HT29 Zellen sollte in Biopsien von Kontrollpatienten, behandelten und unbehandelten Zöliakiepatienten der Frage nachgegangen werden, ob der Transport auch dort in die späten Endosomen erfolgt, und ob dieses Phänomen unabhängig vom Krankheitsbild und -status ist. Da diese ersten Untersuchungen aus ethischen Gründen nur *ex vivo* vorgenommen werden können, bietet sich für eine *in vivo* Untersuchung das Mausmodell an. Nach ösophagealer Applikation ließe sich mittels Immunfluoreszenz oder Elektronmikroskopie in Ultradünnschnitten die (intra-) zelluläre Verteilung des (un-) konjugierten toxischen Peptides in der Epithelschicht und im unterliegenden Gewebe beobachten. Ebenso kann die Lokalisation in Bezug auf MHC Klasse I und II wie es für OVA bereits gezeigt wurde, analysiert werden [Zimmer et al. 2000; Buning et al. 2005].

Die *in vitro* Stimulation von T-Zellen aus PBMC oder isolierter intestinaler T-Zellen von Zöliakiepatienten wurde bereits für CD8⁺T Lymphozyten [Gianfrani et al. 2003] und CD4⁺T Lymphozyten gezeigt [Sollid et al. 1989; Arentz-Hansen et al. 2000]. Analog sollten solche T-Zell-Stimulationstests in Ko-Kulturen mit den HT29 Zellen nach Verabreichung des toxischen, bzw. des konjugierten Peptides durchgeführt werden. Damit kann der

Überlegung nachgegangen werden, ob Enterozyten als APZ für das toxische Peptid in Frage kommen. Hierbei kann sowohl die HLA I- als auch HLA II-restringierte Präsentation beleuchtet werden. Des Weiteren sollte auch der intrazelluläre Transport des toxischen und des konjugierten Peptides in klassischen APZ analysiert werden, da es durchaus vorstellbar ist, dass in diesen Zellen der Transport des toxischen Peptides ebenfalls nicht in die späten Endosomen erfolgt. Ein *Proliferationsassay* würde Aufschluss über die beteiligten APZ im Rahmen der Pathogenese bringen. In einem geeigneten System wäre die Analyse der Immunantwort nach Applikation des toxischen, bzw. des gekoppelten Peptides von großem Interesse. Welche Interleukine werden produziert? Welche T-Zellen werden aktiviert? Werden Antikörper produziert? Beispielsweise führt bei der Zöliakie eine Th1-Antwort zu der Entzündung im Darm [Koning et al. 2005]. Ändert sich das Profil nach oraler Verabreichung des konjugierten Peptides?

Sowohl die vorliegenden Daten zeigen einen unterschiedlichen Peptidtransport in den HT29 Zellen (3.2.3 und 4.2.3) als auch die in Martine Heymans Gruppe erzielten Ergebnisse demonstrieren eine unterschiedliche Prozessierung der Gliadinpeptide [Matysiak-Budnik et al. 2003]. Die transzelluläre Degradation des konjugierten toxischen Peptides könnte ebenfalls in der Ussing Kammer und HPLC überprüft werden. Der direkte Einfluss dieses Peptides wurde für die Produktion von IL-15 in der Lamina propria, eine erhöhte Expression von MICA und tTG2 sowie die Reorganisation des Zytoskeletts gezeigt [Clemente et al. 2003; Maiuri et al. 2003; Hue et al. 2004]. Wenn das Peptid nach der Konjugation auch in Zöliakiepatienten bei der transepithelialen Passage degradiert wird, wäre eventuell die toxische Wirkung des Peptides aufgehoben. Ebenfalls könnte der Frage nachgegangen werden, ob diese pathologischen Effekte durch das toxische Peptid weiterhin auftreten, wenn das Peptid an CTB konjugiert ist. Dies könnte gleichfalls in den Ultradünnschnitten mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden oder aber auch *in vitro* erfolgen. Mit Hilfe der HT29 Zellen ließen sich dann auch quantitative Vergleiche der Proteinexpression im Western Blot oder mittels Immunpräzipitation durchführen.

Die auf diese Weise erzielten Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Problematik der Zöliakie besser zu verstehen und die Basis für therapeutische Maßnahmen darstellen. Da Enterozyten die erste zelluläre Kontaktstelle mit Gliadin darstellen, ist es möglich, dass nicht nur entscheidende Prozesse der Immunpathogenese der Zöliakie im intestinalen Epithel ablaufen, sondern dass auch durch deren gezielter Beeinflussung innovative therapeutische Optionen bestehen.

5 Literaturverzeichnis

1. **Aeschlimann,D. and Thomazy,V.** (2000) *Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases.* Connect. Tissue Res., 41, 1-27.
2. **Akimov,S.S. and Belkin,A.M.** (2001) *Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin.* Blood, 98, 1567-1576.
3. **al Dawoud,A., Nakshabendi,I., Foulis,A. and Mowat,A.M.** (1992) *Immunohistochemical analysis of mucosal gamma-interferon production in coeliac disease.* Gut, 33, 1482-1486.
4. **Albert,M.L., Pearce,S.F., Francisco,L.M., Sauter,B., Roy,P., Silverstein,R.L. and Bhardwaj,N.** (1998) *Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.* J. Exp. Med., 188, 1359-1368.
5. **Alfalah,M., Wetzel,G., Fischer,I., Busche,R., Sterchi,E.E., Zimmer,K.P., Sallmann,H.P. and Naim,H.Y.** (2005) *A novel type of detergent-resistant membranes may contribute to an early protein sorting event in epithelial cells.* J. Biol. Chem., 280, 42636-42643.
6. **Allen,P.M. and Unanue,E.R.** (1987) *Antigen processing and presentation at a molecular level.* Adv. Exp. Med. Biol., 225, 147-154.
7. **Amigorena,S., Drake,J.R., Webster,P. and Mellman,I.** (1994) *Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes.* Nature, 369, 113-120.
8. **Anderson,R.P., Degano,P., Godkin,A.J., Jewell,D.P. and Hill,A.V.** (2000) *In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope.* Nat. Med., 6, 337-342.
9. **Aniento,F., Emans,N., Griffiths,G. and Gruenberg,J.** (1993) *Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes.* J. Cell Biol., 123, 1373-1387.
10. **Arentz-Hansen,H., Korner,R., Molberg,O., Quarsten,H., Vader,W., Kooy,Y.M., Lundin,K.E., Koning,F., Roepstorff,P., Sollid,L.M. and McAdam,S.N.** (2000) *The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase.* J. Exp. Med., 191, 603-612.
11. **Arunachalam,B., Phan,U.T., Geuze,H.J. and Cresswell,P.** (2000) *Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT).* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97, 745-750.
12. **Bahram,S., Inoko,H., Shiina,T. and Radosavljevic,M.** (2005) *MIC and other NKG2D ligands: from none to too many.* Curr. Opin. Immunol., 17, 505-509.
13. **Abdel Motal,U.M., Zhou,X., Joki,A., Siddiqi,A.R., Srinivasa,B.R., Stenvall,K., Dahmen,J. and Jondal,M.** (1993) *Major histocompatibility complex class I-binding peptides are recycled to the cell surface after internalization.* Eur. J. Immunol., 23, 3224-3229.

14. **Bendix,U., Lentz,S., Rothschild,M., Lehmann,I., Osman,A.A. and Mothes,T.** (1997) *Effect of gamma-interferon on binding of gliadin and other food peptides to the human intestinal cell line HT-29.* Clin. Chim. Acta, 261, 69-80.
15. **Bergerot,I., Ploix,C., Petersen,J., Moulin,V., Rask,C., Fabien,N., Lindblad,M., Mayer,A., Czerkinsky,C., Holmgren,J. and Thivolet,C.** (1997) *A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 94, 4610-4614.
16. **Berin,M.C., Kiliaan,A.J., Yang,P.C., Groot,J.A., Taminiau,J.A. and Perdue,M.H.** (1997) *Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction.* Gastroenterology, 113, 856-864.
17. **Biagi,F., Campanella,J., Laforenza,U., Gastaldi,G., Tritto,S., Grazioli,M., Villanacci,V. and Corazza,G.R.** (2006) *Transglutaminase 2 in the enterocytes is coeliac specific and gluten dependent.* Dig. Liver Dis., 38, 652-658.
18. **Birnboim,H.C. and Doly,J.** (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523.
19. **Bland,P.W. and Warren,L.G.** (1986) *Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera.* Immunology, 58, 1-7.
20. **Bland,P.W. and Warren,L.G.** (1986) *Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells.* Immunology, 58, 9-14.
21. **Bland,P.W. and Whiting,C.V.** (1989) *Antigen processing by isolated rat intestinal villus enterocytes.* Immunology, 68, 497-502.
22. **Blumberg,R.S., Colgan,S.P. and Balk,S.P.** (1997) *CD1d: outside-in antigen presentation in the intestinal epithelium?* Clin. Exp. Immunol., 109, 223-225.
23. **Blumberg,R.S., Lencer,W.I., Zhu,X., Kim,H.S., Claypool,S., Balk,S.P., Saubermann,L.J. and Colgan,S.P.** (1999) *Antigen presentation by intestinal epithelial cells.* Immunol. Lett., 69, 7-11.
24. **Bolte,G., Seilmeier,W., Wieser,H., Holm,K., Beuermann,K., Newport,B. and Stern,M.** (1999) *Enhanced peptide-binding capacities of small intestinal brush border membranes in celiac disease.* Pediatr. Res., 46, 666-670.
25. **Bonamico,M., Mazzilli,M.C., Morellini,M., Vania,A., Carpino,F., Nicotra,M.R. and Natali,P.G.** (1989) *Expression of class II MHC antigens in the intestinal epithelium of pediatric celiac disease.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 9, 269-275.
26. **Braciale,T.J. and Braciale,V.L.** (1991) *Antigen presentation: structural themes and functional variations.* Immunol. Today, 12, 124-129.
27. **Bradford,M.M.** (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem., 72, 248-254.
28. **Brandtzaeg,P.** (2006) *The changing immunological paradigm in coeliac disease.* Immunol. Lett..
29. **Bregenholt,S., Wang,M., Wolfe,T., Hughes,A., Baerentzen,L., Dyrberg,T., Von Herrath,M.G. and Petersen,J.S.** (2003) *The cholera toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in type 1 diabetes.* Scand. J. Immunol., 57, 432-438.

30. **Brutkiewicz,R.R.** (2006) *CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly*. J. Immunol., 177, 769-775.
31. **Buning,J., Schmitz,M., Repenning,B., Ludwig,D., Schmidt,M.A., Strobel,S. and Zimmer,K.P.** (2005) *Interferon-gamma mediates antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes*. Eur. J. Immunol., 35, 831-842.
32. **Buning,J., Hundorfean,G., Schmitz,M., Zimmer,K.P., Strobel,S., Gebert,A. and Ludwig,D.** (2006) *Antigen targeting to MHC class II-enriched late endosomes in colonic epithelial cells: trafficking of luminal antigens studied in vivo in Crohn's colitis patients*. FASEB J., 20, 359-361.
33. **Campbell,N., Yio,X.Y., So,L.P., Li,Y. and Mayer,L.** (1999) *The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system*. Immunol. Rev., 172, 315-324.
34. **Campbell,N.A., Kim,H.S., Blumberg,R.S. and Mayer,L.** (1999) *The nonclassical class I molecule CD1d associates with the novel CD8 ligand gp180 on intestinal epithelial cells*. J. Biol. Chem., 274, 26259-26265.
35. **Castano,A.R., Tangri,S., Miller,J.E., Holcombe,H.R., Jackson,M.R., Huse,W.D., Kronenberg,M. and Peterson,P.A.** (1995) *Peptide binding and presentation by mouse CD1*. Science, 269, 223-226.
36. **Cerf-Bensussan,N., Quaroni,A., Kurnick,J.T. and Bhan,A.K.** (1984) *Intraepithelial lymphocytes modulate Ia expression by intestinal epithelial cells*. J. Immunol., 132, 2244-2252.
37. **Cehade,M. and Mayer,L.** (2005) *Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities*. J. Allergy Clin. Immunol., 115, 3-12.
38. **Chen,Y., Inobe,J. and Weiner,H.L.** (1995) *Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression*. J. Immunol., 155, 910-916.
39. **Chirido,F.G., Zwirner,N.W., Rumbo,M. and Fossati,C.A.** (2002) *In vitro presentation of gliadin-derived peptides by different cell lines*. Clin. Chim. Acta, 317, 151-158.
40. **Chiu,I., Davis,D.M. and Strominger,J.L.** (1999) *Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 96, 13944-13949.
41. **Chow,A., Toomre,D., Garrett,W. and Mellman,I.** (2002) *Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane*. Nature, 418, 988-994.
42. **Clemente,M.G., De Virgiliis,S., Kang,J.S., Macatagney,R., Musu,M.P., Di Pierro,M.R., Drago,S., Congia,M. and Fasano,A.** (2003) *Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function*. Gut, 52, 218-223.
43. **Collins,D.S., Unanue,E.R. and Harding,C.V.** (1991) *Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing*. J. Immunol., 147, 4054-4059.
44. **Conner,S.D. and Schmid,S.L.** (2003) *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 422, 37-44.
45. **Curman,B., Kampe,O., Rask,L. and Peterson,P.A.** (1979) *Presence of alloreactive Ia antigens on murine intestine epithelial cells*. Scand. J. Immunol., 10, 11-15.
46. **Daum,S., Cellier,C. and Mulder,C.J.** (2005) *Refractory coeliac disease*. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 19, 413-424.

47. **De Bruijn,M.L., Jackson,M.R. and Peterson,P.A.** (1995) *Phagocyte-induced antigen-specific activation of unprimed CD8+ T cells in vitro*. Eur. J. Immunol., 25, 1274-1285.
48. **de Haan,L. and Hirst,T.R.** (2000) *Cholera toxin and related enterotoxins: a cell biological and immunological perspective*. J. Nat. Toxins., 9, 281-297.
49. **De Jong,A.S., Van Kessel-van,V.M. and Raap,A.K.** (1985) *Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry*. Histochem. J., 17, 1119-1130.
50. **De Ritis,G., Auricchio,S., Jones,H.W., Lew,E.J., Bernardin,J.E. and Kasarda,D.D.** (1988) *In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease*. Gastroenterology, 94, 41-49.
51. **Desvignes,C., Bour,H., Nicolas,J.F. and Kaiserlian,D.** (1996) *Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4+ T cell-depleted mice*. Eur. J. Immunol., 26, 1756-1761.
52. **DICKE,W.K., WEIJERS,H.A. and VAN DE KAMER,J.H.** (1953) *Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease*. Acta Paediatr., 42, 34-42.
53. **Dieterich,W., Ehnis,T., Bauer,M., Donner,P., Volta,U., Riecken,E.O. and Schuppan,D.** (1997) *Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease*. Nat. Med., 3, 797-801.
54. **Dieterich,W., Esslinger,B. and Schuppan,D.** (2003) *Pathomechanisms in celiac disease*. Int. Arch. Allergy Immunol., 132, 98-108.
55. **Dubois,B., Goubier,A., Joubert,G. and Kaiserlian,D.** (2005) *Oral tolerance and regulation of mucosal immunity*. Cell Mol. Life Sci., 62, 1322-1332.
56. **Enders,G., Gottwald,T. and Brendel,W.** (1986) *Induction of oral tolerance in rats without Peyer's patches*. Immunology, 58, 311-314.
57. **Eriksson,K., Fredriksson,M., Nordstrom,I. and Holmgren,J.** (2003) *Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development*. Infect. Immun., 71, 1740-1747.
58. **Fasano,A. and Catassi,C.** (2005) *Coeliac disease in children*. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 19, 467-478.
59. **Fesus,L. and Piacentini,M.** (2002) *Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions*. Trends Biochem. Sci., 27, 534-539.
60. **Fleckenstein,B., Molberg,O., Qiao,S.W., Schmid,D.G., von der,M.F., Elgstoen,K., Jung,G. and Sollid,L.M.** (2002) *Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation process*. J. Biol. Chem., 277, 34109-34116.
61. **Folk,J.E. and Chung,S.I.** (1985) *Transglutaminases*. Methods Enzymol., 113, 358-375.
62. **FRAZER,A.C., FLETCHER,R.F., ROSS,C.A., SHAW,B., SAMMONS,H.G. and SCHNEIDER,R.** (1959) *Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten*. Lancet, 2, 252-255.

63. **Frey,A., Giannasca,K.T., Weltzin,R., Giannasca,P.J., Reggio,H., Lencer,W.I. and Neutra,M.R.** (1996) *Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting.* J. Exp. Med., 184, 1045-1059.
64. **Friis,S., Dabelsteen,E., Sjostrom,H., Noren,O. and Jarnum,S.** (1992) *Gliadin uptake in human enterocytes. Differences between coeliac patients in remission and control individuals.* Gut, 33, 1487-1492.
65. **Gardner,M.L.** (1988) *Gastrointestinal absorption of intact proteins.* Annu. Rev. Nutr., 8, 329-350.
66. **Garside,P., Steel,M., Liew,F.Y. and Mowat,A.M.** (1995) *CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance.* Int. Immunol., 7, 501-504.
67. **Garside,P. and Mowat,A.M.** (2001) *Oral tolerance.* Semin. Immunol., 13, 177-185.
68. **George-Chandy,A., Eriksson,K., Lebens,M., Nordstrom,I., Schon,E. and Holmgren,J.** (2001) *Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells.* Infect. Immun., 69, 5716-5725.
69. **German,R.N., Castellino,F., Han,R., Reis e Sousa, Romagnoli,P., Sadegh-Nasseri,S. and Zhong,G.M.** (1996) *Processing and presentation of endocytically acquired protein antigens by MHC class II and class I molecules.* Immunol. Rev., 151, 5-30.
70. **Geuze,H.J.** (1998) *The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning.* Immunol. Today, 19, 282-287.
71. **Gianfrani,C., Troncone,R., Mugione,P., Cosentini,E., De Pascale,M., Faruolo,C., Senger,S., Terrazzano,G., Southwood,S., Auricchio,S. and Sette,A.** (2003) *Celiac disease association with CD8+ T cell responses: identification of a novel gliadin-derived HLA-A2-restricted epitope.* J. Immunol., 170, 2719-2726.
72. **Grant,E.P. and Rock,K.L.** (1992) *MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo.* J. Immunol., 148, 13-18.
73. **Greco,L., Romino,R., Coto,I., Di Cosmo,N., Percopo,S., Maglio,M., Paparo,F., Gasperi,V., Limongelli,M.G., Cotichini,R., D'Agate,C., Tinto,N., Sacchetti,L., Tosi,R. and Stazi,M.A.** (2002) *The first large population based twin study of coeliac disease.* Gut, 50, 624-628.
74. **Griffiths,G., McDowall,A., Back,R. and Dubochet,J.** (1984) *On the preparation of cryosections for immunocytochemistry.* J. Ultrastruct. Res., 89, 65-78.
75. **Groh,V., Steinle,A., Bauer,S. and Spies,T.** (1998) *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells.* Science, 279, 1737-1740.
76. **Gromme,M., Uytdehaag,F.G., Janssen,H., Calafat,J., van Binnendijk,R.S., Kenter,M.J., Tulp,A., Verwoerd,D. and Neefjes,J.** (1999) *Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 96, 10326-10331.
77. **Gromme,M. and Neefjes,J.** (2002) *Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways.* Mol. Immunol., 39, 181-202.
78. **Gruenberg,J. and Maxfield,F.R.** (1995) *Membrane transport in the endocytic pathway.* Curr. Opin. Cell Biol., 7, 552-563.

79. **Halstensen, T.S. and Brandtzaeg, P.** (1993) *Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium*. Eur. J. Immunol., 23, 505-510.
80. **Hanahan, D.** (1983) *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Biol., 166, 557-580.
81. **Harding, C.V.** (1995) *Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules*. Semin. Immunol., 7, 355-360.
82. **Harding, C.V.** (1995) *Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules*. Trends Cell Biol., 5, 105-109.
83. **Hershberg, R.M., Framson, P.E., Cho, D.H., Lee, L.Y., Kovats, S., Beitz, J., Blum, J.S. and Nepom, G.T.** (1997) *Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing*. J. Clin. Invest, 100, 204-215.
84. **Hershberg, R.M., Cho, D.H., Youakim, A., Bradley, M.B., Lee, J.S., Framson, P.E. and Nepom, G.T.** (1998) *Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells*. J. Clin. Invest, 102, 792-803.
85. **Hershberg, R.M. and Mayer, L.F.** (2000) *Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity*. Immunol. Today, 21, 123-128.
86. **Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J.F. and Morgat, J.L.** (1982) *Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro*. Am. J. Physiol, 242, G558-G564.
87. **Heyman, M., Crain-Denoyelle, A.M. and Desjeux, J.F.** (1989) *Endocytosis and processing of protein by isolated villus and crypt cells of the mouse small intestine*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 9, 238-245.
88. **Heyman, M. and Desjeux, J.F.** (1992) *Significance of intestinal food protein transport*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 15, 48-57.
89. **Heyman, M.** (2001) *Symposium on 'dietary influences on mucosal immunity'. How dietary antigens access the mucosal immune system*. Proc. Nutr. Soc., 60, 419-426.
90. **Hischenhuber, C., Crevel, R., Jarry, B., Maki, M., Moneret-Vautrin, D.A., Romano, A., Troncone, R. and Ward, R.** (2006) *Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease*. Aliment. Pharmacol. Ther., 23, 559-575.
91. **Hochman, J.H., Jiang, H., Matyus, L., Edidin, M. and Pernis, B.** (1991) *Endocytosis and dissociation of class I MHC molecules labeled with fluorescent beta-2 microglobulin*. J. Immunol., 146, 1862-1867.
92. **Holtke, H.J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K. and Kessler, C.** (1990) *Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. II. Optimization of the digoxigenin system*. Biol. Chem. Hoppe Seyler, 371, 929-938.
93. **Holtmeier, W., Henker, J., Riecken, E.O. and Zimmer, K.P.** (2005) *[Definitions of celiac disease--statement of an expert group from the German Society for Celiac Disease]*. Z. Gastroenterol., 43, 751-754.
94. **Hourigan, C.S.** (2006) *The molecular basis of coeliac disease*. Clin. Exp. Med., 6, 53-59.
95. **Hoyne, G.F., Callow, M.G., Kuo, M.C. and Thomas, W.R.** (1993) *Presentation of peptides and proteins by intestinal epithelial cells*. Immunology, 80, 204-208.

96. **Hue,S., Mention,J.J., Monteiro,R.C., Zhang,S., Cellier,C., Schmitz,J., Verkarre,V., Fodil,N., Bahram,S., Cerf-Bensussan,N. and Caillat-Zucman,S.** (2004) *A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease.* Immunity., 21, 367-377.
97. **Hughes,A., Bloch,K.J., Bhan,A.K., Gillen,D., Giovino,V.C. and Harmatz,P.R.** (1991) *Expression of MHC class II (Ia) antigen by the neonatal enterocyte: the effect of treatment with interferon-gamma.* Immunology, 72, 491-496.
98. **Iwasaki,A. and Kelsall,B.L.** (2001) *Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells.* J. Immunol., 166, 4884-4890.
99. **John,H.A., Birnstiel,M.L. and Jones,K.W.** (1969) *RNA-DNA hybrids at the cytological level.* Nature, 223, 582-587.
100. **Jondal,M., Schirmbeck,R. and Reimann,J.** (1996) *MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens.* Immunity., 5, 295-302.
101. **Jurewicz,A., Biddison,W.E. and Antel,J.P.** (1998) *MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes.* J. Immunol., 160, 3056-3059.
102. **Kagnoff,M.F.** (2005) *Overview and pathogenesis of celiac disease.* Gastroenterology, 128, S10-S18.
103. **Karlsson,M., Lundin,S., Dahlgren,U., Kahu,H., Pettersson,I. and Telemo,E.** (2001) *"Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells.* Eur. J. Immunol., 31, 2892-2900.
104. **Kasarda,D.D., Okita,T.W., Bernardin,J.E., Baecker,P.A., Nimmo,C.C., Lew,E.J., Dietler,M.D. and Greene,F.C.** (1984) *Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of alpha-type gliadins from wheat (Triticum aestivum).* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 81, 4712-4716.
105. **Kaser,A., Nieuwenhuis,E.E., Strober,W., Fuss,I., Colgan,S. and Blumberg,R.S.** (2004) *CD1d-restricted T cell pathways at the epithelial-lymphocyte-luminal interface.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 39 Suppl 3, S719-S722.
106. **Kersting,S., Bruewer,M., Schuermann,G., Klotz,A., Utech,M., Hansmerten,M., Kriegelstein,C.F., Senninger,N., Schulzke,J.D., Naim,H.Y. and Zimmer,K.P.** (2004) *Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases.* Am. J. Pathol., 165, 425-437.
107. **Kessler,C., Holtke,H.J., Seibl,R., Burg,J. and Muhlegger,K.** (1990) *Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system).* Biol. Chem. Hoppe Seyler, 371, 917-927.
108. **Kim,S.Y., Jeong,E.J. and Steinert,P.M.** (2002) *IFN-gamma induces transglutaminase 2 expression in rat small intestinal cells.* J. Interferon Cytokine Res., 22, 677-682.
109. **Kollner,I., Sodeik,B., Schreek,S., Heyn,H., von Neuhoff,N., Germeshausen,M., Zeidler,C., Kruger,M., Schlegelberger,B., Welte,K. and Beger,C.** (2006) *Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response.* Blood, 108, 493-500.
110. **Koning,F.** (2003) *The molecular basis of celiac disease.* J. Mol. Recognit., 16, 333-336.
111. **Koning,F., Schuppan,D., Cerf-Bensussan,N. and Sollid,L.M.** (2005) *Pathomechanisms in celiac disease.* Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol., 19, 373-387.

112. **Kornfeld,S. and Mellman,I.** (1989) *The biogenesis of lysosomes.* Annu. Rev. Cell Biol., 5, 483-525.
113. **Kovacsovics-Bankowski,M. and Rock,K.L.** (1995) *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules.* Science, 267, 243-246.
114. **Kraehenbuhl,J.P. and Neutra,M.R.** (2000) *Epithelial M cells: differentiation and function .* Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 16, 301-332.
115. **Laemmli,U.K.** (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 227, 680-685.
116. **Lee,D.J., Abeyratne,A., Carson,D.A. and Corr,M.** (1998) *Induction of an antigen-specific, CD1-restricted cytotoxic T lymphocyte response In vivo.* J. Exp. Med., 187, 433-438.
117. **Leitner,K., Ellinger,I., Grill,M., Brabec,M. and Fuchs,R.** (2006) *Efficient apical IgG recycling and apical-to-basolateral transcytosis in polarized BeWo cells overexpressing hFcRn.* Placenta, 27, 799-811.
118. **Lencer,W.I., Hirst,T.R. and Holmes,R.K.** (1999) *Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin.* Biochim. Biophys. Acta, 1450, 177-190.
119. **Lencer,W.I. and Tsai,B.** (2003) *The intracellular voyage of cholera toxin: going retro.* Trends Biochem. Sci., 28, 639-645.
120. **Li,M., Davey,G.M., Sutherland,R.M., Kurts,C., Lew,A.M., Hirst,C., Carbone,F.R. and Heath,W.R.** (2001) *Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo.* J. Immunol., 166, 6099-6103.
121. **Londei,M., Ciacci,C., Ricciardelli,I., Vacca,L., Quaratino,S. and Maiuri,L.** (2005) *Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease.* Mol. Immunol., 42, 913-918.
122. **Lorand,L. and Graham,R.M.** (2003) *Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 4, 140-156.
123. **Luzio,J.P., Rous,B.A., Bright,N.A., Pryor,P.R., Mullock,B.M. and Piper,R.C.** (2000) *Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis.* J. Cell Sci., 113 (Pt 9), 1515-1524.
124. **Maiuri,L., Troncone,R., Mayer,M., Coletta,S., Picarelli,A., De Vincenzi,M., Pavone,V. and Auricchio,S.** (1996) *In vitro activities of A-gliadin-related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa.* Scand. J. Gastroenterol. , 31, 247-253.
125. **Maiuri,L., Picarelli,A., Boirivant,M., Coletta,S., Mazzilli,M.C., De Vincenzi,M., Londei,M. and Auricchio,S.** (1996) *Definition of the initial immunologic modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients.* Gastroenterology, 110, 1368-1378.
126. **Maiuri,L., Ciacci,C., Auricchio,S., Brown,V., Quaratino,S. and Londei,M.** (2000) *Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease.* Gastroenterology, 119, 996-1006.
127. **Maiuri,L., Ciacci,C., Ricciardelli,I., Vacca,L., Raia,V., Auricchio,S., Picard,J., Osman,M., Quaratino,S. and Londei,M.** (2003) *Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease.* Lancet, 362, 30-37.
128. **Maiuri,L., Ciacci,C., Ricciardelli,I., Vacca,L., Raia,V., Rispo,A., Griffin,M., Issekutz,T., Quaratino,S. and Londei,M.** (2005) *Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease.* Gastroenterology, 129, 1400-1413.

129. **Manoury,B., Hewitt,E.W., Morrice,N., Dando,P.M., Barrett,A.J. and Watts,C.** (1998) *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation.* Nature, 396, 695-699.
130. **Marley,N.J., Macartney,J.C. and Ciclitira,P.J.** (1987) *HLA-DR, DP and DQ expression in the small intestine of patients with coeliac disease.* Clin. Exp. Immunol., 70, 386-393.
131. **Mason,D.W., Dallman,M. and Barclay,A.N.** (1981) *Graft-versus-host disease induces expression of Ia antigen in rat epidermal cells and gut epithelium.* Nature, 293, 150-151.
132. **Matysiak-Budnik,T., Candalh,C., Dugave,C., Namane,A., Cellier,C., Cerf-Bensussan,N. and Heyman,M.** (2003) *Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease.* Gastroenterology, 125, 696-707.
133. **Mayer,L. and Shlien,R.** (1987) *Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man.* J. Exp. Med., 166, 1471-1483.
134. **Mayrhofer,G. and Spargo,L.D.** (1990) *Distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the rat jejunum and their association with organelles of the endocytic pathway.* Immunology, 70, 11-19.
135. **Mayrhofer,G.** (1995) *Absorption and presentation of antigens by epithelial cells of the small intestine: hypotheses and predictions relating to the pathogenesis of coeliac disease.* Immunol. Cell Biol., 73, 433-439.
136. **Mazzarella,G., Maglio,M., Paparo,F., Nardone,G., Stefanile,R., Greco,L., van de,W.Y., Kooy,Y., Koning,F., Auricchio,S. and Troncone,R.** (2003) *An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients.* Gut, 52, 57-62.
137. **McSorley,S.J., Rask,C., Pichot,R., Julia,V., Czerkinsky,C. and Gleichenhau,N.** (1998) *Selective tolerization of Th1-like cells after nasal administration of a cholera toxoid-LACK conjugate.* Eur. J. Immunol., 28, 424-432.
138. **Mellman,I.** (1996) *Endocytosis and molecular sorting.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 12, 575-625.
139. **Melter,M., Belitz,H.D., Gellermann,B., Wieser,H. and Stern,M.** (1988) *Handling of gliadin peptides B1-B4 and of cow's milk proteins by rat jejunum gut sacs.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 7, 196-202.
140. **Melton,D.A., Krieg,P.A., Rebagliati,M.R., Maniatis,T., Zinn,K. and Green,M.R.** (1984) *Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.* Nucleic Acids Res., 12, 7035-7056.
141. **Mendez,E., Vela,C., Immer,U. and Janssen,F.W.** (2005) *Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food.* Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 17, 1053-1063.
142. **Meresse,B., Chen,Z., Ciszewski,C., Tretiakova,M., Bhagat,G., Krausz,T.N., Raulet,D.H., Lanier,L.L., Groh,V., Spies,T., Ebert,E.C., Green,P.H. and Jabri,B.** (2004) *Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease.* Immunity., 21, 357-366.
143. **Merlen,C., Fayol-Messaoudi,D., Fabrega,S., El,H.T., Servin,A. and Authier,F.** (2005) *Proteolytic activation of internalized cholera toxin within hepatic endosomes by cathepsin D.* FEBS J., 272, 4385-4397.

144. **Molberg,O., McAdam,S.N., Korner,R., Quarsten,H., Kristiansen,C., Madsen,L., Fugger,L., Scott,H., Noren,O., Roepstorff,P., Lundin,K.E., Sjostrom,H. and Sollid,L.M.** (1998) *Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease.* Nat. Med., 4, 713-717.
145. **Molberg,O., McAdam,S., Lundin,K.E., Kristiansen,C., Arentz-Hansen,H., Kett,K. and Sollid,L.M.** (2001) *T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase.* Eur. J. Immunol., 31, 1317-1323.
146. **Monsuur,A.J., de Bakker,P.I., Alizadeh,B.Z., Zhernakova,A., Bevova,M.R., Strengman,E., Franke,L., van't Slot,R., van Belzen,M.J., Lavrijsen,I.C., Diosdado,B., Daly,M.J., Mulder,C.J., Mearin,M.L., Meijer,J.W., Meijer,G.A., van Oort,E., Wapenaar,M.C., Koeleman,B.P. and Wijmenga,C.** (2005) *Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect.* Nat. Genet., 37, 1341-1344.
147. **Mothes,T., Bendix,U., Pfannschmidt,C. and Lehmann,I.** (1995) *Effect of gliadin and other food peptides on expression of MHC class II molecules by HT-29 cells.* Gut, 36, 548-552.
148. **Mowat,A.M.** (2003) *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.* Nat. Rev. Immunol., 3, 331-341.
149. **Mukherjee,S., Ghosh,R.N. and Maxfield,F.R.** (1997) *Endocytosis.* Physiol Rev. , 77, 759-803.
150. **Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G. and Erlich,H.** (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51 Pt 1, 263-273.
151. **Mullock,B.M., Perez,J.H., Kuwana,T., Gray,S.R. and Luzio,J.P.** (1994) *Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from rat liver.* J. Cell Biol., 126, 1173-1182.
152. **Naim,H.Y., Lacey,S.W., Sambrook,J.F. and Gething,M.J.** (1991) *Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein.* J. Biol. Chem., 266, 12313-12320.
153. **Natali,P., Bigotti,A., Cavalieri,R., Nicotra,M.R., Tecce,R., Manfredi,D., Chen,Y.X., Nadler,L.M. and Ferrone,S.** (1986) *Gene products of the HLA-D region in normal and malignant tissues of nonlymphoid origin.* Hum. Immunol., 15, 220-233.
154. **Neutra,M.R., Mantis,N.J. and Kraehenbuhl,J.P.** (2001) *Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues.* Nat. Immunol., 2, 1004-1009.
155. **Nunes,I., Gleizes,P.E., Metz,C.N. and Rifkin,D.B.** (1997) *Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta.* J. Cell Biol., 136, 1151-1163.
156. **Osman,A.A., Uhlig,H.H., Valdes,I., Amin,M., Mendez,E. and Mothes,T.** (2001) *A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins.* Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13, 1189-1193.
157. **Page,L.J., Darmon,A.J., Uellner,R. and Griffiths,G.M.** (1998) *L is for lytic granules: lysosomes that kill.* Biochim. Biophys. Acta, 1401, 146-156.
158. **Pamer,E. and Cresswell,P.** (1998) *Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing.* Annu. Rev. Immunol., 16, 323-358.

159. **Pappenheimer, J.R. and Reiss, K.Z.** (1987) *Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat.* J. Membr. Biol., 100, 123-136.
160. **Pardue, M.L. and Gall, J.G.** (1969) *Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 64, 600-604.
161. **Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L. and Geuze, H.J.** (1991) *Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments.* Nature, 349, 669-676.
162. **Petersen, J.S., Bregenholt, S., Apostolopolous, V., Homann, D., Wolfe, T., Hughes, A., De Jongh, K., Wang, M., Dyrberg, T. and Von Herrath, M.G.** (2003) *Coupling of oral human or porcine insulin to the B subunit of cholera toxin (CTB) overcomes critical antigenic differences for prevention of type I diabetes.* Clin. Exp. Immunol., 134, 38-45.
163. **Phipps, P.A., Stanford, M.R., Sun, J.B., Xiao, B.G., Holmgren, J., Shinnick, T., Hasan, A., Mizushima, Y. and Lehner, T.** (2003) *Prevention of mucosally induced uveitis with a HSP60-derived peptide linked to cholera toxin B subunit.* Eur. J. Immunol., 33, 224-232.
164. **Piper, J.L., Gray, G.M. and Khosla, C.** (2002) *High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue.* Biochemistry, 41, 386-393.
165. **Pitman, R.S. and Blumberg, R.S.** (2000) *First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system.* J. Gastroenterol., 35, 805-814.
166. **Plenz, G., Koenig, C., Severs, N.J. and Robenek, H.** (1997) *Smooth muscle cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17, 2489-2499.
167. **Plenz, G., Reichenberg, S., Koenig, C., Rauterberg, J., Deng, M.C., Baba, H.A. and Robenek, H.** (1999) *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) modulates the expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19, 1658-1668.
168. **Ploix, C., Bergerot, I., Durand, A., Czerkinsky, C., Holmgren, J. and Thivolet, C.** (1999) *Oral administration of cholera toxin B-insulin conjugates protects NOD mice from autoimmune diabetes by inducing CD4+ regulatory T-cells.* Diabetes, 48, 2150-2156.
169. **Powell, D.W.** (1981) *Barrier function of epithelia.* Am. J. Physiol, 241, G275-G288.
170. **Rask, C., Holmgren, J., Fredriksson, M., Lindblad, M., Nordstrom, I., Sun, J.B. and Czerkinsky, C.** (2000) *Prolonged oral treatment with low doses of allergen conjugated to cholera toxin B subunit suppresses immunoglobulin E antibody responses in sensitized mice.* Clin. Exp. Allergy, 30, 1024-1032.
171. **Rask, C., Fredriksson, M., Lindblad, M., Czerkinsky, C. and Holmgren, J.** (2000) *Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/or of co-administration with free toxin as adjuvant.* APMIS, 108, 178-186.
172. **Reid, P.A. and Watts, C.** (1990) *Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments.* Nature, 346, 655-657.
173. **Reis e Sousa and Germain, R.N.** (1995) *Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis.* J. Exp. Med., 182, 841-851.

174. **Rodriguez,A., Regnault,A., Kleijmeer,M., Ricciardi-Castagnoli,P. and Amigorena,S.** (1999) *Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells.* Nat. Cell Biol., 1, 362-368.
175. **Rowell,J.F., Ruff,A.L., Guarnieri,F.G., Staveley-O'Carroll,K., Lin,X., Tang,J., August,J.T. and Siliciano,R.F.** (1995) *Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells.* J. Immunol., 155, 1818-1828.
176. **Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A. and Arnheim,N.** (1985) *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science, 230, 1350-1354.
177. **Sanchez,J., Wallerstrom,G., Fredriksson,M., Angstrom,J. and Holmgren,J.** (2002) *Detoxification of cholera toxin without removal of its immunoadjuvanticity by the addition of (STa-related) peptides to the catalytic subunit. A potential new strategy to generate immunostimulants for vaccination.* J. Biol. Chem., 277, 33369-33377.
178. **Sander,G.R., Cummins,A.G., Henshall,T. and Powell,B.C.** (2005) *Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins.* FEBS Lett., 579, 4851-4855.
179. **Sanderson,I.R. and Walker,W.A.** (1995) *Establishment of a human fetal small intestinal epithelial cell line.* Int. Arch. Allergy Immunol., 107, 396-397.
180. **Sarles,J., Gorvel,J.P., Olive,D., Maroux,S., Mawas,C. and Giraud,F.** (1987) *Subcellular localization of class I (A,B,C) and class II (DR and DQ) MHC antigens in jejunal epithelium of children with coeliac disease.* J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 6, 51-56.
181. **Schenborn,E.T. and Mierendorf,R.C., Jr.** (1985) *A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure.* Nucleic Acids Res., 13, 6223-6236.
182. **Schurmann,G., Bruwer,M., Klotz,A., Schmid,K.W., Senninger,N. and Zimmer,K.P.** (1999) *Trans epithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease.* Int. J. Colorectal Dis., 14, 41-46.
183. **Scott,H., Solheim,B.G., Brandtzaeg,P. and Thorsby,E.** (1980) *HLA-DR-like antigens in the epithelium of the human small intestine.* Scand. J. Immunol., 12, 77-82.
184. **Shan,L., Molberg,O., Parrot,I., Hausch,F., Filiz,F., Gray,G.M., Sollid,L.M. and Khosla,C.** (2002) *Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue.* Science, 297, 2275-2279.
185. **Shao,L., Serrano,D. and Mayer,L.** (2001) *The role of epithelial cells in immune regulation in the gut.* Semin. Immunol., 13, 163-176.
186. **Sharp,P.A., Sugden,B. and Sambrook,J.** (1973) *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis.* Biochemistry, 12, 3055-3063.
187. **Shen,Z., Reznikoff,G., Dranoff,G. and Rock,K.L.** (1997) *Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules.* J. Immunol., 158, 2723-2730.
188. **Shewry,P.R. and Tatham,A.S.** (1990) *The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution.* Biochem. J., 267, 1-12.
189. **Shewry,P.R., Napier,J.A. and Tatham,A.S.** (1995) *Seed storage proteins: structures and biosynthesis.* Plant Cell, 7, 945-956.

190. **Snoeck,V., Goddeeris,B. and Cox,E.** (2005) *The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake.* Microbes. Infect., 7, 997-1004.
191. **Sollid,L., Paulsen,G., Gaudernack,G. and Thorsby,E.** (1987) *HLA class II profile of a human carcinoma cell line: detection on genomic level and after exposure to gamma-interferon.* Transplant. Proc., 19, 215.
192. **Sollid,L.M., Markussen,G., Ek,J., Gjerde,H., Vartdal,F. and Thorsby,E.** (1989) *Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer.* J. Exp. Med., 169, 345-350.
193. **Sollid,L.M.** (2000) *Molecular basis of celiac disease.* Annu. Rev. Immunol., 18, 53-81.
194. **Sollid,L.M.** (2002) *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder.* Nat. Rev. Immunol., 2, 647-655.
195. **Srinivasan,U., Jones,E., Carolan,J. and Feighery,C.** (2006) *Immunohistochemical analysis of coeliac mucosa following ingestion of oats.* Clin. Exp. Immunol., 144, 197-203.
196. **Stanford,M., Whittall,T., Bergmeier,L.A., Lindblad,M., Lundin,S., Shinnick,T., Mizushima,Y., Holmgren,J. and Lehner,T.** (2004) *Oral tolerization with peptide 336-351 linked to cholera toxin B subunit in preventing relapses of uveitis in Behcet's disease.* Clin. Exp. Immunol., 137, 201-208.
197. **Steinle,A., Groh,V. and Spies,T.** (1998) *Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 95, 12510-12515.
198. **Stepniak,D. and Koning,F.** (2006) *Celiac Disease-Sandwiched between Innate and Adaptive Immunity.* Hum. Immunol., 67, 460-468.
199. **Stern,M., Pang,K.Y. and Walker,W.A.** (1984) *Food proteins and gut mucosal barrier. II. Differential interaction of cow's milk proteins with the mucous coat and the surface membrane of adult and immature rat jejunum.* Pediatr. Res., 18, 1252-1257.
200. **Stinchcombe,J.C. and Griffiths,G.M.** (1999) *Regulated secretion from hemopoietic cells.* J. Cell Biol., 147, 1-6.
201. **Stoorvogel,W., Strous,G.J., Geuze,H.J., Oorschot,V. and Schwartz,A.L.** (1991) *Late endosomes derive from early endosomes by maturation.* Cell, 65, 417-427.
202. **Storrie,B. and Desjardins,M.** (1996) *The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process?* Bioessays, 18, 895-903.
203. **Strobel,S. and Mowat,A.M.** (1998) *Immune responses to dietary antigens: oral tolerance.* Immunol. Today, 19, 173-181.
204. **Strobel,S.** (2002) *Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 958, 47-58.
205. **Strobel,S. and Mowat,A.M.** (2006) *Oral tolerance and allergic responses to food proteins.* Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 6, 207-213.
206. **Stryhn,A., Pedersen,L.O., Romme,T., Olsen,A.C., Nissen,M.H., Thorpe,C.J. and Buus,S.** (1996) *pH dependence of MHC class I-restricted peptide presentation.* J. Immunol., 156, 4191-4197.
207. **Sturgess,R., Day,P., Ellis,H.J., Lundin,K.E., Gjertsen,H.A., Kontakou,M. and Ciclitira,P.J.** (1994) *Wheat peptide challenge in coeliac disease.* Lancet, 343, 758-761.

208. **Sturgess,R.P., Ellis,H.J. and Ciclitira,P.J.** (1991) *Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in coeliac disease*. Gut, 32, 1055-1060.
209. **Sugita,M. and Brenner,M.B.** (1995) *Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments*. J. Biol. Chem., 270, 1443-1448.
210. **Sun,J.B., Holmgren,J. and Czerkinsky,C.** (1994) *Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 91, 10795-10799.
211. **Sun,J.B., Xiao,B.G., Lindblad,M., Li,B.L., Link,H., Czerkinsky,C. and Holmgren,J.** (2000) *Oral administration of cholera toxin B subunit conjugated to myelin basic protein protects against experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing transforming growth factor-beta-secreting cells and suppressing chemokine expression*. Int. Immunol., 12, 1449-1457.
212. **Terpend,K., Boisgerault,F., Blaton,M.A., Desjeux,J.F. and Heyman,M.** (1998) *Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma*. Gut, 42, 538-545.
213. **Thery,C., Zitvogel,L. and Amigorena,S.** (2002) *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat. Rev. Immunol., 2, 569-579.
214. **Thomson,G.** (1995) *HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders*. Crit Rev. Clin. Lab Sci., 32, 183-219.
215. **Thuring,R.W., Sanders,J.P. and Borst,P.** (1975) *A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels*. Anal. Biochem., 66, 213-220.
216. **Tokuyasu,K.T.** (1978) *A study of positive staining of ultrathin frozen sections*. J. Ultrastruct. Res., 63, 287-307.
217. **Torian,B.E. and Kenny,G.E.** (1986) *A new metabolic labelling medium for Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus using 35S methionine*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 181, 620-623.
218. **Tsuji,M.** (2006) *Glycolipids and phospholipids as natural CD1d-binding NKT cell ligands*. Cell Mol. Life Sci., 63, 1889-1898.
219. **Vader,L.W., De Ru,A., van der,W.Y., Kooy,Y.M., Benckhuijsen,W., Mearin,M.L., Drijfhout,J.W., van Veelen,P. and Koning,F.** (2002) *Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease*. J. Exp. Med., 195, 643-649.
220. **Vader,W., Kooy,Y., van Veelen,P., De Ru,A., Harris,D., Benckhuijsen,W., Pena,S., Mearin,L., Drijfhout,J.W. and Koning,F.** (2002) *The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides*. Gastroenterology, 122, 1729-1737.
221. **Vader,W., Stepniak,D., Kooy,Y., Mearin,L., Thompson,A., van Rood,J.J., Spaenij,L. and Koning,F.** (2003) *The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 100, 12390-12395.
222. **van de,W.Y., Kooy,Y., van Veelen,P., Pena,S., Mearin,L., Papadopoulos,G. and Koning,F.** (1998) *Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity*. J. Immunol., 161, 1585-1588.
223. **van de,W.Y., Corazza,N., Allez,M., Mayer,L.F., Iijima,H., Ryan,M., Cornwall,S., Kaiserlian,D., Hershberg,R., Koezuka,Y., Colgan,S.P. and Blumberg,R.S.** (2003)

- Delineation of a CD1d-restricted antigen presentation pathway associated with human and mouse intestinal epithelial cells.* *Gastroenterology*, 124, 1420-1431.
224. **van Niel,G., Raposo,G., Candalh,C., Boussac,M., Hershberg,R., Cerf-Bensussan,N. and Heyman,M.** (2001) *Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles.* *Gastroenterology*, 121, 337-349.
225. **Van,N.G., Mallegol,J., Bevilacqua,C., Candalh,C., Brugiere,S., Tomaskovic-Crook,E., Heath,J.K., Cerf-Bensussan,N. and Heyman,M.** (2003) *Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice.* *Gut*, 52, 1690-1697.
226. **Verdonck,F., Snoeck,V., Goddeeris,B.M. and Cox,E.** (2005) *Cholera toxin improves the F4(K88)-specific immune response following oral immunization of pigs with recombinant FaeG.* *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 103, 21-29.
227. **Villadangos,J.A. and Ploegh,H.L.** (2000) *Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge?* *Immunity*, 12, 233-239.
228. **Walker,W.A., Cornell,R., Davenport,L.M. and Isselbacher,K.J.** (1972) *Macromolecular absorption. Mechanism of horseradish peroxidase uptake and transport in adult and neonatal rat intestine.* *J. Cell Biol.*, 54, 195-205.
229. **Watts,C.** (1997) *Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.* *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 821-850.
230. **Weiner,H.L., Friedman,A., Miller,A., Khoury,S.J., al Sabbagh,A., Santos,L., Sayegh,M., Nussenblatt,R.B., Trentham,D.E. and Hafler,D.A.** (1994) *Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens.* *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 809-837.
231. **Weiner,H.L. and van Rees,E.P.** (1999) *Mucosal tolerance.* *Immunol. Lett.*, 69, 3-4.
232. **Weiner,H.L.** (2000) *Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms.* *J. Clin. Invest.*, 106, 935-937.
233. **Wiedermann,U., Jahn-Schmid,B., Lindblad,M., Rask,C., Holmgren,J., Kraft,D. and Ebner,C.** (1999) *Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy.* *Int. Immunol.*, 11, 1715.
234. **Wijburg,O.L., van den Dobbelen,G.P., Vadolas,J., Sanders,A., Strugnell,R.A. and van Rooijen,N.** (1998) *The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens.* *Eur. J. Immunol.*, 28, 479-487.
235. **Williams,A., Peh,C.A. and Elliott,T.** (2002) *The cell biology of MHC class I antigen presentation.* *Tissue Antigens*, 59, 3-17.
236. **Wiman,K., Curman,B., Forsum,U., Klareskog,L., Malmnas-Tjernlund,U., Rask,L., Tragardh,L. and Peterson,P.A.** (1978) *Occurrence of Ia antigens on tissues of non-lymphoid origin.* *Nature*, 276, 711-713.
237. **Yewdell,J.W. and Bennink,J.R.** (1992) *Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes.* *Adv. Immunol.*, 52, 1-123.
238. **Zanoni,G., Navone,R., Lunardi,C., Tridente,G., Bason,C., Sivori,S., Beri,R., Dolcino,M., Valletta,E., Corrocher,R. and Puccetti,A.** (2006) *In Celiac Disease, a Subset of Autoantibodies against Transglutaminase Binds Toll-Like Receptor 4 and Induces Activation of Monocytes.* *PLoS. Med.*, 3, e358.

239. **Zhang,Z.Y. and Michael,J.G.** (1990) *Orally inducible immune unresponsiveness is abrogated by IFN-gamma treatment.* J. Immunol., 144, 4163-4165.
240. **Zimmer,K.P., Poremba,C., Weber,P., Ciclitira,P.J. and Harms,E.** (1995) *Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes.* Gut, 36, 703-709.
241. **Zimmer,K.P., Matsuda,I., Matsuura,T., Mori,M., Colombo,J.P., Fahimi,H.D., Koch,H.G., Ullrich,K. and Harms,E.** (1995) *Ultrastructural, immunocytochemical and stereological investigation of hepatocytes in a patient with the mutation of the ornithine transcarbamylase gene.* Eur. J. Cell Biol., 67, 73-83.
242. **Zimmer,K.P., Naim,H., Weber,P., Ellis,H.J. and Ciclitira,P.J.** (1998) *Targeting of gliadin peptides, CD8, alpha/beta-TCR, and gamma/delta-TCR to Golgi complexes and vacuoles within celiac disease enterocytes.* FASEB J., 12, 1349-1357.
243. **Zimmer,K.P., Buning,J., Weber,P., Kaiserlian,D. and Strobel,S.** (2000) *Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes.* Gastroenterology, 118, 128-137.
244. **Zimmer,K.P., Pöppelbaum,A, Mothes,T, Weissen-Plenz,G., Schmitz,M., Fischer,I., Wieser,H., Méndez,E., Büning,J., Lerch,M.M., Ciclitira,P.J., Naim,H.Y.** (2006) *Intracellular intersection pathways of gliadin with transglutaminase and MHC proteins within enterocytes in celiac disease.* Eingereicht bei "Journal of American Pathology".

Weitere Literatur:

1. **Abbas, A.K. and Lichtman, A.H.** (2003) *Cellular and molecular immunology*, Elsevier Science (USA) Fifth edition
2. **Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.** (2003) *Biochemie* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin; 5. Auflage
3. **Kahlenberg, F.; Sanchez, D.; Lachmann, I.; Tuckova, L.; Tlaskalova, H.; Méndez, E.; Mothes, T.** (2006) *Monoclonal antibody R5 for detection of putatively celiac-toxic gliadin peptides*. Eur Food Res Technol 222:78-82 © Springer-Verlag 2005
4. **Keller, K.-M.** (2003) *Klinische Symptomatik: "Zöliakie, ein Eisberg"*. Monatsschr Kinderheilkd 151:706-714 © Springer-Verlag 2003
5. **Marsh, M.** (2001) *Endocytosis*, Oxford University Press
6. **Marsh, S., Parham, P., Barber, L.D.** (2000) *The HLA Facts Book*; Academic Press London
7. **Sambrook, J., William, D.** (2001) *Molecular Cloning – A laboratory manual*. 3. Auflage, Cold Spring Harbour, Laboratory Press, New York
8. **Shewry, P.R. and Kasarda, D.D.** (1992) in **Marsh M.N.**, ed. *Coeliac disease*. Oxford: Blackwell Scientific Publications
9. **Waßmuth, R.** (1995) *Einführung in das HLA-System*, ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG
- 10 <http://www.unifr.ch/histologie/learning/free/allemand/biochemieverdauung/duenndarm/duenndarm.php>

Publikationen

Artikel

Novel Type of Detergent-resistant Membranes May Contribute to an Early protein Sorting Event in Epithelial Cells.

M Alfalah, G Wetzell, I Fischer, R Busche, EE Sterchi, KP Zimmer, HP Sallmann, and HY Naim

Journal of Biological Chemistry, Vol. 280 (52) Dec 2005

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung vorbereitet, bzw. eingereicht oder als Abstract eingereicht:

Intracellular Intersection Pathways of gliadin with transglutaminase and MHC proteins within Enterocytes in Celiac Disease.

KP Zimmer, A Pöppelbaum, T Mothes, G Weissen-Plenz, M Schmitz, I Fischer, H Wieser, E Mendez, J Büning, MM Lerch, PJ Ciclitira, HY Naim

(eingereicht bei Journal of American Pathology, in Review)

Intracellular transport studies of gliadin peptides in HT29 cells.

I Fischer, H Wieser, T Mothes, R Blasczyk, E Mendez, H Y. Naim, KP Zimmer
(in Vorbereitung)

Abstracts

Gliadin induzierte HLA Expression in intestinalen Zelllinien.

I Fischer, M Schmitz, R Blasczyk, HY Naim, KP Zimmer

Vortrag bei der GPGE Jahrestagung in Graz, Österreich; Mai 2003

Gliadin induced HLA expression in intestinal cell lines.

I Fischer, M Schmitz, R Blasczyk, S Rosen-Bronson, HY Naim, KP Zimmer

Posterpräsentation beim ESPGHAN meeting 2003 in Prag, Tschechische Republik; Juni 2003

Intrazelluläre Transportstudien von Gliadinpeptiden in HT29 Zellen.

I Fischer, Y Reinke, H Wieser, T Mothes, HY Naim, KP Zimmer

Vortrag bei der GPGE Jahrestagung in Basel, Schweiz; März 2005

Intracellular transport studies of gliadin peptides in HT29 cells.

I Fischer, Y Reinke, H Wieser, T Mothes, E Mendez, HY Naim and KP Zimmer

Posterpräsentation beim ESPGHAN meeting in Porto, Portugal; Juni 2005

Sorting of gliadin peptides to late endosomes within enterocytes.

I Fischer, H Wieser, E Mendez, S Wagner, H Breiteneder, PJ Ciclitira, T Mothes, HY Naim, KP Zimmer

Präsentation beim ESPGHAN meeting in Barcelona, Spanien; Mai 2007

8 Lebenslauf

Name: Ina Fischer
Geburtstag: 27.10.1975
Geburtsort: Lehrte
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1982 – 1986 Grundschule in Lehrte-Arpke
1986 – 1988 Orientierungsschule in Lehrte-Ost
1988 – 1996 Gymnasium Lehrte
Abschluss: Abitur

Universität: 10.1996 – 04. 2002
Studium Biologie, Universität Hannover
Abschluss: Diplom

Thema der Diplomarbeit:

*Untersuchungen zur Assoziation der intestinalen Saccharase-
Isomaltase mit Membran-Mikrodomänen.*

Abteilung für Physiologische Chemie, Tierärztliche Hochschule
Hannover

Doktorarbeit: 05. 2002 – 04. 2007
Doktorarbeit in Biochemie und Zellbiologie
Universitätsklinikum Münster, Klinik für Kinder- und
Jugendmedizin und Abteilung für Physiologische Chemie,
Tierärztliche Hochschule Hannover

Thema:

*Intrazelluläre Transportprozesse zur Pathogenese der Zöliakie
in epithelialen Zelllinien des Darms.*

9 Danksagung

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei **Herrn Univ.- Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer** für die Überlassung dieses interessanten und spannenden Projektes sowie für seine stetige Unterstützung und Förderung, seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit.

Den gleichen Dank möchte ich **Herrn Univ.- Prof. Dr. Hassan Y. Naim** aussprechen für die Betreuung dieses Projektes und die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe. Insbesondere bedanke ich mich für seine stetige Gesprächsbereitschaft und wichtigen Hinweise bei der Interpretation von Ergebnissen.

Ein herzlicher und großer Dank geht an **Frau PD Dr. G. Weissen-Plenz** und **Brigitta Weissen** für ihre Anleitung und unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Northern Blots und in situ Hybridisierungen.

Ich bedanke mich bei den Kooperationspartnern, **Herrn Prof. Dr. E. Mendéz** und **Herrn Prof. Dr. P.J. Ciclitira** für die Bereitstellung der monoklonalen anti-Gliadin-Antikörper, **Herrn Prof. Dr. H. Wieser** für die Synthese der Peptide, **Herrn PD Dr. S. Wagner** für die Konjugation des toxischen Peptides mit CTB, **Frau Prof. Dr. R. Fuchs** für ihre Unterstützung und die Einarbeitung in die Methode der Immunfluoreszenz, **Prof. Dr. T. Mothes** für seine spontane Gesprächsbereitschaft und Diskussionsfreude sowie **Prof. Dr. R. Blasczyk** für die Typisierung der Zelllinien.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und Studienkollegin **Dr. Inga Köllner** für ihre ausgiebige und ausdauernde Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, für wissenschaftliches Fachsimpeln bei einem „Käffchen“ und ihre Freundschaft.

Ich möchte mich ganz herzlich bei **Dr. Martina Schmitz** für ihre andauernde Hilfe und Bereitschaft mir „unter die Arme zu greifen“ bedanken.

Annina Beck danke ich für ihre unermüdliche und zuverlässige Zusammenarbeit und ihr stets frohes Gemüt.

Bei **Martin Kaminski** bedanke ich mich sehr für die vielen Korrekturen und die moralische und praktische Unterstützung während meiner Arbeit. Ein ganz lieber Dank geht an **Yvonne Reinke**, die mich die letzten Jahre begleitet hat und eine gute Freundin geworden ist, und die meine Höhen und Tiefen immer wieder geduldig miterlebt hat.

Bei **Arndt Rohwedder** bedanke ich mich für seine geduldige Hilfe bei allen mathematischen oder statistischen Fragen und Auswertungen. Ebenso danke ich dem **Arbeitskreis der Physiologischen Chemie** für die tollen Kollegen und eine angenehme Zeit im und um das Labor. Das große Engagement aller Arbeitskollegen, verbunden mit stetiger, gegenseitiger Hilfsbereitschaft sowie das freundschaftliche Arbeitsklima, ermöglichten eine optimale Zusammenarbeit. Ebenso gilt mein Dank **Zeynep Isgüder** und **Deborah Castelletti** für die Hilfe mit englischen Formulierungen, für die angenehme Atmosphäre im Büro und für „*Friends*“.

Meinen Eltern **Beate** und **Willi Fischer**, die stets für mich da sind, mich motiviert haben, und die mir diesen Weg so selbstverständlich ermöglicht haben, danke ich an dieser Stelle ganz herzlich.

Ich bedanke mich bei allen **Freunden** und meiner **Familie** für „offene Ohren“, ihr Vertrauen in mich, ihr Verständnis, für die kleinen und großen Hilfeleistungen und ihre Freundschaft.

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „*Intrazelluläre Transportprozesse zur Pathogenese der Zöliakie in epithelialen Zelllinien des Darms*“ selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover angefertigt.

Hannover, 11. Januar 2007

Ina Fischer