

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Aktivierung des
Lymphotoxin- β -Rezeptors in chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen**

**Michaela Jungbeck
aus
Bad Kötzing
2006**

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel betreut und von Herrn Prof. Dr. Ernst Wagner vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 07.08.06

Michaela Jungbeck

Dissertation eingereicht am	07.08.06
1. Gutachter	Prof. Dr. Daniela N. Männel
2. Gutachter	Prof. Dr. Ernst Wagner
Mündliche Prüfung am	26.10.06

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2003 bis Mai 2006 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Aus kleinem Anfang
entspringen alle Dinge.
-Cicero-

1. Einleitung

1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.2	Neue Therapieansätze bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	11
1.3	Das Lymphotoxin/ Lymphotoxin- β -Rezeptor-System.....	18
1.4	Ziele der Arbeit.....	24

2. Material

2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.2	Verbrauchsmaterial und Geräte.....	26
2.3	Kits.....	28
2.4	Molekulargewichtsstandards.....	28
2.5	Antikörper und Enzyme.....	28
2.6	Oligonukleotide.....	29
2.7	Puffer und Lösungen.....	30
2.8	Zelllinien.....	32
2.9	Sonstiges.....	32

3. Methoden

3.1	Tierexperimentelle Methoden.....	33
3.1.1	Mäuse.....	33
3.1.2	Induktion einer experimentellen akuten und chronischen Colitis mit Dextran-sulfat.....	33
3.1.3	Bestimmung der Entzündungsparameter des Dickdarmes.....	34
3.1.3.1	Histologischer Score.....	34
3.1.3.2	Bestimmung der Lymphfollikel-Anzahl.....	35
3.1.3.3	Gewichtsverlust.....	35
3.1.3.4	Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität.....	36
3.1.4	Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligation und Punktion (CLP).....	36
3.2	Herstellung von monoklonalen Antikörpern.....	37
3.2.1	Immunisierung von Mäusen.....	37
3.2.2	Gewinnung von Serum aus Vollblut.....	37
3.2.3	Gewinnung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PECs).....	37
3.2.4	Isolierung von Milzzellen für die Fusion.....	38
3.2.5	Zellfusion mit Polyethylenglykol.....	38
3.2.6	Subklonierung von Hybridomzellen.....	39
3.2.7	Reinigung von monoklonalen Antikörpern.....	39
3.2.7.1	Ammoniumsulfat-Fällung.....	39
3.2.7.2	Reinigung von IgG über Protein-G-Sepharose.....	39
3.3	„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA).....	40
3.3.1	ELISA zur Bestimmung von Immunglobulintitern im Mausserum.....	40
3.3.2	ELISA zum Testen der Hybridomüberstände.....	41
3.3.3	Kompetitiver ELISA zur Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern....	41
3.3.4	ELISA zur Quantifizierung von TNF, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , MIP-2 und RANTES...	41
3.4	Weitere proteinchemische Methoden.....	42
3.4.1	Messung der Proteinkonzentration.....	42
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	42
3.4.3	Coomassie-Färbung.....	43
3.4.4	Western Blot.....	43
3.4.5	Dot Blot.....	44
3.4.6	Biotinylierung von Antikörpern.....	44
3.5	Arbeiten mit RNA.....	44
3.5.1	Isolierung von total-RNA aus Zellen.....	45
3.5.2	Isolierung von total-RNA aus Darmgewebe.....	45
3.5.3	Reverse Transkription.....	45

3.6	Arbeiten mit DNA	46
3.6.1	Isolierung von genomischer DNA aus Maus-Schwänzen.....	46
3.6.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
3.6.2.1	Genotypisierung konditioneller LT β -/- Mäuse.....	47
3.6.2.2	PCR auf mLIGHT.....	48
3.6.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
3.6.4	Quantitative RT-PCR mittels LightCycler.....	49
3.7	Zellbiologische Methoden	50
3.7.1	Zellkulturbedingungen.....	50
3.7.2	Zellkulturmedien.....	50
3.7.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	50
3.7.4	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	51
3.7.5	Mycoplasmentest.....	51
3.7.6	Stimulierungsexperimente mit L929-Zellen.....	51
3.7.7	Gewinnung einer Zellsuspension aus mesenterialen Lymphknoten bzw. Milzen	51
3.7.8	Durchflusszytometrie.....	52
3.7.9	MACS-Reinigung.....	53
3.8	Untersuchung von Patienten-Seren	54
3.9	Statistik	54
4.	Ergebnisse	
4.1	LT$\alpha$$\beta$-/- Mäuse in DSS-induzierter Colitis	55
4.1.1	LT α β -/- Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis.....	55
4.1.1.1	Gewichtsverlust.....	55
4.1.1.2	Histologie und histologischer Score.....	56
4.1.1.3	Lymphfollikel-Anzahl.....	58
4.1.1.4	Myeloperoxidase-Aktivität.....	58
4.1.1.5	Dickdarmlänge.....	59
4.1.1.6	Zytokinsekretion von Milzzellen.....	60
4.1.2	LT α β -/- Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis.....	61
4.1.2.1	Histologie und histologischer Score.....	61
4.1.2.2	Lymphfollikel-Anzahl.....	63
4.1.2.3	Dickdarmlänge.....	64
4.1.2.4	Zytokinsekretion von Milzzellen.....	64
4.2	Konditionelle LTβ-/- Mäuse in DSS-induzierter Colitis	65
4.2.1	Zucht der konditionellen LT β -/- Mäuse.....	65
4.2.2	Konditionelle LT β -/- Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis.....	69
4.2.2.1	Gewichtsverlust.....	69
4.2.2.2	Histologischer Score.....	69
4.2.2.3	Myeloperoxidase-Aktivität.....	70
4.2.2.4	Dickdarmlänge.....	71
4.2.2.5	Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten.....	71
4.2.3	Konditionelle LT β -/- Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis.....	72
4.2.3.1	Histologischer Score.....	72
4.2.3.2	Lymphfollikel-Anzahl.....	72
4.2.3.3	Dickdarmlänge.....	73
4.2.3.4	Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten.....	74
4.3	LIGHT-/- Mäuse in DSS-induzierter Colitis	75
4.3.1	LIGHT-/- Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis.....	75
4.3.1.1	Gewichtsverlust.....	75
4.3.1.2	Histologischer Score.....	76
4.3.1.3	Lymphfollikel-Anzahl.....	76
4.3.1.4	Myeloperoxidase-Aktivität.....	77
4.3.1.5	Dickdarmlänge.....	77
4.3.1.6	Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten.....	78

4.3.1.7	Zytokinexpression im Dickdarmgewebe.....	78
4.3.2	LIGHT-/- Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis.....	79
4.3.2.1	Histologie und Histologischer Score.....	79
4.3.2.2	Lymphfollikel-Anzahl.....	81
4.3.2.3	Dickdarmlänge.....	82
4.3.2.4	Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten.....	82
4.4	HVEM-/- Mäuse in DSS-induzierter Colitis.....	83
4.4.1	HVEM-/- Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis.....	83
4.4.1.1	Gewichtsverlust.....	83
4.4.1.2	Histologischer Score.....	84
4.4.1.3	Myeloperoxidase-Aktivität.....	84
4.4.2	HVEM-/- Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis.....	85
4.4.2.1	Histologischer Score.....	85
4.4.2.2	Lymphfollikel-Anzahl.....	86
4.4.2.3	Dickdarmlänge.....	86
4.4.2.4	Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten.....	87
4.5	Die Rolle von LIGHT in der Kontrolle von Infektionen.....	88
4.6	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler anti-mLIGHT-Antikörper	89
4.6.1	Immunisierung von LIGHT-/- Mäusen.....	89
4.6.2	Klonierte, stabil anti-mLIGHT-Antikörper produzierende Hybridome.....	91
4.6.3	Reinigung über eine Protein-G-Sepharose-Säule.....	92
4.6.4	Detektion von rekombinantem mLIGHT im Dot Blot.....	93
4.6.5	Detektion von rekombinantem mLIGHT im Western Blot.....	94
4.6.6	Detektion von endogenem mLIGHT mittels Durchflusszytometrie.....	95
4.6.6.1	PCR auf mLIGHT mit stimulierten PMMI.....	95
4.6.6.2	Durchflusszytometrie mit stimulierten PMMI.....	96
4.6.6.3	Durchflusszytometrie mit CD8 ⁺ T-Lymphozyten aus der Maus.....	97
4.6.7	<i>Invitro</i> -Test der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper.....	99
4.6.8	<i>In vivo</i> -Test der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper.....	99
4.6.9	Vergleichende Epitopbestimmung mittels ELISA.....	101
4.7	LIGHT-Serumspiegel in Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten...	104
<u>5. Diskussion</u>		
5.1	LT $\alpha\beta$ und LIGHT in akuter DSS-induzierter Colitis.....	105
5.1.1	Die Rolle von Bakterien.....	107
5.1.2	Die Rolle von LT $\alpha\beta$ -exprimierenden Lymphozyten.....	108
5.1.3	Die Rolle von LIGHT.....	110
5.2	LT $\alpha\beta$ und LIGHT in chronischer DSS-induzierter Colitis.....	113
5.2.1	Adenom- und Karzinombildung in DSS-induzierter Colitis.....	114
5.2.2	Aktivierung des LT β R und HVEM durch LIGHT.....	115
5.2.3	Aktivierung des LT β R durch LT $\alpha\beta$ -exprimierende Lymphozyten.....	119
5.3	Monoklonale anti-LIGHT-Antikörper.....	120
<u>6. Zusammenfassung</u>		124
<u>7. Literaturverzeichnis</u>		126
<u>8. Anhang</u>		141
<u>Danksagung</u>		142
<u>Lebenslauf</u>		143

Abkürzungen

ABTS	2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6))
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
CCL19	Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine, ELC
CCL21	secondary lymphoid chemokine, SLC
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CLP	zökale Ligation und Punktion
CpG	cytosin-guanosin dinucleotide
CU	Colitis ulcerosa
CXCL13	B-lymphocyte chemoattractant, BLC
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat
DSS	Dextransulfat-Sodium
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
ECD	Extrazellulärdomäne
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDC	Follicular Dendritic Cell
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GALT	gut-associated lymphoreticular tissue
GMP	Good Manufacturing Practice
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HRP	Horseradish Peroxidase
HT	Hypoxanthin-Thymidin
HVEM	Herpes virus entry mediator
IBD	inflammatory bowel diseases
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton

LIGHT	lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for binding herpesvirus entry mediator on T cells
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
LT β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
MACS	Magnetic Cell Separation
MAdCAM-1	Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1
MC	Morbus Crohn
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage Inflammatory Protein-2
mLN	mesenteriale Lymphknoten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
n.d.	nicht detektierbar
NF κ B	nukleäre Faktor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	nitric oxide
N.S.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PECs	Peritoneal-Exsudat-Zellen
PI	Propidium-Iodid
PMA	Phorbol Myristate Acetate
POX	Peroxidase
PP	Peyer's Patches
r	rekombinant
RA	Rheumatoide Arthritis
RAG	recombination activating gene 1
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
S2	Drosophila Schneider-Zellen
s.c.	subcutan
SCID	Severe Combined Immune Deficient
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
tg	transgen
TGF- β	transforming growth factor- β
Th1/ Th2	T-Helferzelle 1/2
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNF	Tumor necrosis factor

TNFR	Tumor necrosis factor receptor
UV	ultraviolette Strahlung
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den häufigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen unter anderem Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC). Eine retrospektiv erhobene Studie, die die Entwicklung von 1930-1990 näher betrachtet (Thomas, 1995), gibt Aufschluss über die **Inzidenz** dieser Erkrankungen. Für MC ist dabei ein erheblicher Anstieg seit den Nachkriegsjahren auffällig. In den meisten europäischen Studien war CU etwa doppelt so häufig wie MC. Beide Erkrankungen manifestieren sich vorwiegend bei jungen Erwachsenen, grundsätzlich ist aber die Erstdiagnose in jedem Alter möglich. In einer großen europäischen Studie, seit den 1980er Jahren durchgeführt, konnte ein Nord-Süd-Gefälle in der Inzidenz der CED nachgewiesen werden (Shivananda, 1996). In Deutschland tritt MC bzw. CU mit einer Häufigkeit von etwa 5 bzw. 3 Neuerkrankungen pro Jahr und 100.000 Einwohner auf, wobei Frauen im Vergleich zu Männern geringfügig häufiger von MC betroffen sind, bei CU liegt ein umgekehrtes Verhältnis vor (Timmer, 1999b; Timmer, 1999a).

Die genaue Ätiologie der CED ist immer noch unklar. Man geht bisher davon aus, dass Umweltfaktoren, genetische Prädisposition, Infektionen und immunologische Dysregulation die zentralen Faktoren in der Pathogenese der CED darstellen und dass deren Zusammenwirken diese auslösen können. Verschiedene Studiendesigns werden verwendet, um Hinweise auf die Bedeutung von **Risikofaktoren** bei der Entstehung von CED zu finden. Ein häufiger Ansatzpunkt ist, aufgrund der Inzidenz der Erkrankung in bestimmten Ländern, Zusammenhänge mit möglichen Expositionen zu finden. Ein Beispiel ist die Fragestellung, ob CED vor allem in Ländern mit hohem Zucker- und Margarinekonsum auftritt (Sonnenberg, 1988). Ein erhöhtes Vorkommen dieser Darmerkrankungen konnte in industrialisierten Gesellschaften nachgewiesen werden, wobei auch die ethnische Zugehörigkeit eine Rolle spielt. CED sind bei Schwarzen in Südafrika im Vergleich zu Asiaten und Weißen erheblich seltener (Wright, 1986). Des Weiteren werden immer wieder Ernährungsfaktoren als mögliche Risikofaktoren diskutiert und untersucht, dabei gibt es aber keine gesicherten Erkenntnisse über deren Bedeutung bei der Entstehung von CED. Verhältnismäßig oft findet sich in der Literatur die Beobachtung, dass Patienten mit CED vermehrt Zucker oder zuckerhaltige Nahrungsmittel zu sich nehmen (Russel, 1998). Früchte und Ballaststoffe scheinen sich eher positiv auf die Darmflora auszuwirken. In älteren Studien konnte jedoch kein positiver Effekt einer zuckerreduzierten, ballaststoffreichen Kost festgestellt werden (Ritchie, 1987). Nachdem sich CED besonders häufig im Jugendalter manifestiert, werden auch immer wieder Kindheitsfaktoren als Risikofaktoren untersucht. Vor allem die in der frühen Kindheit erfolgte Prägung des Immunsystems bei genetisch prädisponierten Personen scheint eine Rolle zu spielen. Einige Untersuchungen sprechen für einen protektiven Effekt

des Stillens gegenüber der späteren Entwicklung einer CED (ACHESON, 1961; Corrao, 1998; Rigas, 1993). Auch den frühkindlichen Infektionen wird eine gewisse Bedeutung zugesprochen, denn des öfteren wurde beobachtet, dass MC-Patienten vermehrt unter überdurchschnittlich guten sanitären Verhältnissen aufwuchsen (Duggan, 1998; Gent, 1994). Daraus ergab sich die Hypothese, dass frühkindliche enterische Infektionen durch die verbesserten hygienischen Bedingungen vermieden oder aufgeschoben werden. Bei späteren Infektionen reagiert das Immunsystem dann bei entsprechend prädisponierten Patienten inadäquat. Ein vermindertes Risiko für CU konnte gezeigt werden, wenn im Kindes- oder Jugendalter eine Appendektomie vorgenommen wurde (Koutroubakis, 2000). Ein weiterer, mehrfach beschriebener Risikofaktor vor allem für MC ist das Rauchen. Ein etwa auf das Zweifache erhöhtes Risiko von Rauchern, an MC zu erkranken, wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Calkins, 1989). Bezüglich CU konnte nur ein erhöhtes Risiko bei Exrauchern gezeigt werden, nicht jedoch bei noch aktiven Rauchern. Je mehr geraucht wurde, desto höher war das Erkrankungsrisiko nach der Entwöhnung. Im ersten Jahr nach dem Aufhören des Rauchens war das Risiko an CU zu erkranken am höchsten und schien mit zunehmender nikotinfreier Zeit zu sinken (Corrao, 1998). Die Annahme, dass bestimmte psychische Faktoren die Ausprägung einer CED begünstigen könnten, ist immer noch weit verbreitet, wurde aber nie durch eine konkrete Studie belegt (Enck, 1996).

Der **Verlauf** der CED ist schubartig, dabei können eine Vielzahl von Komplikationen auftreten (häufige Operationen, langfristige Immunsuppression, Ausbildung lebensbedrohlicher Folgeerkrankungen wie Kolonkarzinom). Bei 18 - 22% der Patienten mit MC oder CU folgt im Anschluss an die Erstmanifestation eine mehrjährige Remission. Während eines beliebigen Jahres erleben im Schnitt etwa 20 - 30% der Patienten einen hochentzündlichen Schub, etwa 50% befinden sich in stabiler Remission. Bei 20 - 30% ist die Erkrankung auf niedrigem Niveau aktiv (Langholz, 1994; Munkholm, 1995). Insgesamt wird der Verlauf bei MC etwas schwerer beschrieben als bei CU. Operationsraten und medikamentöse Therapie gehen zunehmend als prognostisch bedeutsamer Endpunkt in Studien ein. Bei CU beträgt die Kolektomierate bis zu 45% nach 25 Jahren (Leijonmarck, 1990), bei MC liegt die Operationsrate nach 20 Jahren dagegen bei über 80% (Bernell, 2000). Etwa 30 - 58% der Patienten benötigen Glukokortikoide, dabei treten nicht unerhebliche Raten an Steroidresistenz und insbesondere Steroidabhängigkeit auf (Faubion, Jr., 2001; Munkholm, 1994).

MC kann den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen, häufig ist jedoch der **Befall** des terminalen Ileums und/ oder des Colons (Farmer, 1975). Während bei CU-Patienten im Wesentlichen das Rektum/ Colon betroffen ist, besonders häufig (95% der Patienten) das Rektum (Podolsky, 2002). Die **Leitsymptome** einer CED sind Durchfall und Bauchschmerzen. Weitere klinische Symptome wie Gewichtsverlust, perianale Blutungen

und Läsionen, Fisteln und Fieber treten je nach Befallsmuster mehr oder weniger häufig auf (Steinhardt, 1985). Generell ist das Ausmaß der Beschwerden individuell sehr unterschiedlich und wird durch die Schwere der Darmentzündung, das Befallsmuster und intestinale Komplikationen beeinflusst. CU ist eine Erkrankung der Colonmucosa, im Gegensatz zum alle Darmwandschichten befallenden MC. Durch die Zerstörung der Schleimhaut bei CU können sich Blut, Schleim und Eiter dem Stuhl beimengen, die blutige oder blutig-schleimig-eitrige Diarrhö gilt daher als Leitsymptom der CU-Erkrankung (Rao, 1988).

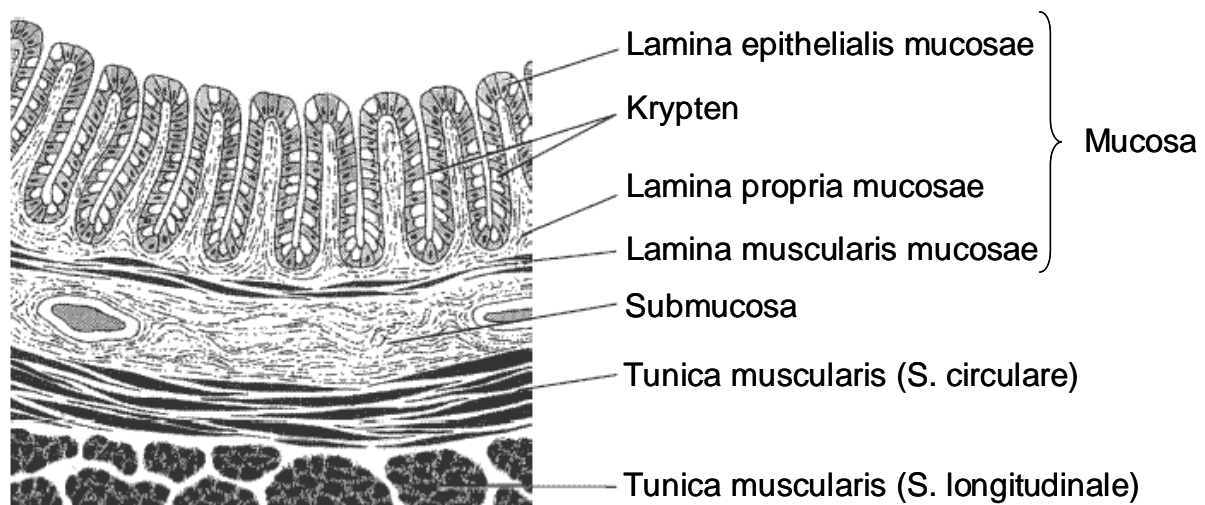


Abbildung 1-1: **Aufbau der Darmwand**

Neben Umweltfaktoren gilt eine **genetische Prädisposition** als zentraler Faktor in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Während die Erforschung der Genetik des MC bereits weit fortgeschritten ist, stehen Untersuchungen zur CU in diesem Bereich noch am Anfang. Die Grundlage der genetischen Studien der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die immer wieder dokumentierte familiäre Häufung (bei ca. 10% der Patienten) (Orholm, 1991). Der molekulare Vergleich von erkrankten Geschwisterpaaren erlaubt durch „Kopplungsanalyse“ die Identifikation von Regionen im menschlichen Genom, in denen hochwahrscheinlich Krankheitsgene lokalisiert sind (Lander, 1995). Solche genomweiten Studien haben bei CED neun Regionen mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit identifiziert („IBD1 - IBD9“). Die am häufigsten bestätigten Regionen wurden auf Chromosom 16 („IBD1“ (Hugot, 1996; Olavesen, 2000)), Chromosom 12 („IBD2“ (Satsangi, 1996)), Chromosom 5 („IBD5“ (Rioux, 2001)) und Chromosom 6 („IBD3“ (Hampe, 1999)) mit hinreichender statistischer Sicherheit in verschiedenen Populationen gefunden. Ein Durchbruch war 2001 die Identifikation des ersten Krankheitsgens in der Kopplungsregion „IBD1“ auf Chromosom 16q (Hampe, 2001; Hugot, 2001; Ogura, 2001). Drei Varianten im NOD2-Gen (neue Nomenklatur: CARD15) sind in hohem Maß mit dem

Auftreten des MC assoziiert. Dabei ist der wesentliche Risikoträger eine C-Insertion im Exon 11, die durch Verschiebung des Leserahmens zu einem Abbruch des Proteins im Leucinreichen Teil während der Translation führt. Sowohl homozygote Träger als auch Heterozygote sind in hohem Maße dazu veranlagt, einen MC zu entwickeln. Das Risiko liegt ca. 30- bis 100-fach über dem der Normalbevölkerung (Hampe, 2002). Diese Erkenntnisse in der molekularen Genetik führten sehr schnell auch zu **pharmakogenetischen Studien**. Auffällig bei CED ist die Tatsache, dass aus einer Kohorte von phänotypisch nicht unterscheidbaren Patienten nur 30 - 60% auf eine Therapie ansprechen. Eine Assoziation zwischen den mit dem MC ätiologisch relevanten Varianten im NOD2-Gen und einer Therapieantwort auf eine anti-TNF-Therapie (Infliximab) wurde in zwei Studien überprüft (Hanauer, 2002; Mascheretti, 2002; Nikolaus, 2000). In beiden Studien mit unabhängigen Kohorten konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen NOD2-Varianten und dem Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie gezeigt werden.

Neben Umweltfaktoren und einer genetischen Prädisposition spielt die **immunologische Dysregulation** in der intestinalen Mucosa eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Schleimhäute wie die Oberfläche des Gastrointestinaltraktes sind besondere Grenzflächen für die Auseinandersetzung des Wirtes mit seiner Umwelt und besitzen ein für diese Aufgabe spezialisiertes Immunsystem mit strukturellen und funktionellen Charakteristika. Das GALT (=“gut-associated lymphoreticular tissue“) des Menschen besteht aus einem integrierten Netzwerk von nicht-lymphatischen (v.a. Darmepithelzellen) und lymphatischen Geweben. Unter den lymphatischen Geweben des GALT sind mesenteriale Lymphknoten (mLN), die Peyerschen Plaques/ Patches (PP) des Dünndarms, die sich direkt unter einem spezialisierten Darmepithel befinden, und die Lymphfollikel des Dickdarms von besonderer Bedeutung (Janeway, 2002).

Durch seinen anatomischen Aufbau aus Falten, Zotten und Mikrovilli besitzt der Darm eine Oberfläche von ca. 300 m². Das intestinale Immunsystem gilt als das größte Immunorgan des menschlichen Organismus. Der Darm enthält mehr als die Hälfte aller lymphatischen Zellen und ca. 80% aller Immunglobulin-produzierenden Zellen des Körpers. Die natürliche Darmflora und die Nahrung stellen ein immenses Antigenreservoir dar, dem gegenüber das intestinale Immunsystem zum Schutz des Organismus eine Hyporeaktivität aufweisen muss. Gleichzeitig muss das intestinale Immunsystem jedoch in der Lage sein, auf krankmachende Antigene im Darmlumen mit einer effektiven Antikörper- und zellvermittelten Immunreaktion zu antworten, ohne eine den Organismus ebenfalls schädigende systemische Entzündung auszulösen. Genau diese Voraussetzungen eines funktionierenden Immunsystems im Darm sind bei CED nicht mehr gewährleistet. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die „orale Toleranz“, die definiert ist als antigenspezifische Unterdrückung einer systemischen Immunantwort nach oraler Antigenverabreichung (Marth, 1999). Dabei sind einige

regulatorische Mechanismen von Bedeutung: die Antigene werden über M-Zellen aus dem Darmlumen aufgenommen und den naiven T-Zellen hauptsächlich von Dendritischen Zellen präsentiert. Man geht davon aus, dass die Ausbildung der T-Zell-Toleranz durch eine unzureichende Kostimulation zustande kommt. Suppressorzellen, die antiinflammatorische Substanzen wie TGF- β produzieren, kommt eine zentrale Funktion zu. Spezifische T-Zell-Populationen geraten in einen Zustand der Anergie (klonale Anergie) oder werden durch Apoptose eliminiert (klonale Deletion). Ein mögliches Therapieprinzip bei autoimmunen Erkrankungen wie CED ist die Induktion fehlender oraler Toleranz durch orale Gabe von Antigen (Miller, 1991).

Im folgenden Abschnitt soll die **Immunologie der CED** näher betrachtet werden. In Hinblick auf die sehr komplexe Natur des intestinalen Immunsystems und seiner vielfältigen Aufgaben ist es offensichtlich, dass dieses System hoch empfindlich gegenüber Störungen ist. Die klinische Manifestation der CED ist eine Folge des gestörten Wechselspiels zwischen Wirt und Umwelt an der mucosalen Grenzfläche des Intestinums. Begünstigt durch eine unzureichende Aktivierung antiinflammatorischer Mechanismen bzw. durch ein Überwiegen von proinflammatorischen Faktoren kommt es zu einer ständigen Aktivierung des mucosalen Immunsystems. Die akute und chronische Entzündung des Darms geht mit einer Aktivierung der T-Zellen in der Lamina propria einher, die unter anderem zu einer gesteigerten Zytokinproduktion führt. Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen MC und CU. CD4⁺ T-Zellen beim MC produzieren vor allem die proinflammatorischen Th1-Zytokine TNF und IFN- γ (Fuss, 1996; Plevy, 1997). Bei CU ist die Produktion von IFN- γ nicht erhöht, dagegen die von IL-5. MC wird daher oft als eine Th1-vermittelte Erkrankung beschrieben, eine Einordnung von CU als Th2-vermittelt ist allerdings nicht eindeutig möglich, da das Zytokin IL-4 bei CU vermindert ist. Generell ist nicht bei allen Patienten eine so strikte Trennung zwischen Th1- und Th2-Schiene zu vereinbaren, da sich die Zytokinmuster auch oft überschneiden. Für eine ganze Reihe von Zytokinen sind Veränderungen im Expressionsmuster bei CED beschrieben. Eine besonders pathogene Rolle konnte für IL-12, IL-18, IL-6 und TNF nachgewiesen werden. Das vor allem von Makrophagen produzierte IL-12 wurde signifikant erhöht in MC-Patienten gefunden (Monteleone, 1997). IL-12 induziert eine Th1-Zelldifferenzierung, wie sie bei MC vorliegt. Darüber hinaus führte in einigen Colitis-Tiermodellen eine Behandlung mit anti-IL-12-Antikörpern zu einer Reduktion der Entzündung (Fuss, 1999; Neurath, 1995). Eine synergistische Rolle für die Th1-Differenzierung spielt das vor allem von intestinalen Epithelzellen produzierte IL-18, das die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B in T-Zellen aktiviert. Blockade der IL-18-Expression unterdrückt die Entwicklung einer Th1-vermittelten Colitis im Mausmodell (Wirtz, 2002).

Ein weiteres, viel beschriebenes Zytokin in diesem Zusammenhang ist IL-6. Lamina propria-T-Lymphozyten sowohl von MC- als auch von CU-Patienten produzieren sehr viel mehr IL-6

als die von Kontrollpatienten (Atreya, 2000). Dabei zeigten Lamina propria-T-Zellen aus MC-Patienten eine Apoptoseresistenz durch eine starke Aktivierung antiapoptotischer Gene wie bcl-2 und bcl-cl. Diese Apoptoseresistenz konnte *in vitro* durch die Blockade der IL-6-Signaltransduktion mit Hilfe eines Antikörpers gegen den IL-6-Rezeptor aufgehoben werden. Der Effekt der IL-6-Blockade konnte in verschiedenen experimentellen Colitis-Modellen bestätigt werden.

Des weiteren gehört TNF zu den am besten untersuchten Zytokinen bei den CED. Eine ganze Reihe von klinischen und experimentellen Hinweisen belegen eine zentrale Rolle von TNF in der Pathogenese der CED, vor allem bei MC (Holtmann, 2002). Diese Hinweise ließen sich ebenfalls in tierexperimentellen Colitis-Modellen reproduzieren (Neurath, 1997). Die Aktivierung des TNF-Rezeptor II (TNFRII) führt zum Beispiel zur NF κ B-vermittelten Hochregulation proinflammatorischer Zytokine und zur Hemmung der Apoptose. Bei MC-Patienten wurde eine verminderte Apoptoserate der Lamina propria-T-Lymphozyten gezeigt. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine erhöhte Dichte von TNF-exprimierenden Makrophagen bei MC- und CU-Patienten nachgewiesen werden. Diese Makrophagen neigten in der Submucosa zur Aggregation entlang der Gefäße mit verstärkten Infiltrationen. Der bekannte prothrombotische Effekt von TNF auf Endothelzellen wird ebenfalls als einer der möglichen Pathomechanismen für die Genese des MC betrachtet. Außerdem führt TNF zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin, wodurch die entzündliche Infiltration unterstützt wird. Auch endogene Matrix-Metalloproteinasen, die das Darmepithel schädigen, werden durch TNF aktiviert.

Zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen des intestinalen Immunsystems gehören IL-10 und TGF- β . Die Rolle von IL-10 für die intestinale Homöostase wird in IL-10-defizienten Mäusen deutlich, die unter nicht keimfreien Bedingungen spontan eine Colitis entwickeln (Kuhn, 1993). Die verstärkte Expression von IL-10 hat in verschiedenen Colitis-Modellen einen deutlichen therapeutischen Effekt (Barbara, 2000; Van Montfrans, 2002). Der eindrückliche Phänotyp der IL-10-defizienten Maus hat dazu geführt, die Rolle von IL-10 in der Pathogenese der CED zu untersuchen, diese Ergebnisse waren aber insgesamt negativ. So haben Untersuchungen ergeben, dass die IL-10-Expression in Makrophagen der Submucosa von entzündeten Darmabschnitten bei MC und CU stark erhöht war (Autschbach, 1998). Klinische Studien mit rekombinantem IL-10 an insgesamt 800 Patienten mit MC zeigten ebenfalls keinen signifikanten therapeutischen Effekt (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000). Eine eindeutige Rolle von IL-10 für die Pathogenese der CED beim Menschen ist bislang nicht belegt, was zeigt, dass im Einzelfall die Ergebnisse aus dem Tiermodell nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Die wichtige Rolle von TGF- β als Gegenregulator der Th1- und Th2-Antwort lässt ebenfalls eine Rolle von TGF- β in der Pathogenese der CED vermuten, auch wenn Patienten mit CED keine veränderten

Serumspiegel an TGF- β aufwiesen (Sturm, 2000). Bei intestinalen Myofibroblasten von Patienten mit MC konnte jedoch ein anderes Expressionsmuster von TGF- β -Isoformen gezeigt werden als in der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem wurde bei diesen Zellen eine verstärkte Proliferation festgestellt (McKaig, 2002). Daraus wurde die Vermutung abgeleitet, dass TGF- β in erster Linie an der Fibrosierung bzw. Vernarbung im Rahmen der chronischen Entzündung beteiligt zu sein scheint. Bei Patienten mit CED ist Smad7, ein Inhibitor von TGF- β , stark hochreguliert und blockiert somit die antiinflammatorische Wirkung von TGF- β (Monteleone, 2001). Im Oxazolone-Modell, das als Th2-vermittelte Colitis angesehen werden kann, führte die Induktion der Colitis zu einer starken Überexpression von TGF- β , wobei eine anti-TGF- β -Behandlung die Colitis verschlimmerte (Boirivant, 1998). In einem sehr interessanten experimentellen Ansatz konnte die Entzündung im Colitis-Modell durch intranasale Applikation von TGF- β -Plasmid gebessert werden, wobei in diesen Mäusen tatsächlich eine vermehrte TGF- β -Expression in Lamina propria-mononukleären Zellen nachweisbar war (Kitani, 2000). Die antiinflammatorische Wirkung wurde hier durch die Hemmung von IL-12 und IFN- γ vermittelt.

Ein für die Pathogenese von CED ebenso wichtiger proinflammatorischer Faktor ist NF κ B (Schmid, 1998). NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in nicht-aktivierten Makrophagen und T-Zellen im Cytosol als inaktives Heterodimer aus einer p50- und einer p65-Untereinheit vorliegt, gebunden an das inhibitorische I κ B. Die Stimulation der Zelle führt dazu, dass I κ B durch das Enzym I κ B-Kinase abgebaut wird und NF κ B freisetzt. Das NF κ B-Heterodimer wandert in den Zellkern und aktiviert durch direkte Interaktion mit der Promotorregion die Transkription verschiedener proinflammatorischer Gene wie TNF, IL-1, IL-6 und IL-12. Die zentrale Rolle von NF κ B wird dadurch unterstrichen, dass viele der etablierten Behandlungsstrategien der CED an der Hemmung von NF κ B ansetzen. Während Salicylate die I κ B-Kinase hemmen, induzieren Glukokortikoide einerseits die I κ B-Synthese, andererseits hemmen sie NF κ B direkt im Zellkern durch Komplexierung (Yin, 1998).

Nachweislich spielen auch Makrophagen eine große Rolle in der Pathophysiologie von CED. Makrophagen fungieren als antigenpräsentierende Zellen und stimulieren durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 die T-Zell-Aktivität (Hanauer, 2006). Gerade diese von Makrophagen produzierten Zytokine weisen spezifische, pathologisch veränderte Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene in CED-Patienten auf. Die lokale Synthese von Proteasen, Sauerstoffradikalen, Stickoxiden und Leukotrienen sind ebenfalls Funktionen der Makrophagen, die in der Lamina propria von MC- und CU-Patienten gesteigert sind und zur Gewebeschädigung beitragen.

Auch Darmepithelien sind nicht nur eine mechanische Barriere gegenüber pathogenen Faktoren aus dem Darmlumen, sie spielen ebenfalls eine aktive Rolle im intestinalen

Immunsystem. Sie produzieren eine ganze Reihe von regulatorischen Zytokinen wie IL-10, IL-6, IL-7, IL-15 sowie Faktoren wie TGF- β und Prostaglandin E₂. Bei den CED ist CD14 auf den Epithelzellen hochreguliert, wodurch bakterielles LPS eine starke Signalaktivität über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) auslösen kann (Cario, 2000). Unmittelbar vor und während eines Schubes von MC oder CU lässt sich eine erhöhte Permeabilität der intestinalen Barriere für Makromoleküle feststellen (Wyatt, 1993). Man nimmt an, dass dies Folge einer Epithelschädigung durch die Entzündungsreaktion ist. Th1-Zytokine können z.B. Matrix-Metalloproteinasen aktivieren, die das Darmepithel schädigen. Dies führt dazu, dass vermehrt luminale Antigene der Darmflora oder der Nahrung in die Lamina propria eindringen können. Die daraus resultierende massive Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen führt zu einer starken Ausreifung mit Hochregulation der Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle und MHC-Klasse-II-Moleküle (Cella, 1997). Dadurch ergibt sich eine bevorzugte Bindung an den B7-Rezeptor CD28 auf den T-Helferzellen (Finkelman, 1996) mit anschließender starker Stimulierung zur Proliferation und Zytokinproduktion. Die Störung der intestinalen Barriere trägt somit wahrscheinlich dazu bei, dass luminale Antigene die Aktivierung des intestinalen Immunsystems unterhalten und eine Chronifizierung der Entzündung begünstigen. In direkter Beziehung zur Störung der intestinalen Barriere steht die Rolle von mikrobiellen Faktoren. Seit langem wird beim MC eine Infektion mit *Mycobacterium paratuberculosis* und dem Masernvirus diskutiert, die Datenlage ist jedoch widersprüchlich (Sartor, 1997). Die Wirksamkeit der antiinflammatorischen Therapien spricht tendenziell gegen eine direkte infektiöse Ursache des MC. Außerdem scheint ein geringer Hygienestatus in der Kindheit vor der Krankheit zu schützen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich in der Mucosa von Patienten mit CED hohe Konzentrationen fäkaler Bakterien mit bakteriellen Einschlusskörperchen in den Epithelzellen befinden, die mit dem Schweregrad der Entzündung korrelieren (Swidsinski, 2002). Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass in Gesunden eine verminderte Reaktivität des intestinalen Immunsystems auf die eigene Darmflora besteht, diese Toleranz beim MC aber durchbrochen ist (Duchmann, 1995). Auch tierexperimentell ist die pathogenetische Bedeutung der Darmflora gut belegt. In verschiedenen Tiermodellen, wie zum Beispiel der IL-10-defizienten Maus, kommt es nur zur Manifestation der Colitis, wenn die Tiere sich in ihrem normalen mikrobiellen Milieu befinden (Kuhn, 1993). Daraus ergab sich die Vorstellung, dass nicht ein bestimmtes mikrobielles Pathogen im Sinne einer Infektion eine Rolle spielt, sondern eine Hyperreaktivität des intestinalen Immunsystems gegenüber der Darmflora. Die Ergebnisse zum Einsatz von Probiotika sprechen allerdings dafür, dass es auch protektiv wirkende Bakterienpopulationen in der Darmflora gibt. Bei der IL-10-defizienten Maus konnten beispielsweise Laktobazillen die intestinale Entzündung abschwächen (Madsen, 1999).

Eine Vielzahl von **Tiermodellen** für CED wird in der Literatur beschrieben (Wirtz, 2000). Auch wenn keines dieser Modelle MC oder CU im Detail imitiert, erlauben sie doch die Untersuchung von bestimmten klinischen, histopathologischen und immunologischen Aspekten. Spezielle gentechnisch hergestellte Tiere sind geeignete Werkzeuge, um die Rolle bestimmter pro- und antiinflammatorischer Faktoren dieses komplexen homöostatischen Gleichgewichts des Immunsystems aufzudecken. Die neuen immunmodulatorischen Therapieansätze wurden in Tiermodellen getestet und weiterentwickelt.

Besonders häufig verwendete Modelle mit einem beschriebenen Th1-Profil sind das TNBS-Modell („2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid“), die bereits erwähnte IL-10-defiziente Maus, das adoptive Zell-Transfer-Modell und das DSS-Modell („dextran sulfate sodium“). TNBS, das einmal rektal appliziert wird, wirkt als Hapten und induziert in geeigneten Maus- oder Rattenstämmen Colitis (Dohi, 1999; Morris, 1989; Yamada, 1992). Ungefähr 3 - 7 Tage nach Behandlung zeigen die Tiere Gewichtsverlust, Durchfall und eine Entzündung des Dickdarms. IL-10-defiziente Mäuse entwickeln in einem nicht keimfreien Milieu eine spontane Colitis (Kuhn, 1993). Im adoptiven Transfer-Modell wird eine bestimmte Subpopulation von CD4⁺ T-Lymphozyten (CD4⁺CD45RB^{high} oder CD4⁺CD62L⁺) aus der Milz von Spendermäusen isoliert und in immundefiziente Empfängermäuse transferiert (Powrie, 1993). Wird diese Population von CD4⁺ T-Lymphozyten in SCID-Mäuse oder RAG-defiziente Mäuse transferiert, die keine T- und B-Lymphozyten besitzen, entwickeln diese Empfängermäuse eine Colitis. Dabei wird angenommen, dass CD4⁺CD45RB^{high} oder CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen im Darmmilieu nach Kontakt mit bakteriellen Antigenen bevorzugt zu Th1-Zellen differenzieren. In der erstmaligen Beschreibung des DSS-Modells wurde durch Behandlung mit 3 - 10% DSS im Trinkwasser über 6 - 10 Tage in BALB/c-Mäusen eine akute Colitis induziert (Okayasu, 1990). Histologisch kommt es zu einer Epithelschädigung, zum fokalen Untergang von mucosalen Krypten und zur Infiltration von Entzündungszellen. Pathogenetisch spielen aktivierte Immunzellen, vor allem Makrophagen, die das DSS in der Mucosa des Dickdarms phagozytieren, und Entzündungsmediatoren eine Rolle. Eine chronische Colitis wurde mit fünf 7-tägigen 5%igen DSS-Zyklen mit behandlungsfreien Pausen von zehn Tagen induziert.

Als Th2-Modelle sind die Oxazolone-Colitis, die T-Zellrezeptor-defiziente Maus sowie die IL-7-transgene Maus beschrieben. Oxazolone ist, ähnlich wie TNBS, ein haptenisierendes Reagenz, das rektal verabreicht wird und eine T-Zellantwort induzieren kann (Boirivant, 1998; Ekstrom, 1998). Die Entzündung ist kontinuierlich und auf die Mucosa begrenzt, mit Epithelzellverlust, Ulcerationen und Ödemen in der Submucosa. Die Lamina propria-T-Zellen zeigen ein Th2-Zytokinprofil. Mutationen von einzelnen T-Zell-Rezeptor-Ketten wie die α -Kette oder die β -Kette sowie Mutationen des MHC-II-Moleküls der Maus führten ebenfalls zur Entwicklung einer Colitis mit einem Th2-Zytokinprofil (Mombaerts, 1993). Als weiteres Modell

wurden IL-7-transgene Mäuse untersucht, die nach 4 - 12 Wochen spontan eine chronische Colitis entwickelten, die histopathologisch CU ähnelte (Watanabe, 1995; Watanabe, 1998). Die IL-7-Produktion war ebenfalls in der Anfangsphase der Colitis stark erhöht und anschließend erniedrigt. Aufgrund der Promotorspezifität des IL-7-Transgens in diesem Modell waren die Lamina propria-T-Lymphozyten der Ort der IL-7-Produktion und nicht, wie in CU, die Epithelzellen. Dennoch konnte das Modell die mögliche proinflammatorische Rolle von IL-7 in CU bestätigen.

Die Analyse der Pathogenese der CED auf molekularer Ebene hat die Entwicklung neuer innovativer Behandlungsformen ermöglicht (Holtmann, 2001). Strategien sind dabei die Verabreichung von antiinflammatorischen Effektormolekülen, die Antagonisierung von proinflammatorischen Effektormolekülen bzw. die Blockade ihrer Rezeptoren durch konventionelle Pharmaka oder rekombinante monoklonale Antikörper. Auch die Regulation auf transkriptioneller Ebene mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden oder adenoviralem Gentransfer wird viel beforscht. In Punkt 1.2 werden einige dieser neuen Behandlungsansätze erläutert.

1.2 Neue Therapieansätze bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die herkömmliche Therapie von MC- und CU-Patienten besteht in der Verabreichung von systemischen Glukokortikoiden (Prednisolon, Prednison, Methylprednisolon), topischen Glukokortikoiden (Budesonid, Betamethason, Hydrocortison), Aminosalicylaten (Sulfasalazin, Mesalazin, Olsalazin, Balsalazin) und Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, Ciclosporin, Tacrolimus, Mycophenolatmofetil) (Isaacs, 2005).

Da einige der Patienten schlecht auf diese Therapien ansprechen bzw. viele der Substanzen ein erhebliches Spektrum an Nebenwirkungen aufweisen, ist man stetig bemüht, neue Medikamente zu finden und zu testen, die der intestinalen Entzündung spezifischer und selektiver entgegenwirken und die besser verträglich sind. Die herkömmlichen Substanzen beschränken sich überwiegend auf eine unspezifische Bekämpfung der entzündlichen Prozesse. Nachdem in den letzten Jahren Erkenntnisse um die Pathophysiologie der CED erheblich zugenommen haben, ist es nun möglich, in ganz bestimmte immunologische Vorgänge im Darm einzugreifen, die die Entzündung voran treiben.

Eine der wichtigsten Strategien dabei ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern. Die Herstellung monoklonaler Antikörper wurde erstmals von G. Köhler und C. Milstein beschrieben, die Milzzellen einer immunisierten Maus mit Mausmyelom-Zellen fusionierten (Kohler, 1975). So entstanden Hybridomzellen, die sich unbegrenzt vermehren und spezifische Antikörper sezernieren. Nachdem Hybridome, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzierten, ausgewählt worden waren, wurden diese kloniert, indem man sie aus einzelnen Zellen wieder anwachsen ließ. Da sich jedes Hybridom als Klon von einer einzigen B-Zelle ableitet, besitzen alle erzeugten Antikörper dieselbe Struktur, Antigenbindungsstelle und denselben Isotyp. Diese Antikörper bezeichnet man deshalb als monoklonale Antikörper. Immunsuppressive monoklonale Antikörper können auf unterschiedliche Art und Weise wirken. So genannte eliminierende Antikörper zum Beispiel verursachen eine Zerstörung von Zielzellen, indem sie diese für einen Angriff durch Makrophagen, NK-Zellen oder das Komplementsystem markieren. Andere, nicht eliminierende Antikörper blockieren die Funktion ihres Zielmoleküls, indem sie dessen biologische Aktivität hemmen (zum Beispiel bei Antikörpern gegen lösliche Zytokine) (Janeway, 2002). Das größte Problem für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern besteht darin, dass diese sich am besten mit Mauszellen herstellen lassen und Menschen schnell Antikörper gegen Maus-Antikörper entwickeln. Dadurch verlieren die therapeutischen Antikörper ihre Wirksamkeit und es kommt zu allergischen Reaktionen bis hin zu einer Anaphylaxie. Die Lösung dieses Problems gelang, als man die Methoden der Gentechnologie mit der Hybridomtechnologie kombinierte. Tauscht man auf DNA-Ebene die konservierten Bereiche des murinen monoklonalen Antikörpers durch die entsprechenden Bereiche des humanen Antikörpers aus, steigt die

Verträglichkeit ohne Verlust der Selektivität an (Vollmar, 2005). Somit entstehen chimäre (33% Mausprotein) oder humanisierte Antikörper (10% Mausprotein). Auch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die vollständig menschlichen Ursprungs sind, ist inzwischen mit einer Phagen-Display-Bibliothek möglich.

Diese Fortschritte in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern haben mittlerweile zu einer großen Vielfalt an therapeutisch genutzten Antikörpern geführt. Haupteinsatzgebiete sind dabei die Therapie nach Organtransplantationen, die Tumorthherapie und die Therapie von Autoimmunerkrankungen wie MC, CU, Multiple Sklerose (MS) und Rheumatoide Arthritis (RA). Viele dieser Antikörper befinden sich zur Zeit noch in klinischen Studien.

Einer der ersten zugelassenen monoklonalen Antikörper ist Infliximab, ein chimärer Antikörper gegen TNF. Er wurde 1999 zugelassen, inzwischen für die Indikationen MC, RA und Ankylosierende Spondylitis. Infliximab besteht aus 75% humanem Protein und zu 25% aus Mausprotein. Er bindet sowohl lösliches als auch membranständiges TNF mit hoher Affinität und blockiert damit dessen biologische Aktivität durch Neutralisierung, durch Lyse von aktivierten TNF-produzierenden Immunzellen und durch Apoptose-Induktion in aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten (Scallon, 1995; ten Hove, 2002). Die Neutralisierung von TNF hemmt unter anderem auch die Ausschüttung von weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IFN- γ . Durch verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin wird der Eintritt von Leukozyten ins Gewebe gebremst (Shen, 2004). Auch die TNF-vermittelte Aktivierung endogener Matrix-Metalloproteinasen, die das Epithel schädigen, wird herabgesetzt. Infliximab wird beim MC erfolgreich eingesetzt, wenn eine Therapie mit Glukokortikoiden oder Immunsuppressiva den Zustand der Patienten nicht bessert. Seit einigen Jahren laufen umfangreiche Studien zum Einsatz von Infliximab in der CU, mit überwiegend sehr positiven Ergebnissen. Durchwegs sprechen ca. zwei Drittel der CU-Patienten auf die anti-TNF-Therapie an (Chey, 2001; Katz, 2005; Shen, 2004).

Nachdem TNF an einer so großen Vielfalt an immunologischen Vorgängen beteiligt ist, ist es nicht verwunderlich, dass die anti-TNF-Therapie auch mit Problemen verbunden sein kann. Inzwischen gibt es mehrere Berichte über das Ausbrechen einer Tuberkulose unter der Therapie mit Infliximab (Crum, 2005). Die meisten Tuberkulosefälle traten innerhalb der ersten 3 bis 6 Monate der Behandlung auf, das heißt, dass viele Patienten latent bereits infiziert waren. Diese Zwischenfälle haben zu Warnhinweisen der Behörden geführt. Vor Beginn einer anti-TNF-Therapie muss eine Tuberkulose-Infektion nun ausgeschlossen werden. Auch bei einem MC mit akut eitrigem Fisteln darf die Therapie erst eingeleitet werden, nachdem eine mögliche Infektionsquelle ausgeschlossen wurde. Außerdem sind in der Literatur vermehrt Fälle von bakteriellen Infektionen mit den typischen Keimen wie *Streptococcus* und *Staphylococcus*, aber auch mit *Listeria monocytogenes* und *Legionella*

pneumophila unter anti-TNF-Therapie beschrieben. Auch Pilzinfektionen (*Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus* und *Candida*) werden gehäuft beobachtet. Mittlerweile gibt es schon weitere TNF-Inhibitoren, bei denen in erster Linie die Verträglichkeit verbessert wurde, die sich entweder noch in klinischen Studien befinden bzw. für bestimmte Indikationen bereits zugelassen sind. Darunter sind ein Fusionsprotein, Etanercept (TNFR2-Ig), das sowohl TNF als auch Lymphotoxin (LT) neutralisiert. Weiterhin sind Onercept (humaner, löslicher TNFR1), Certolizumab pegol (pegyliertes Fab-Fragment eines humanisierten, monoklonalen anti-TNF-Antikörpers), Adalimumab (vollständig humaner monoklonaler IgG-Antikörper gegen TNF) und CDP 571 (humanisierter anti-TNF-Antikörper) in der Literatur beschrieben (Ardizzone, 2005). Ein Teil der Genannten befinden sich derzeit in klinischen Studien mit MC-Patienten.

Ein weiterer Ansatz in der Therapie von CED ist die Blockade des IL-6-Rezeptors. Wie in Punkt 1.1 bereits erwähnt, gehört auch IL-6 zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen, die die intestinale Entzündung voran treiben. Daher wurde ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den humanen IL-6 Rezeptor (Tocilizumab) entwickelt, der in Studien mit MC- und RA-Patienten, sowie bei Patienten mit systemischer juveniler idiopathischer Arthritis (sJIA) erfolgreich getestet wird (Mihara, 2005; Nishimoto, 2005; Woo, 2005). Der Antikörper wurde bisher gut vertragen und die Symptome der entzündlichen Prozesse aller drei Autoimmunerkrankungen verbesserten sich. Tocilizumab neutralisiert die Wirkung von IL-6 über den membranständigen und den löslichen IL-6-Rezeptor. Bei unbehandelten Patienten mit sJIA wurden bereits erhöhte Serumspiegel an IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor gefunden. IL-6 bindet normalerweise an den IL-6-Rezeptor, dieser Komplex bindet dann an gp130, welches aktiviert wird. Diese Aktivierung findet unter Tocilizumab-Therapie nicht statt (Yokota, 2005). Bei einer Studie mit MC-Patienten konnte die intestinale Entzündung signifikant verbessert werden, indem die Expression von Adhäsionsmolekülen unterdrückt wurde. Außerdem wurde in den Lamina propria-T-Zellen Apoptose induziert.

Auch ein rekombinanter, humanisierter monoklonaler Antikörper gegen IFN- γ (Fontolizumab) wird aktuell in klinischen Studien bei Patienten mit mittel- bis schwergradig aktivem MC getestet. Nach bisherigen Veröffentlichungen zeigt der Antikörper ausgezeichnete Wirksamkeit und Verträglichkeit (Hommes, 2006; Reinisch, 2006). IFN- γ ist eines der potentesten Zytokine mit einer Fülle von immunregulatorischen Funktionen (Boehm, 1997). IFN- γ kann eine ganze Reihe von Immunzellen aktivieren, zum Beispiel Makrophagen, Endothelzellen und Lymphozyten, und spielt eine Schlüsselrolle bei der Induktion von MHC-II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Außerdem führt IFN- γ zu Epithelschäden mit der Entwicklung von Permeabilitätsstörungen und fördert das Einwandern von Neutrophilen durch verstärkte Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren (Colgan,

1993). Bei MC-Patienten wurden in der Mucosa erhöhte IFN- γ -Spiegel gefunden (Fuss, 1996; Niessner, 1995). Durch die Bindung des Antikörpers an IFN- γ wird die Interaktion des Zytokins mit seinem Rezeptor verhindert, wodurch die oben beschriebenen Effekte blockiert werden.

Auch Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten sind Zielstrukturen therapeutisch eingesetzter monoklonaler Antikörper, zum Beispiel die beiden anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper Basiliximab und Daclizumab. Beide binden an die α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors. Während die β - und die γ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert werden, erscheint die α -Untereinheit (CD25-Antigen) erst nach Stimulation der T-Lymphozyten. Erst wenn alle drei Untereinheiten vorhanden sind, bindet IL-2 mit hoher Affinität. Basiliximab und Daclizumab binden spezifisch an das CD25-Antigen auf aktivierten T-Zellen und verhindern dadurch die Bindung von IL-2, einem der wichtigsten Signalgeber für die T-Zell-Proliferation. Dadurch werden mit den Antikörpern nur die aktivierten T-Zellen, nicht jedoch die ruhenden T-Zellen, durch Apoptose-Induktion eliminiert (Vollmar, 2005). Basiliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, Daclizumab ein humanisierter. Beide sind im Moment zugelassen zur Prophylaxe einer akuten Transplantatabstoßung nach Nierentransplantation (Kovac, 2005; Sandrini, 2005) und befinden sich in klinischen Studien mit CU-Patienten. Basiliximab wurde bereits sehr erfolgreich an CU-Patienten getestet, die nicht auf Glukokortikoide ansprechen (Creed, 2003). Bis zu 30% der CU-Patienten sprechen kaum oder gar nicht auf eine Therapie mit Glukokortikoiden an. *In vitro*-Studien ergaben, dass diese Resistenz auf die individuellen T-Lymphozyten zurückzuführen ist (Hearing, 1999), selbst 30% völlig gesunder Probanden wiesen eine Glukokortikoid-Resistenz der T-Zellen auf. Es wird vermutet, dass IL-2 bei dieser Resistenzentwicklung eine entscheidende Rolle spielt, denn T-Zellen aus Glukokortikoid-resistenten Personen produzierten wesentlich höhere IL-2-Spiegel als T-Zellen aus Personen, die auf Glukokortikoide ansprechen (Walker, 1987). Daher wird Basiliximab, der die Wirkung von IL-2 unterdrückt, als „steroid sensitizer“ bezeichnet und wurde zusammen mit Glukokortikoiden CU-Patienten verabreicht (Creed, 2003). 80% der Patienten erreichten innerhalb 6 Wochen die Phase klinischer Remission, in Darm-Biopsien wurden niedrigere Spiegel an C-reaktivem Protein und weniger CD25⁺ T-Zellen gefunden. Nachdem nur sehr wenig Nebenwirkungen auftraten, werden die beiden anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper auch weiterhin in klinischen Studien an CU-Patienten getestet.

Ein weiterer, gegen aktivierte T-Lymphozyten gerichteter Antikörper ist Visilizumab, ein noch nicht zugelassener rekombinanter, humanisierter Antikörper, der gegen die CD3 ϵ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors gerichtet ist. Dieser Antikörper ist eine Weiterentwicklung des mäusechen anti-Human-CD3 ϵ -Antikörpers Muromomab, der bereits zur Behandlung einer akuten Glukokortikoid-resistenten Transplantatabstoßung zugelassen ist. Da es bei diesem Maus-Antikörper oft zu Verträglichkeitsproblemen durch die Bildung humaner anti-

Maus-Antikörper kam, wurde der humanisierte Antikörper entwickelt (Cole, 1999). Nach Bindung des CD3 ϵ -Antikörpers werden die T-Lymphozyten zunächst aktiviert, was zu einer Freisetzung von Zytokinen, wie TNF, IFN- γ , IL-2 und IL-6, führt („cytokine release syndrome“) und bei den Patienten zu Schüttelfrost, Durchfall, Fieber und Erbrechen führen kann (Katz, 2005). Diese T-Zell-Aktivierung wurde beim humanisierten Antikörper Visilizumab durch die Eliminierung von Fc γ -Rezeptor-Bindungsstellen weitgehend umgangen. Damit stieg die Verträglichkeit bei den Patienten deutlich an. Visilizumab induziert selektiv in aktivierten T-Zellen Apoptose und wurde bereits bei Glukokortikoid-resistenten CU-Patienten erfolgreich getestet (Katz, 2005). Nachdem bei Studien mit Transplantationspatienten bei einigen eine latente Epstein-Barr Virus- bzw. eine Zytomegalie-Virus-Infektion wieder reaktiviert wurde, werden künftig solche Patienten ausgeschlossen.

Ein weiterer Angriffspunkt monoklonaler Antikörper ist die Extravasation von T-Lymphozyten in entzündetes Gewebe. Die für diesen Vorgang essentiellen Strukturen sind Integrine, heterodimere Rezeptoren, die aus einer α_4 -Untereinheit und einer β_1 - oder einer β_7 -Untereinheit aufgebaut sind. Nachdem naive T-Zellen im Lymphknoten auf ihr Antigen getroffen sind und sich zu Effektorzellen entwickelt haben, verlassen sie den Lymphknoten und exprimieren verstärkt $\alpha_4\beta_1$ -Integrin. Dieses Integrin (auch VLA-4) bindet dabei an VCAM-1-Moleküle, die auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen induziert werden und somit die Extravasation der T-Zellen ermöglichen. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (auch LPAM-1) wird von einer Untergruppe naiver T-Zellen exprimiert und ist daran beteiligt, dass die T-Zellen in die Schleimhaut gelangen, indem es die Adhäsion durch Wechselwirkungen mit MAdCAM-1 unterstützt (Janeway, 2002). $\alpha_4\beta_7$ -Integrin wird selektiv auf bestimmten Lymphozyten des Gastrointestinaltrakts exprimiert. An CED-Patienten konnte gezeigt werden, dass die α_4 -Integrin-Expression von Lymphozyten, die sich in entzündeten Bereichen der Darm-Mucosa befanden, stark hochreguliert war (Gordon, 2002). Auch Adhäsionsmoleküle wie MAdCAM-1 oder VCAM-1 werden dort, wo sich chronische Entzündungsherde befinden, besonders stark am vaskulären Endothel exprimiert. Natalizumab ist ein rekombinanter, humanisierter Antikörper, der an die α_4 -Untereinheit dieser beiden beschriebenen Integrine bindet und somit die Lymphozyten daran hindert, den Blutstrom zu verlassen, in entzündetes Gewebe einzuwandern und das dortige Entzündungsgeschehen aufrecht zu erhalten. Natalizumab ist ein Wirkstoff der neuen Klasse der „selective adhesion molecule inhibitors“ (SAM-Inhibitoren) (Keeley, 2005). Nachdem dieser Antikörper für die Therapie der Multiplen Sklerose bereits zugelassen war, wurde er im März 2005 nach vier Monaten freiwillig wieder vom Markt genommen (Ropper, 2006), weil drei Fälle von progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie (PML), einer Entzündung des Gehirns, unter Natalizumab-Therapie bekannt wurden, die durch eine JC-Virusinfektion hervorgerufen wurden. Die Patienten waren bereits vorher infiziert, die Viren persistierten symptomlos in der Niere, und die dann

erfolgte Hemmung der Lymphozyten-Extravasation ermöglichte den Viren den Eintritt ins Gehirn. Aufgrund dieser Zwischenfälle wurden Patienten, die jemals mit Natalizumab behandelt wurden, nochmals näher untersucht. Bei mehr als 3000 untersuchten Patienten wurden bisher keine weiteren Zwischenfälle bekannt (Yousry, 2006). Natalizumab wurde auch schon an Patienten mit RA, MC oder CU getestet, und konnte überwiegend deren entzündliche Prozesse effektiv bekämpfen (Gordon, 2002; Keeley, 2005). Es fehlen allerdings noch Studien mit größeren Patientenpopulationen und zur Langzeitverträglichkeit. Daher bleibt abzuwarten, welche Erkenntnisse aus den nun laufenden umfangreichen Untersuchungen zur Sicherheit und Verträglichkeit von Natalizumab gewonnen werden. Im März dieses Jahres wurden die Studien mit Natalizumab - unter regelmäßiger Kontrolle auf eine JC-Virus-Infektion - wieder aufgenommen.

Eine mögliche, etwas spezifischer wirkende Alternative zu Natalizumab wird im Moment an CU- und MC-Patienten getestet. MLN 02 ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper der selektiv an $\alpha_4\beta_7$ -Integrin bindet. Damit wird die Hemmung der Lymphozyten-Adhäsion auf die Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts beschränkt. Vor allem bei der CU sind die bisherigen Studienergebnisse sehr viel versprechend (Ardizzone, 2005).

Ein weiterer Versuch, die Adhäsion und Extravasation von T-Lymphozyten zu hemmen, wird mit der „antisense“-Technologie durchgeführt. Alicaforsen ist ein aus 20 Basen aufgebautes „antisense-oligonucleotid“, das entwickelt wurde, um mit der ICAM-1 mRNA zu hybridisieren. Das dabei entstehende Heterodimer wird von ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen gespalten und somit inaktiviert, was zu einer verringerten ICAM-1-Produktion führt. ICAM-1 ist ein weiteres Adhäsionsmolekül, das mit $\alpha_1\beta_2$ -Integrin (auch LFA-1) auf Lymphozyten interagiert. Nachdem schon positive Ergebnisse aus einer Pilotstudie mit Alicaforsen behandelten MC-Patienten berichtet wurden, konnte dies in zwei weiteren Studien nicht mehr bestätigt werden (Schreiber, 2001; Yacyshyn, 2002). Als Grund dafür wurden zu niedrige Dosen der Behandlung angenommen, was zu weiteren, momentan laufenden Studien mit höheren Alicaforsen-Dosen führte.

Das Ziel aller bisher beschriebenen neuen Therapieansätze von CED war eine Hemmung proinflammatorischer Vorgänge. Aber auch die Verabreichung von antiinflammatorischen Effektormolekülen ist ein möglicher Ansatz einer neuartigen Therapie dieser Autoimmunerkrankungen. Wie in Punkt 1.1 bereits erläutert, wurde mit der Verabreichung von rekombinantem humanem IL-10 (rhIL-10) bei MC- und CU-Patienten bisher vergeblich versucht, signifikante, gewinnbringende Effekte zu erzielen (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000). Das Problem hierbei schien bei intravenöser bzw. subkutaner Gabe zu geringe lokale Dosen von IL-10 im Darm zu sein. In Tierexperimenten wurde daher bereits erfolgreich versucht, die IL-10-Konzentration im Darm durch orale Gabe von genetisch modifizierten *Lactococcus*-Bakterien zu erhöhen und die Entzündung im Colitis-Modell zu

reduzieren (Steidler, 2000). Dies könnte in Zukunft eine mögliche Alternative für die IL-10-Therapie bei Patienten mit CED darstellen.

Auch die Gabe von rekombinantem humanem IL-11 (rhIL-11) wird in klinischen Studien mit MC-Patienten bereits Erfolg versprechend getestet (Sands, 1999; Sands, 2002). IL-11 wird von einer ganzen Reihe von Zellen produziert und hat verschiedenste biologische Effekte. Der wohl wichtigste und bekannteste Effekt von IL-11 ist die Unterstützung der Thrombozyten-Reifung. Daher wurde rhIL-11 zunächst zur Behandlung von chemotherapierten Patienten mit Thrombozytopenie effektiv eingesetzt (Gordon, 1996; Tepler, 1996). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass IL-11 im Darm die Proliferation der Kryptenzellen nach Verletzung fördert, und die Apoptose von Enterozyten hemmen kann (Orazi, 1996). Außerdem scheint dieses Interleukin die Funktion der Makrophagen zu bremsen, indem es die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF und IFN- γ durch NF κ B-Blockade hemmt (Trepicchio, 1996). Insgesamt übt IL-11 einen protektiven Effekt auf die intestinale Mucosa aus und fördert die Barrierefunktion der Epithelzellen. Bisher konnte rhIL-11 bei MC-Patienten effektiv und gut verträglich eingesetzt werden, Patienten mit thrombotischen Ereignissen in der Vorgeschichte wurden jedoch von Anfang an aus den Studien ausgeschlossen.

Die aufgezeigten neuen Wege in der Therapie der CED bieten Chancen, diese Krankheiten gezielter, effektiver und nebenwirkungsärmer zu behandeln. Vor allem die monoklonalen Antikörper sind eine Wirkstoffgruppe mit enormer Potenz und Präzision. Derzeit sind weltweit etwa 20 monoklonale Antikörper zur Therapie zugelassen und über 70 weitere befinden sich in der fortgeschrittenen klinischen Entwicklung. Autoimmunerkrankungen und Krebs bilden dabei die wichtigsten Indikationsgruppen. Auch der kombinierte Einsatz von monoklonalem Antikörper mit einem klassischen Medikament wie Methotrexat ist bei vielen Patienten mit Autoimmunerkrankungen um ein Vielfaches wirksamer als jede herkömmliche Monotherapie. Wie gezeigt, laufen auch diese Therapien nicht ganz nebenwirkungsfrei ab. Nachdem das Risiko der Antikörperbildung gegen die therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörper durch Humanisierung bzw. durch die Herstellung vollständig humaner Antikörper stark minimiert wurde, bleibt nach wie vor das Risiko der Infektionen. Daher wäre es sinnvoll, Patienten vor Therapiebeginn auf das Vorhandensein bestimmter Infektionen zu testen, die Infektionen dann zunächst - falls möglich - zu behandeln oder diese Patienten einfach von der Therapie mit monoklonalen Antikörpern auszuschließen. Ein weiteres Problem ist der Kostenfaktor. Die Massenproduktion in gleichbleibender GMP-Qualität ist aufwändig und teuer, was sich auch in den Kosten für die Therapie widerspiegelt. Es bleibt also abzuwarten, welchen Stellenwert die monoklonalen Antikörper und weitere „Biotech-Arzneimittel“ in Zukunft in der Behandlung der Patienten einnehmen werden.

1.3 Das Lymphotoxin/ Lymphotoxin- β -Rezeptor-System

Die Mitglieder des Lymphotoxin/ Lymphotoxin- β -Rezeptor-Systems sind ein Bestandteil der TNF/ TNFR-Superfamilie, einer komplexen Familie von Liganden und Rezeptoren. Die Liganden dieser Familie sind Typ II transmembrane Proteine (N-Terminus intrazellulär), die biologisch aktiv als Trimer agieren. Deren Rezeptoren sind Typ I transmembrane Proteine, die durch Cystein-reiche Domänen charakterisiert sind. Im Moment sind mehr als 40 Mitglieder der TNF/ TNFR-Superfamilie bekannt (Hehlhans, 2005), die in eine Vielzahl von biologischen Funktionen, wie Einleiten der Apoptose oder Überleben der Zellen, Entzündungs- und Autoimmunreaktionen, angeborene und adaptive Immunantwort, Zelldifferenzierung und Ausbildung lymphatischer Strukturen involviert sind.

Das Lymphotoxin-System (LT-System) ist ein umfangreiches Netzwerk, bei dem die meisten Liganden jeweils mehrere Rezeptoren binden können. Zwei verschiedene LT-Formen werden exprimiert, $LT\alpha$ (früher TNF β) und $LT\beta$, die als Liganden nur in Trimeren zu finden sind. Bis jetzt sind zwei Liganden des Lymphotoxin- β -Rezeptors ($LT\beta$ R) bekannt, zum einen $LT\alpha_1\beta_2$, ein membranständiges Heterotrimer, das auf aktivierten T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird (Browning, 1997), zum anderen LIGHT, ein membranständiges Homotrimer, exprimiert von aktivierten T-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und unreifen Dendritischen Zellen (Mauri, 1998).

LIGHT bindet außerdem den „herpesvirus entry mediator“ (HVEM-Rezeptor, TNFRSF14) und den löslichen „decoy receptor 3“ (DcR3). HVEM wurde zunächst als Eintrittspforte des Herpes-simplex-Virus entdeckt, das über sein Glykoprotein D an den HVEM-Rezeptor bindet und dabei die Bindung von LIGHT an den HVEM-Rezeptor verhindern kann (Montgomery, 1996).

Der $LT\beta$ R wird auf nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert (Stroma- und Parenchymzellen) (Force, 1995), aber auch auf Makrophagen und Mastzellen (Stopfer, 2004a). Der HVEM-Rezeptor wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, hohe Expressionsmengen findet man auf Lymphozyten, Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen.

Neben $LT\alpha_1\beta_2$ sind noch zwei weitere Formen von Lymphotoxin bekannt, das lösliche $LT\alpha_3$, das sowohl HVEM als auch die beiden TNF-Rezeptoren (TNFR) bindet und $LT\alpha_2\beta_1$, das ebenfalls die beiden TNF-Rezeptoren bindet, aber nur in ganz geringen Mengen nachweisbar ist und dem bisher keine spezifische biologische Funktion zugewiesen werden konnte (Abb. 1-2).

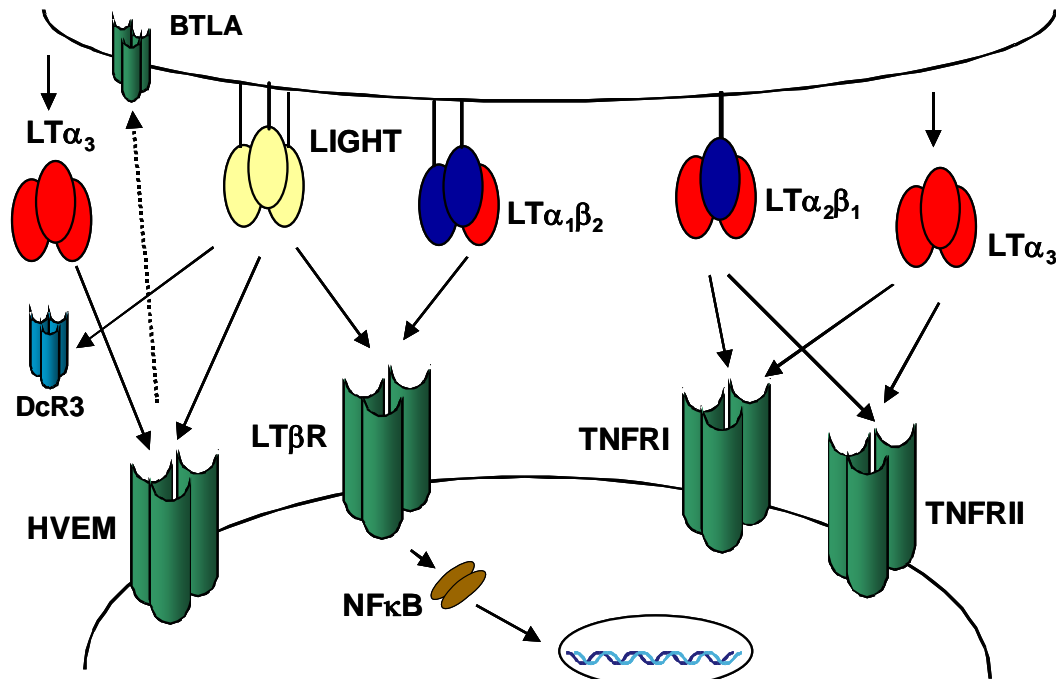


Abbildung 1-2:

Übersicht über das LT/ LT β R-System. Interaktionen der Liganden mit den jeweiligen Rezeptoren.

Die Aktivierung des LT β R ist für die Bildung von sekundären lymphatischen Strukturen wie Lymphknoten und Milz und für die Kommunikation von Lymphozyten mit Stroma- und Parenchymzellen essentiell (Browning, 1997; Koni, 1997; Rennert, 1998; Ware, 2005). Durch die Untersuchung von gendefizienten Mäusen des LT-Systems wurden die komplexen Funktionen dieses Systems nach und nach klar. LT α - und LT β R-defiziente Mäuse besitzen keine Lymphknoten, Peyer's Patches und einen stark reduzierten Aufbau der Milzstrukturen (Futterer, 1998; Tumanov, 2003). LT β -defiziente Mäuse weisen eine ähnlich deformierte Struktur der Milz auf, besitzen auch keine Peyer's Patches und peripheren Lymphknoten, dafür aber mesenteriale Lymphknoten. LIGHT- und HVEM-defiziente Mäuse dagegen zeigen einen völlig normalen Aufbau der sekundären lymphatischen Strukturen (Scheu, 2002; Wang, 2005).

Die Aktivierung eines dieser oben gezeigten Rezeptoren durch seinen Liganden beginnt mit einem „Clustering“ mehrerer Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Aggregation von Rezeptoren wurde bei allen Mitgliedern der TNFR-Familie beobachtet. Die anschließende **Signaltransduktion** des LT β R ist bereits genauer in der Literatur beschrieben. Die Aktivierung von NF κ B durch Aktivierung des LT β R kann sowohl über den klassischen Weg als auch über den alternativen Weg stattfinden. Beim Ablauf des klassischen Weges werden I κ Bs phosphoryliert durch die Aktivierung des I κ B-Kinase (IKK) Komplexes, der aus IKK α , IKK β und IKK γ (auch NEMO) besteht (Ghosh, 2002). Die Aktivierung von IKK β und RelA

führt zur Aktivierung proinflammatorischer Gene, wie zum Beispiel die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und MAdCAM-1 oder die Chemokine MIP-1 β und MIP-2 (Abb. 1-3).

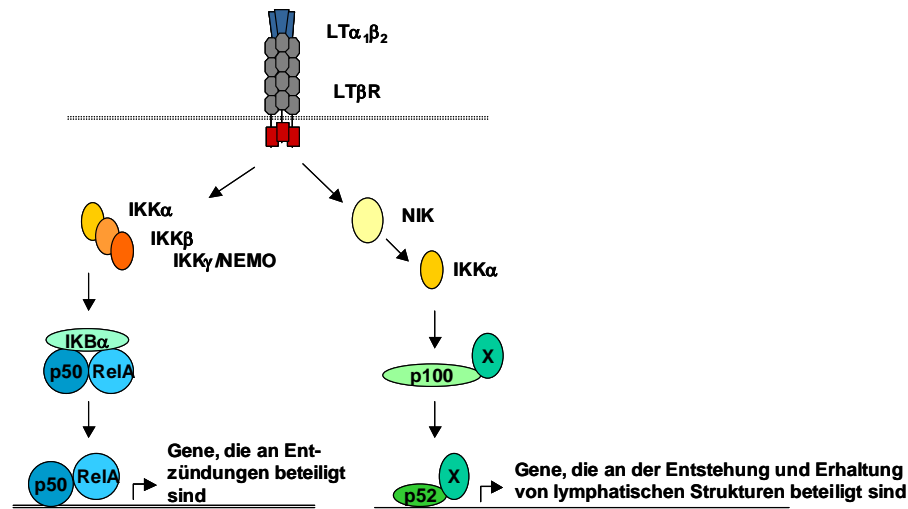


Abbildung 1-3:

NF κ B-Aktivierung durch den Lymphotoxin- β -Rezeptor. Ablauf des klassischen und des alternativen NF κ B-Weges (modifiziert nach (Hehlhans, 2005))

Der alternative NF κ B-Weg wird durch die Aktivierung der „NF κ B inducing kinase“ (NIK) und anschließende Aktivierung von IKK α initiiert. Dadurch entsteht aus dem p100-Vorläuferprotein aktiviertes p52-Protein, das in den Zellkern eindringt. Nach der Bindung von p52 an ein Partnerprotein (zum Beispiel RelB) wird die Transkription von Genen gesteuert, die für die Bildung und Aufrechterhaltung von sekundären lymphatischen Organen essentiell sind. Dazu gehören beispielsweise die Chemokine „secondary lymphoid chemokine“ (SLC, CCL21), „B-lymphocyte chemoattractant“ (BLC, CXCL13), „Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine“ (ELC, CCL19) und der „stromal derived factor-1“ (SDF-1) (Dejardin, 2002; Senftleben, 2002).

Zur LT-abhängigen **Bildung der Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Strukturen** gehört die Marginal-Zone (MZ) und die Anwesenheit von MZ-Makrophagen, die Funktion der Stromazellen, die B-Lymphozyten rekrutieren und in den Follikeln ansammeln, die Wanderung von T-Lymphozyten in die T-Zell-Bereiche, die Bildung von follikulären dendritischen Zellnetzwerken (FDC) und die Bildung von Keimzentren (Cyster, 2003; Fu, 1999). Chemokine steuern dabei die Kommunikation zwischen Lymphozyten und Stromazellen. Eine wichtige Rolle spielen CXCL13, CCL21 und CCL19, deren Expression in LT-defizienten Mäusen stark reduziert ist (Ansel, 2000). B-Lymphozyten sind essentiell für die Bildung des FDC-Netzwerkes und der T-Zell-Bereiche. Zu Beginn dieses Prozesses reagieren CXCR5⁺ B-Zellen auf CXCL13, das von LT β R-tragenden Stromazellen produziert wird, wodurch das Einwandern der B-Zellen in die Lymphknoten gesteuert wird. Im Folgenden wird die Expression von LT $\alpha_1\beta_2$ auf B-Lymphozyten ausgelöst. Der Kontakt dieser

B-Zellen zu Stromazellen über die Interaktion $LT_{\alpha_1\beta_2}$ - $LT\beta R$ führt zur weiteren Produktion von CXCL13 (Luther, 2002). Ein ähnlicher Kreislauf scheint in der Aufrechterhaltung von T-Zell-Bereichen eine Rolle zu spielen. Der Eintritt der T-Lymphozyten in das Lymphgewebe wird unter anderem von der Bindung CCL19 an CCR7 induziert. Die Struktur des FDC-Netzwerkes ist abhängig von einer kontinuierlichen Aktivierung des $LT\beta R$. Diese Tatsache wird deutlich bei der Behandlung von Mäusen mit einem $LT\beta R$ -Fusionsprotein ($LT\beta R$ -Ig), wodurch die FDC-Strukturen in der Milz nach wenigen Tagen verschwinden (Mackay, 1998a). Aber auch für andere Komponenten des Immunsystems ist ein intaktes LT/ TNF-Netzwerk von großer Bedeutung, zum Beispiel für Dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen. Bei der Differenzierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkzellen ist die Aktivierung des TNFR1 durch TNF/ LT_{α_3} wichtig, bei der Rekrutierung von Dendritischen Zellen zu sekundären lymphatischen Strukturen die Aktivierung des $LT\beta R$ (Abe, 2003; Wu, 1999). Die Differenzierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu Effektorzellen ist ebenfalls abhängig von der Aktivierung des $LT\beta R$, nämlich von der Aktivierung des alternativen $NF\kappa B$ -Weges (Elewaut, 2003). Auch bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der intestinalen lymphatischen Strukturen (GALT), wie Peyer's Patches und mesenteriale Lymphknoten, ist die $LT_{\alpha_1\beta_2}$ - $LT\beta R$ Interaktion essentiell. Nachdem diese Organe als Orte der Antigenpräsentation fungieren, sind sie entscheidend für die Ausbildung der Toleranz bzw. der Entwicklung einer Entzündung. Peyer's Patches (PP) sind für den Darm spezialisierte Lymphfollikel in der Wand des Dünndarms, die sich bereits während der Embryogenese ausbilden (Tag 16 bis 21) (Mebius, 2003). Mesenteriale Lymphknoten (mLN) bilden sich noch früher in der Embryonalentwicklung aus (Tag 10,5 bis 15,5) und filtern später die Lymphgefäße des Darms. Die Entwicklung von PP und mLN wird von einer ganzen Reihe von Zytokinen und Chemokinen kontrolliert, herausragend dabei sind Lymphotoxin und IL-7. Am Anfang dieser Entwicklung steht die Bildung von IL-7-Rezeptor ($IL-7R$)⁺ $CD3$ ⁻ $CD4$ ⁺ $CD45$ ⁺ Zellen, die Vorläufer von antigenpräsentierenden Zellen und NK-Zellen. Die Bindung von IL-7 an den IL-7R führt zur verstärkten Expression von $LT_{\alpha_1\beta_2}$ (Luther, 2003; Yoshida, 2002). $LT_{\alpha_1\beta_2}$ interagiert mit $LT\beta R$ -exprimierenden Lamina propria-Stromazellen, was die VCAM-1-Expression induziert. Dies führt zur Entwicklung von PP und mLN. Auch IL-7-defiziente Mäuse besitzen keine PP (Freedon-Jeffry, 1995). Weiterhin ist die Aktivierung des $LT\beta R$ wichtig für die Wanderung von B-Lymphozyten in die Lamina propria, denn die Blockade des $LT\beta R$ verhindert diesen Vorgang (Newberry, 2002). In LT_{α} -, $LT\beta$ - und $LT\beta R$ -defizienten Mäusen wurden stark reduzierte IgA-Spiegel gefunden (Banks, 1995; Futterer, 1998; Koni, 1997). Die Rekonstitution von bestrahlten LT_{α} -defizienten Mäusen mit Wildtyp-Knochenmark führte zu mit Wildtyp-Mäusen vergleichbaren IgA-Spiegeln, während PP und mLN weiterhin fehlten (Kang, 2002; Newberry, 2002). Dies zeigt, dass PP und mLN für die IgA-Produktion nicht notwendig sind.

Momentan wird die Rolle des LT-Systems bei der **Infektabwehr** von Viren, Bakterien und Parasiten viel untersucht. Nach bisherigen Erkenntnissen ist in allen drei Bereichen eine funktionierende Aktivierung durch LT-Liganden bzw. eine Aktivierung des LT β R von großer Bedeutung. LT α -defiziente Mäuse sind gegenüber einer Infektion mit Herpesviren (HSV-1) oder Cytomegalie-Viren (MCMV) anfälliger als die untersuchten Kontrollmäuse (Benedict, 2001; Kumaraguru, 2001). Auch bei Infektionen mit Lymphozytären-Choriomeningitis-Viren (LCMV) zeigen LT α - und LT β -defiziente Mäuse eine erhöhte Sterblichkeitsrate auf Grund von fehlender Aktivierung Virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz (Berger, 1999; Suresh, 2002).

Für die Abwehr von bakteriellen Infektionen ist ebenso ein funktionierendes LT-Netzwerk notwendig. LT α - und LT β R-defiziente Mäuse konnten eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* nicht abwehren, bei den LIGHT- und LT β -defizienten Mäusen gab es keine Probleme mit der Abwehr dieses intrazellulären Keimes (Ehlers, 2003; Roach, 2001). Als Ursache wurde bei den LT β R-defizienten Mäusen ein Defekt in der von Makrophagen exprimierten NO-Synthetase angegeben. Mit Hilfe von Knochenmark-Chimären konnte gezeigt werden, dass die Granulome in der Lunge von Mäusen, die mit LT α -defizientem Knochenmark rekonstituiert wurden, keine für die Aktivierung von infizierten Makrophagen essentiellen T-Zellen aufwiesen. Daraus wurde abgeleitet, dass die Anwesenheit von LT α während der Infektion wichtig ist, um diese zu bekämpfen, und die Defekte der sekundären lymphatischen Strukturen in den LT α -defizienten Mäusen hier keine Rolle spielen. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Behandlung mit LT β R-Ig die Empfindlichkeit der Mäuse für Infektionen mit *Mycobacterium bovis* signifikant erhöhte. Auch bei der Infektion mit *Listeria monocytogenes* wiesen die untersuchten LT β R-defizienten Mäuse eine erhöhte Sterblichkeit gegenüber den Kontrollmäusen auf (Ehlers, 2003). Bei Parasiten wurden bereits Infektionen mit *Leishmania major* bzw. mit *Toxoplasma gondii* näher charakterisiert, wobei LT β - bzw. LT α -defiziente Mäuse jeweils eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten (Schluter, 2003; Wilhelm, 2002). Nach *Toxoplasma gondii*-Infektion fand man auch hier in den Makrophagen der LT α -defizienten Mäuse eine eingeschränkte NO-Produktion.

Auch die Beteiligung des LT/ LT β R-Systems an der Entwicklung und am Fortschreiten von **Autoimmunerkrankungen** ist Gegenstand aktueller Forschungen. Im Maus-Modell der „Kollagen-induzierten Arthritis“ (CIA), in dem die Entzündung durch Immunisierung mit Typ-II-Kollagen aus Hühnern hervorgerufen wird, konnte durch LT β R-Ig Behandlung das Ausmaß der induzierten Arthritis signifikant gesenkt werden (Fava, 2003). Als Erklärung hierfür wurde die Veränderung in Milz- und Lymphknotenstruktur angenommen, wo die FDC-Netzwerke verschwanden und weniger Autoantikörper gegen Kollagen-II gefunden wurden. Die

Verabreichung von LT β R-Ig im Modell der „experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis“ (EAE), bei der die Demyelinisierung im zentralen Nervensystem durch Immunisierung mit einem „myelin-basic protein“ ausgelöst wird, führte je nach verwendetem Adjuvans zu widersprüchlichen Ergebnissen. Mit Pertussis-Toxin als Adjuvans, das auch G-Proteingekoppelte Chemokinrezeptoren blockiert, wurde kein Effekt des LT β R-Ig beobachtet. Ohne die Verwendung von Pertussis-Toxin führte die LT β R-Ig Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung der Entzündung (Gommerman, 2003; Steinman, 1997). Daraus wurde abgeleitet, dass LT $\alpha\beta$ auch eine wichtige Rolle in der T-Zell-Antwort übernimmt, denn EAE ist primär eine T-Zell-abhängige Autoimmunerkrankung. Es wurde gezeigt, dass nach LT β R-Ig Behandlung keine sekundäre T-Zell-Antwort auf EAE-Autoantigene mehr möglich war, so dass für LT $\alpha\beta$ eine Beteiligung an der T-Zell-Reifung vermutet wurde. Auch in zwei unterschiedlichen Diabetes-Modellen mit „nonobese diabetic“ (NOD) Mäusen konnte ein positiver Effekt des LT β R-Ig Fusionsproteins nachgewiesen werden (Ettinger, 2001; Wu, 2001). Dabei wurden zwei verschiedene Wirkmechanismen angegeben. Zum einen entfaltete das LT β R-Ig seine Wirkung, indem es die Wanderung von autoreaktiven T-Lymphozyten in die neu gebildeten tertiären Lymphfollikel im Pankreas verhinderte. Zum anderen war die Antwort der Milzzellen auf das Autoantigen Glutamat-Decarboxylase im Pankreas abgeschwächt. Daher ist bei diesem Modell noch unklar, auf welche Weise die Blockade des LT β R die Diabetes-Entwicklung bremst bzw. sogar ganz verhindert.

Auch im Darm spielt das LT/ LT β R-System, wie oben gezeigt, eine wichtige Rolle. Die Blockade des LT β R durch ein LT β R-Ig Fusionsprotein konnte in einigen experimentellen Colitis-Modellen die intestinale Entzündung verringern, zum Beispiel im Transfermodell mit CD45RB^{high}CD4⁺ T-Lymphozyten (Mackay, 1998b), im TNBS-Modell (An, 2005; Dohi, 2001) und in der DSS-induzierten chronischen Colitis (Stopfer, 2004b). In der akuten DSS-Colitis wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Zunahme der intestinalen Entzündung nach LT β R-Ig-Behandlung gezeigt (Manuskript in Arbeit). Mäuse mit LIGHT-transgenen T-Lymphozyten entwickeln nach einigen Wochen spontan Autoimmunerkrankungen wie Glomerulonephritis, Lymphadenopathie und auch intestinale Entzündungen (Shaikh, 2001; Wang, 2001). In kürzlich publizierten Humanstudien wurde die Rolle von LIGHT im Darm näher untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass LIGHT von T- und NK-Zellen in der Mucosa konstitutiv exprimiert wird und die dortige Produktion von IFN- γ reguliert (Cohavy, 2004; Cohavy, 2005). Die bisherigen Daten aus Maus- und Humanstudien sehen das LT/ LT β R-System als wichtige regulatorische Komponente der intestinalen Entzündung und Aufrechterhaltung immunologischer Funktionen.

1.4 Ziele der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Aktivierung des $LT\beta R$ im Modell der DSS-induzierten Colitis eine ganz wesentliche Rolle spielt. Die Blockade der $LT\beta R$ -Liganden mit einem $LT\beta R$ -Ig Fusionsprotein führte in der chronischen DSS-induzierten Colitis zu einer signifikanten Reduktion der intestinalen Entzündung, in der akuten DSS-Colitis zu einer Verschlimmerung der Entzündung. Mit Hilfe von Ligand-defizienten Mäusen sollte geprüft werden, welcher Ligand des $LT\beta R$ bei der Ausbildung und Manifestation der entzündlichen Darmerkrankung entscheidend ist. Darüber hinaus sollte unter der Einbeziehung von gentechnologisch veränderten Mäusen, die $LT\alpha_1\beta_2$ nur auf T- oder auf B-Lymphozyten exprimieren, aufgeklärt werden, welche Lymphozytenpopulation bei der Aktivierung vorrangig involviert ist.

Nachdem bei diesen Untersuchungen am Modell der DSS-induzierten Colitis ein für die Perpetuierung der intestinalen Entzündung wesentlicher Ligand des $LT\beta R$ gefunden worden war, war das nächste Ziel die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen diesen $LT\beta R$ -Liganden. Die hergestellten Antikörper sollten anschließend charakterisiert und neutralisierende Antikörper in der DSS-Colitis eingesetzt werden.

2. Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6)) (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
ABTS Substrat Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie (Brilliant) Blue	Fluka, Buchs, Schweiz
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextransulfat-Sodium (DSS, MG 36.000-50.000)	ICN Biochemicals, Ohio, USA
Dianisidine	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ECL Lösungen A+B	Mobitec, Göttingen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Gentamycin	ICN, Meckenheim
Glycin	Merck, Darmstadt
HAT-Media Supplement	Boehringer, Mannheim
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
HT-Media Supplement	Boehringer, Mannheim
Ionomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Nuclease free water	Promega, Madison, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen
PCR-Puffer, 10x conc.	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phorbol myristate acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Polyethylenglycol 1500	Roche Diagnostics, Mannheim

Pronase E	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Propidium-Iodid (PI)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Protein G-Sepharose	Amersham, Uppsala, Schweden
RNAlater	Ambion, Huntington, UK
RNaseZAP	Ambion, Huntington, UK
RPMI 1640-Pulvermedium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
SIGMA 104 (p-Nitrophenyl-Phosphat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Sucrose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Titermax Gold Adjuvant	Sigma Aldrich, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
TRizol-Reagenz	GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

Begasungsbrutschrank – Cell safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Deckgläser (Automat Star)	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Einbetten: Histocentre 2	Shandon, Waltham, USA
ELISA-Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Entwickler: Kodak X-OMAT 2000 Processor	Kodak, Stuttgart
Eppendorf-Cups (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Plastik-Pistille	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
FACScan Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
Gelelektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
Gewebekulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
HPLC-Anlage: Econo System	BioRad, München

Hypercassette	Amersham, Little Chalfont, UK
Hyperfilm ECL	Amersham, Uppsala, Schweden
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryo-Röhrchen	Nunc, Naperville, USA
Laminarflow HB 2448 – Sterilbank	Heraeus, Hanau
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Capillaries	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Centrifuge Adapter	Roche Diagnostics, Mannheim
MACS Separation Columns 25 LS	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Microm HM 400	Leica, Heidelberg
Mikroskop (Zellkultur)	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka, USA
Objektträger (geschnitten, Mattrand)	Engelbrecht GmbH, Edermünde
PCR-Thermocycler	Perkin Elmer, Shelton, USA
Photometer: Ultrospec 3100 pro	Amersham, Uppsala, Schweden
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgerät: Biorad 200/ 2,0 Constant Voltage	BioRad, München
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter Steritop (0,22 µm)	Millipore, Schwalbach
Ultra-Turrax-Stab T8	IKA Labortechnik, Staufen
UV-Schirm (254 nm und 366 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Waagen: Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Wundklammern	Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)	Falcon Heidelberg
Zentrifugen: Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsiebe	Falcon, Heidelberg

2.3 Kits

Biotin-X-NHS Kit	Merck, Darmstadt
DC Protein Assay	BioRad, München
ECL-Western Blot Detection Kit	Mobitec, Göttingen
ELISAs:	
- DuoSets TNF, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , MIP-2, RANTES	R&D Systems, Wiesbaden
- Quantikine human LIGHT	R&D Systems, Wiesbaden
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Mycoplasma detection kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.4 Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards (II, III, X, XIV)	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS-PAGE Molecular Weight Standard (Broad Range)	BioRad, München

2.5 Antikörper und Enzyme

Antikörper:

CD8a Micro Beads mouse (Ly-2)	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Esel anti-Human-IgG-PE, F(ab') ₂ -Fragment	Jackson ImmunoResearch, Soham, UK
Maus IgG ₁ (DAK-G01)	Dako, Hamburg
Maus IgG (reagent grade)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ratte anti-Maus-CD3-FITC (17A2)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus-CD3 ϵ (2C11)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus-CD8a-APC (53-6.7)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus-CD28 (35.71)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus-Fc γ -Rezeptor II/III (2.4G2)	eigene Herstellung
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Wiesbaden
Ziege anti-Maus-IgG-AP (γ -chain specific)	Sigma Aldrich, Deisenhofen

Ziege anti-Maus-IgG-FITC, F(ab') ₂ -Fragment, (Fab specific)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ziege anti-Maus-IgG-POX	Sigma Aldrich, Deisenhofen

Enzyme:

Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
--------------------	-----------------------------

2.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Alle Sense-Primer für PCR tragen den Zusatz 5', alle Antisense-Primer tragen den Zusatz 3'.

Oligonukleotid	Sequenz
5' mLIGHT 3' mLIGHT	5'-GAG AGT GTG GTA CAG CCT TCA GTG-3' 5'-TGT AAG ATG TGC TGC TGG GTT G-3'
5' β-Aktin 3' β-Aktin	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT-3' 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC-3'
5' mTNF 3' mTNF	5'-GCG AGC TGG AAC TGG CAG AAG-3' 5'-GGT ACA ACC CAT CGG CTG GCA-3'
5' mL-6 3' mL-6	5'-TGG AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA G-3' 5'-TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCA C-3'
CD4-Cre (T-LTβ ^{-/-}) 1.) CD4cre1 2.) CD4cre2 3.) CD4cre3	5'-ATC AAG GTC CTG AGG AAG AG-3' 5'-ACC TCA TCA CTC GTT GCA TC-3' 5'-CTA GGA GTT GTG CTG CAC AG-3'
CD19-Cre (B-LTβ ^{-/-}) 1.) CD19.8 2.) CD19.9 3.) Lck2	5'-AAT GTT GTG CTG CCA TGC CTC-3' 5'-GTC TGA AGC ATT CCA CCG GAA-3' 5'-AAT GTT GCT GGA TAG TTT TTA CTG C-3'
LTβ („gefloxtes LTβ“) 1.) Pri3ltb 2.) Pri5ltb 3.) KO46	5'-GGG AGG GGA TTG TGT CCG AG-3' 5'-TCT TCC CTA AAC TCC AAT CAG C-3' 5'-GGG GTG ACC TAG ATA GTG CC-3'

2.7 Puffer und Lösungen

ACK-Puffer (6x)	0,155 M NH_4Cl 0,1 M KHCO_3 0,1 mM Na-EDTA x 2 H_2O
Beschichtungspuffer für ELISA	50 mM NaHCO_3 (pH 9,2)
Bindungspuffer (IgG-Reinigung)	20 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat (pH 6,25)
Blockierlösung für ELISA	1% BSA in TBS
Coomassie-Blau-Lösung (filtriert)	0,25% Coomassie (Brilliant) Blue in 40% Methanol 10% Essigsäure 50% dem. Wasser
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure 50% dem. Wasser
Einfriermedium für Zellen (2x)	20% DMSO 80% FCS
Elutionspuffer (IgG-Reinigung)	0,1 M Glycin (pH 3,1)
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H_2O
FACS-Waschpuffer	10% FCS in PBS
Lämmli-Elektrodenpuffer (5x)	120 mM Tris Base 0,95 M Glycin 0,5% SDS
Loading Dye Solution (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerol in H_2O
Lysepuffer	1 M Tris (pH 8,5) 10 mM EDTA (pH 8) 1 M NaCl 10 % SDS
MACS-Puffer (entgast)	500 ml PBS 5 ml FCS 2 ml 0,5 M EDTA
Neutralisierungspuffer (IgG-Reinigung)	1 M Tris-HCl (pH 11)
PBS	137 mM NaCl 6,5 mM Na_2HPO_4 x H_2O 1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl (pH 7,3)

Pronase E Lösung	100 mg Pronase E in 10 ml H ₂ O + 100 µl 1 M Tris-HCl (pH 8) + 20 µl 5 M NaCl → 1 h bei 37° C voraktivieren
Sammelgel-Trispuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Probenpuffer (2x)	20% Glycerin 125 mM Tris (pH 6,8) 2% SDS 0,02% Bromphenolblau 2% β-Mercaptoethanol
Substratlösung für ELISA (AP)	0,06% SIGMA 104 in Substratpuffer
Substratpuffer für ELISA (AP)	9,8% Diethanolamin 24 mM MgCl ₂ (pH 9,8)
TAE-Puffer	40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
TBS-Puffer	8 g NaCl 0,2 g KCl 3 g Tris Base in 1000 ml dem. Wasser
TBS-T-Puffer	0,05% Tween 20 in TBS-Puffer
Transferpuffer A (Western Blot)	0,3 M Tris Base in 10% Methanol 90% dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer B (Western Blot)	25 mM Tris Base in 10% Methanol 90% dem. Wasser (pH 10,4)
Transferpuffer C (Western Blot)	25 mM Tris Base 40 mM ε-Amino-n-Caprionsäure in 10% Methanol 90% dem. Wasser (pH 9,4)
Trenngel-Trispuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
Trypanblau-Lösung	0,15% Trypanblau 150 mM NaCl

2.8 Zelllinien

Bezeichnung	Zelllinie	Art des Wachstums
PMMI	Maus-CD8 ⁺ -T-Zelllinie	in Suspension
L929	Maus-Fibrosarkomzelllinie	adhärent
SP2/0-Ag14	Maus-Myelomzelllinie	in Suspension

2.9 Sonstiges

mLIGHT, hLIGHT

(S2-exprimiert, Extrazellulärdomäne)

mLTβR-Ig (S2-exprimiert)

Ziegen-Serum (normal)

eigene Herstellung

(Hehlgans, 2001; Hehlgans, 2003)

eigene Herstellung

(Stopfer, 2004)

Dako, Hamburg

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Mäuse

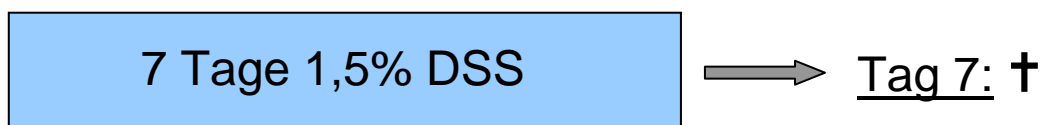
Alle verwendeten Mäuse waren entsprechend der Haltungsvorschriften in IVC-Käfigen untergebracht, hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum.

Für Colitis- und CLP-Experimente wurden weibliche C57BL/6 Mäuse von Charles River, Sulzfeld als Kontrolltiere (WT) bezogen. Mäuse mit einer Gendefizienz für $LT\alpha\beta$ ($LT\alpha\beta^{-/-}$) (Hehlgans, 2002), für LIGHT ($LIGHT^{-/-}$) (Scheu, 2002) und für HVEM ($HVEM^{-/-}$) (Wang, 2005) wurden freundlicher Weise von Dr. Klaus Pfeffer, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt, Mäuse mit einer Gendefizienz für $LT\beta$ selektiv auf T-Lymphozyten ($T-LT\beta^{-/-}$) bzw. auf B-Lymphozyten ($B-LT\beta^{-/-}$) (Tumanov, 2003) und die dazugehörigen Kontrollen („gefloxte $LT\beta$ “) von Dr. Sergei A. Nedospasov, Labor für Molekulare Immunologie, Engelhardt-Institut für Molekularbiologie, Moskau.

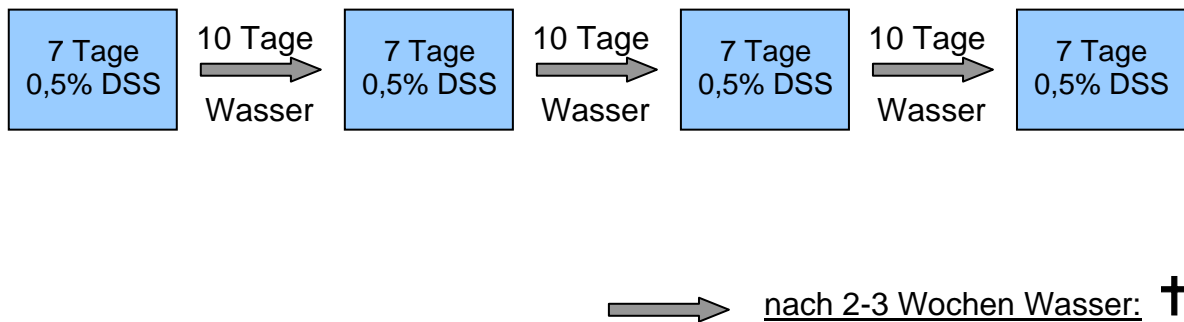
Alle diese gendefizienten Tiere besitzen einen genetischen C57BL/6 Hintergrund. Es wurde darauf geachtet, dass die Mäuse am Beginn der Colitis-Induktion mindestens 22 g Gewicht hatten.

3.1.2 Induktion einer experimentellen akuten und chronischen Colitis mit Dextransulfat (DSS)

Zur Induktion einer **akuten Colitis** wurden weiblichen Mäusen (Körpergewicht mindestens 22 g) 1,5% „Dextransulfat-Sodium“ (DSS, MG 36.000-50.000) gelöst im Trinkwasser über sieben Tage gegeben (Okayasu, 1990). Am Tag 7 wurden die Mäuse mittels Genickzug getötet.



Zur Induktion einer **chronischen Colitis** erhielten weibliche Mäuse (Körpergewicht mindestens 22 g) vier Zyklen 0,5% DSS-Behandlung mit jeweils dazwischenliegenden zehntägigen Gaben von normalen Trinkwasser. Zwei bis drei Wochen nach der letzten DSS-Gabe erfolgte das Töten der Mäuse mittels Genickzug.



3.1.3 Bestimmung der Entzündungsparameter des Dickdarmes

3.1.3.1 Histologischer Score

Am Ende der Colitis-Induktion wurden die Mäuse mittels Genickzug getötet. Nach Öffnung des Bauchraums wurde der Dickdarm herauspräpariert, von Stuhl befreit, mit PBS gewaschen und die Länge bestimmt. Danach wurden vom distalen Teil des Dickdarms etwa 2 cm abgeschnitten und der Länge nach aufgeschnitten. Dieses Stück wurde über Nacht in 4% Formaldehyd (in PBS) fixiert und am nächsten Tag mit aufsteigenden Ethanolkonzentrationen entwässert. Anschließend wurden die Darmstücke in Paraffin eingebettet. Von den paraffinierten Darmstücken wurden drei Längsschnitte mit einer Dicke von 3 μm im Abstand von 100 μm angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/ Eosin gefärbt. Die histologische Beurteilung erfolgte verblindet durch Dr. Frauke Bataille, Institut für Pathologie. Der jeweilige histologische Score einer Maus ist der resultierende Mittelwert aus allen drei Schnitten pro Dickdarm.

Die histologische Beurteilung erfolgte nach folgendem Score:

Score	Epithelschaden	Infiltrat
0	Normale Morphologie	Kein Infiltrat
1	Verlust einzelner Becherzellen	Wenig Infiltrat (an der Kryptenbasis)
2	Flächenhafter Verlust von Becherzellen	Infiltrat zwischen Krypten und Muscularis Mucosae
3	Kryptenverlust	Mehr Infiltrat, Ödeme
4	Flächenhafter Kryptenverlust	Infiltrat durch Muscularis Mucosae reichend bis in die Submucosa

Die histologischen Unter-Scores Epithelschaden und Infiltrat wurden einzeln bewertet. Der histologische Gesamt-Score einzelner Mäuse wurde aus der Summe der histologischen Unter-Scores berechnet (Gesamt-Score = Epithelschaden + Infiltrat). Hieraus ergibt sich ein maximaler Gesamt-Score von 8.

Weiterhin erfolgte eine semiquantitative Auswertung der vorhandenen Zellinfiltrate in der Lamina propria und im Epithel, getrennt nach Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen. Bewertet wurde: 0 – nicht vorhanden 1 – vereinzelt vorhanden 2 – sehr stark vorhanden

3.1.3.2 Bestimmung der Lymphfollikel-Anzahl

Die Bestimmung der Lymphfollikel-Anzahl erfolgte nach folgendem Schema, wobei pro Schnitt ein Abschnitt von 1 cm bewertet wurde:

Anzahl	Lymphfollikel/ Schnitt
0	Kein Lymphfollikel
1	1 Lymphfollikel
2	2 Lymphfollikel
3	3 Lymphfollikel
4	4 oder mehr Lymphfollikel

3.1.3.3 Gewichtsverlust

Während der Induktion der akuten Colitis wurde täglich das Körpergewicht der Mäuse gemessen und der Gewichtsverlauf in Prozent des anfänglichen Gewichts dargestellt.

3.1.3.4 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Zur Bestimmung der Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität als Maß für die Neutrophileninfiltration wurden Biopsien von 30 mg aus dem mittleren Dickdarmbereich in 1 ml Hexadecyltrimethylammoniumbromidlösung (HTAB-Lsg.: 0,5% HTAB in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0) gegeben und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Biopsien wurden in der HTAB-Lösung mittels eines Ultra-Turrax-Stabes (IKA Labortechnik) homogenisiert (dreimal 30 s) und das Homogenisat drei schnellen Einfrier- und Auftauzyklen (flüssiger Stickstoff und 37°C Wasserbad) unterzogen. Nach einer Zentrifugation (13.200 rpm, 5 min) wurde im Überstand die MPO-Aktivität gemäß der Methode nach Bradley (Bradley, 1982) mit 0,0005% Wasserstoffperoxid als Substrat gemessen.

3.1.4 Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligation und Punktion (CLP)

Vor der Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels CLP wurde den Tieren intraperitoneal 10 $\mu\text{l/g}$ Maus einer sterilen Lösung aus 15% Ketamin und 8% Xylazin in PBS injiziert, um sie zu narkotisieren. Nach Feststellung der vollständigen Anästhesie durch Drucktest an der Hinterpfote wurden die Tiere auf den Rücken gelagert, der untere ventrale Bereich des Tieres mit 70% Ethanol benetzt und Fell und Bauchdecke mittels eines ca. 1 cm langen Schnittes entlang der medianen Ebene aufgeschnitten. Anschließend wurde das Zökum vorsichtig aus der Öffnung gezogen und auf ein zurechtgeschnittenes und desinfiziertes Stück Parafilm[®] gelegt. Die Ligation des distalen Teils des Blinddarms wurde mit einem Baumwollfaden der Stärke 0,12 mm durchgeführt. Dabei wurden 60% des Zökums mit einem doppelten Knoten abgebunden und die überstehenden Enden des Fadens entfernt. Die nachfolgende Perforation erfolgte durch einen Einstich in den abgebundenen Teil des Blinddarms mit einer sterilen Kanüle von 0,7 mm Durchmesser. Nach dem Rücklegen des Zökums in das Peritoneum wurden Bauchdecke und Fell gemeinsam durch drei Wundklammern (Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens) verschlossen, die Mäuse in frisch eingestreute Käfige gelegt und bis zum Erwachen regelmäßig kontrolliert.

3.2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

3.2.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Herstellung von monoklonalen α -mLIGHT-Antikörpern wurden zwei weibliche LIGHT-/Mäuse alle drei Wochen mit je 55 μ g S2-exprimiertem mLIGHT-Extrazellulärdomänen (ECD)-Protein immunisiert. Als Adjuvans diente Titermax Gold Adjuvant[®], das im Verhältnis 1:1 mit dem in PBS gelösten Protein zu einer Wasser-in-Öl-Emulsion vermischt wurde. Die Antigenpräparation wurde den Tieren subkutan und intraperitoneal appliziert. Die zweite Immunisierung nach drei Wochen erfolgte in der gleichen Art und Weise. Ab der dritten Immunisierung wurde das Protein nur noch in 300 μ l PBS aufgenommen und intraperitoneal appliziert.

Maus 1 (deren Milz in der 1. Fusion Verwendung fand) wurde viermal immunisiert (Fusion drei Tage nach der vierten Immunisierung). Maus 2 (2. Fusion) wurde insgesamt siebenmal immunisiert (Fusion drei Tage nach der siebten Immunisierung). Eine Woche nach der zweiten und der dritten Immunisierung und am Tag der Fusionen wurde den Ether-betäubten Tieren Blut abgenommen und im daraus gewonnenen Serum der Antikörpertiter bestimmt.

3.2.2 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Zur Gewinnung von Serum aus Vollblut wurde das abgenommene Blut eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, der Blutkuchen gelöst und zur vollständigen Gerinnung anschließend über Nacht bei 4° C gelagert. Am nächsten Tag wurde bei 13.200 rpm für 5 min zentrifugiert und der flüssige Überstand (Serum) vorsichtig abgenommen. Mit einem Teil des Serums wurde der ELISA zur Titerbestimmung durchgeführt, der Rest wurde bei -20° C weggefroren.

3.2.3 Gewinnung von Peritoneal-Exsudat-Zellen (PECs)

Die PECs wurden zusammen mit fusionierten Milzzellen kultiviert, um so ein konditioniertes Medium zu erzeugen und um nach der Fusion tote Zellen und Zellreste durch Phagozytose zu beseitigen. Drei Tage vor der jeweiligen Fusion wurden 15 C57BL/6-Mäusen (pro Mikrotiterplatte eine Maus) 1 ml steriles PBS intraperitoneal verabreicht. 12 bis 16 Stunden später wurde diesen Mäusen nach Tötung der Bauchraum mit 10 ml kaltem PBS + 5% FCS ausgespült. Die so gewonnenen Zellen wurden mit Medium gewaschen, in HAT-Medium aufgenommen und gezählt. Es wurden etwa 2×10^6 PECs pro Maus gewonnen und in HAT-Medium auf Mikrotiterplatten verteilt (ca. 2×10^4 PECs in 100 μ l Kultur).

3.2.4 Isolierung von Milzzellen für die Fusion

Am Tag der jeweiligen Fusion wurde der immunisierten Maus zunächst noch einmal unter Ether-Betäubung Blut abgenommen und die Maus anschließend durch Genickzug getötet. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und in kaltes RPMI 1640-Medium gelegt. Anschließend wurde durch sorgfältiges Drücken durch ein Metall-Zellsieb eine Milz-Zellsuspension hergestellt. Nach zwei Waschschrritten mit kaltem RPMI-Medium (serumfrei) und anschließender Zentrifugation bei 1.200 rpm, 5 min, 4° C wurden die Milzzellen gezählt. Aus einer Mausmilz gewinnt man ca. 1×10^8 Zellen. Bei der ersten Fusion wurde ein Drittel der Mausmilz zur Fusion eingesetzt, bei der zweiten Fusion die Hälfte der Milz. Der Rest der Milz-Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.2.5 Zellfusion mit Polyethylenglykol

Zur Fusion wurde die Maus-Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 (SP2/0-Zellen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Hybridom aus BALB/c-Milzzellen und der Myelomzelllinie P3X63AAG8, das sich gut mit PEG 1500 fusionieren lässt (Shulman, 1978).

Die SP2/0-Zellen wurden zweimal mit RPMI-Medium (serumfrei) gewaschen und anschließend gezählt. Zur Fusion wurden Myelomzellen und Milzzellen (ebenfalls serumfrei gewaschen) im Verhältnis 1:3 vorsichtig gemischt und bei 1.200 rpm, 5 min, 4° C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen im 50 ml-Falcon eine Minute im 37° C warmen Wasserbad erwärmt, anschließend wurde innerhalb von einer Minute 1 ml 37° C warmes PEG 1500 unter Bewegen zugegeben. Nachdem die Zellsuspension noch eine weitere Minute bei 37° C bewegt wurde, wurde innerhalb von 5 min 10 ml warmes RPMI-Medium mit FCS unter Bewegen zugegeben. Dabei wurde zuerst sehr langsam, dann mit zunehmender Geschwindigkeit RPMI-Medium zugegeben. Danach wurde mit HAT-Medium (mit FCS) auf 30 ml aufgefüllt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde gleichmäßig auf drei Falcons aufgeteilt, mit HAT-Medium auf je 50 ml ergänzt und auf die vorbereiteten 15 Mikrotiterplatten mit PECs als Feeder-Zellen ausgesät. Die Selektion der fusionierten Zellen erfolgt durch das HAT-Medium, in dem nur aus Milzzellen und SP2/0-Zellen entstandene Hybridome überleben können (Foung, 1982).

Nach 12 Tagen wurden die ersten Klone mittels ELISA hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion getestet. Nach etwa 19 Tagen wurde die Zellkultur von HAT-Medium zunächst auf HT- und dann auf RPMI-Medium mit 10% FCS umgestellt.

3.2.6 Subklonierung von Hybridomzellen

Um den monoklonalen Ursprung der Hybridome sicher zu stellen, wurden aus den mindestens dreimal als positiv getesteten Kulturen Hybridomzellen entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf eine Mikrotiterplatte ausgesät (ausgehend von 50 Zellen pro Well, durch 1:2-Verdünnungen). Da in der letzten Verdünnung rein rechnerisch 0,024 Zellen pro Kultur vorlagen, steigt die Wahrscheinlichkeit für die Monoklonalität der hochwachsenden Klone bei größer werdender Verdünnung.

3.2.7 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Zur Herstellung größerer Mengen an monoklonalen Antikörpern wurden Hybridomkulturen in 250 ml Zellkulturflaschen bis zur Gelbfärbung des Mediums wachsen gelassen. Das Medium wurde abgenommen und für 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße) und bis zur Ammoniumsulfat-Fällung bei 4° C aufbewahrt.

3.2.7.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Dem Überstand wurde unter Rühren Ammoniumsulfat (313 g/l) innerhalb einer Stunde zugegeben. Anschließend wurde eine weitere Stunde gerührt und bei 11.500 rpm 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem möglichst kleinen Volumen in Wasser aufgenommen und durch auf- und abpipettieren gelöst. Diese Lösung wurde zunächst gegen PBS und anschließend gegen Bindungspuffer über Nacht bei 4° C dialysiert.

3.2.7.2 Reinigung von IgG über Protein-G-Sepharose

Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle an der HPLC-Anlage „Econo System“ bei 4° C durchgeführt. Vor dem Auftragen der oben hergestellten Antikörperlösung wurde die Protein-G-Sepharose-Säule mit Bindungspuffer mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min equilibriert. Nach dem Beladen der Säule (0,7 ml/min) wurde solange mit Bindungspuffer gespült, bis die Absorption wieder den Nullwert erreicht hatte. Die Elution wurde mit Glyzin-Elutionspuffer durchgeführt (0,4 ml/min). Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und sofort mit Tris-HCl-Puffer neutralisiert. Die Eluatfraktionen wurden über Nacht gegen PBS dialysiert, der Proteingehalt wie in Punkt 3.4.1 beschrieben bestimmt und in Aliquots bei -20° C gelagert.

3.3 „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)

In einem ELISA wird das Antigen entweder direkt an eine Mikrotiterplatte gebunden und über einen Antikörper nachgewiesen oder man verfährt nach dem sogenannten „Sandwich-Prinzip“. Dazu wird die Mikrotiterplatte mit einem „Fang-Antikörper“ beschichtet. Nach Inkubation mit der antigenhaltigen Probelösung wird das an den „Fang-Antikörper“ gebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper, dem sog. Sekundärintikörper, nachgewiesen. Der Sekundärintikörper kann mit einem Enzym gekoppelt sein, am häufigsten werden Peroxidase (POX, stammt sie aus dem Meerrettich, wird sie mit „HRP“ abgekürzt) und alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Bei unmarkierten Sekundärintikörpern verwendet man einen dritten Antikörper, der den Sekundärintikörper erkennt und eine Enzymmarkierung trägt. Biotinylierte Antikörper werden mit einem Streptavidin-POX- oder Streptavidin-AP-Komplex nachgewiesen. Die Menge an gebundenem, enzymmarkiertem Antikörper ist der Menge an gebundenem Antigen proportional und wird über den Umsatz eines geeigneten chromogenen Substrates photometrisch bestimmt.

3.3.1 ELISA zur Bestimmung von Immunglobulintitern im Mausserum

Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurde diese mit 100 µl/ pro Well einer 1 µg/ml Lösung des Antigens (mLIGHT-Extrazellulärdomäne) in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschritt mit 0,05% TBS-T (dreimal 300 µl pro Well). Danach wurden alle unbesetzten Proteinbindungsstellen mit 300 µl/ pro Well Blockierlösung (1% BSA in TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach erneutem Waschen (siehe oben) wurden Verdünnungen des Mausserums in 0,1% BSA-TBS zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Mit dem Serum wurde eine log₂-Verdünnungsreihe ausgehend von einer 1:100 verdünnten Serumlösung pipettiert. Davon wurden je 100 µl/ pro Well in Duplikaten auf die Platte aufgetragen. Nach erneutem dreimaligen Waschen (wie oben) folgte der Detektionsantikörper anti-Maus-IgG-AP („γ-chain specific“), der spezifisch nur Immunglobuline vom Isotyp IgG erkennt. Dieser Antikörper wurde 1:30.000 in 0,1% BSA-TBS verdünnt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert (100 µl/ pro Well). Danach wurde erneut dreimal (siehe oben) gewaschen und anschließend jedes Well mit 100 µl Substratlösung (p-Nitrophenyl-Phosphat, Sigma 104[®]) gefüllt. Nach Entwicklung der Farbreaktion (Gelbfärbung) wurde die Absorption der Substratlösung bei 405 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

3.3.2 ELISA zum Testen der Hybridomüberstände

Um die Hybridomüberstände auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Antikörper-Produktion testen zu können, wurde im Wesentlichen der unter 3.3.1 beschriebene ELISA durchgeführt. Anfangs wurde jedoch mit einer 5 µg/ml Lösung des Antigens (mLIGHT) beschichtet. Anstelle der oben genannten Serumverdünnungen wurden hier die unverdünnten Überstände der jeweils zu testenden Hybridome eingesetzt (100 µl/ Well). Der Detektionsantikörper anti-Maus-IgG-AP („γ-chain specific“) wurde dabei in einer Verdünnung von 1:5.000 in 0,1% BSA-TBS eingesetzt. Alle anderen Arbeitsschritte wurden exakt nach dem Protokoll in 3.3.1 durchgeführt.

3.3.3 Kompetitiver ELISA zur Epitopbestimmung von monoklonalen Antikörpern

Zur vergleichenden Bestimmung des erkannten Epitops verschiedener, gegen dasselbe Antigen gerichteter monoklonaler Antikörper wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Das Testprinzip beruht darauf, dass im Überschuss zugegebener unmarkierter Antikörper, sollte er mit dem markierten Antikörper um dasselbe Epitop konkurrieren, diesen verdrängt. Mit ansteigendem Überschuss an unmarkiertem Antikörper sollte in diesem Fall eine Abnahme der Farbreaktion zu beobachten sein.

Zunächst wurden 5 µg/ml mLIGHT in Beschichtungspuffer an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und wie unter 3.3.1 beschrieben vorgegangen. Nach dem Blockierungsschritt und Waschen wurde eine Mischung aus biotinyliertem und nicht biotinyliertem Antikörper pipettiert. Die Menge an unmarkiertem Antikörper wurde dabei variiert (0-, 20-, 50-, 80-facher Überschuss), der markierte Antikörper wurde mit einer konstanten Menge von 2 µg/ml eingesetzt. Während als Positivkontrolle für maximale Verdrängung eine Mischung aus der biotinylierten und der nicht biotinylierten Form desselben Antikörpers benutzt wurde, wurde zur Epitopbestimmung ein Antikörper biotinyliert, ein weiterer unmarkiert eingesetzt. Die Menge an gebundenem biotinyliertem Antikörper wurde durch Inkubation mit HRP-gekoppeltem Streptavidin und anschließender ABTS-Substrat-Umsetzung photometrisch quantifiziert.

3.3.4 ELISA zur Quantifizierung von TNF, IL-6, IL-1β, IFN-γ, MIP-2 und RANTES

Die Quantifizierung wurde mit den entsprechenden ELISA-Kits (DuoSet® ELISA Development System, R&D Systems) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Diesen ELISAs liegt das „Sandwich“-Prinzip zugrunde. Zur Probenvorbereitung wurde Zellkulturüberstand abgenommen und bei 13.200 rpm für 5 min zentrifugiert, um eventuell verbliebene Zellen zu pelletieren. Der daraus gewonnene Überstand wurde unverdünnt zur

Quantifizierung eingesetzt. Zur Entwicklung der ELISAs wurde ABTS gelöst in ABTS-Puffer verwendet und die Absorption bei 450 nm gemessen.

3.4 Weitere proteinchemische Methoden

3.4.1 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der DC Protein Assay Kit verwendet. Hierbei handelt es sich um einen colorimetrischen Nachweis von Proteinkonzentrationen in Anlehnung an den bekannten Lowry-Assay. Der Nachweis erreicht 90% der maximalen Farbentwicklung bereits nach 15 min. Der Nachweis basiert auf der Reaktion von Protein mit Kupferartrat-Lösung und Folins-Reagenz. Wie auch beim Lowry-Assay, besteht der BioRad DC Assay Kit aus zwei Stufen, die zur Farbreaktion führen: die Reaktion zwischen Protein und Kupfer in alkalischer Lösung und die nachfolgende Reduktion von Folins-Reagenz durch das Kupfer behandelte Protein. Die Farbreaktion ist primär abhängig von den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, und in einem geringeren Maße von Cystin, Cystein und Histidin. Die Proteine verursachen die Reduktion von Folins-Reagenz durch den Verlust von ein, zwei oder drei Sauerstoffatomen. Daher können mehrere reduzierte Spezies entstehen, mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm und einem bei 405 nm.

Vorgehensweise bei der Versuchsdurchführung: von Proteinstandardlösung (BSA) bzw. den zu bestimmenden Proben wurden je 5 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin wurden 25 µl der alkalischen Kupferartrat-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden 200 µl Folins-Reagenz zugesetzt und für 15 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 650 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamid-Gelen, die aus Sammel- und Trenngel bestanden, aufgetrennt (Laemmli, 1970). Zwischen zwei Glasplatten wurde in den durch einen „Spacer“ entstehenden Raum zuerst das Trenngel gegossen und mit Butanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde die Butanol-Phase entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde je nach Probenanzahl und Volumen eingefügt. Die Proben und der Standard wurden nun mit 4xLämmli-Puffer 5 min bei 95° C erhitzt. Nachdem auch das Trenngel fest war, wurde der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel geladen und die elektrophoretische Auftrennung durchgeführt. Nach dem Laufende wurde das Gel direkt mit Coomassie-Lösung gefärbt oder auf eine PVDF-Membran geblottet (Western Blot).

Die Zusammensetzung der verwendeten Gele war folgende:

	Sammelgel 4%	Trenngel 12,5%	Trenngel 17%
Acrylamid-Stammlsg. (30%)	1,3 ml	8,3 ml	5,0 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml	-----	-----
1,5 M Tris (pH 8,8)	-----	5,0 ml	2,5 ml
10% SDS-Lösung	100 µl	200 µl	100 µl
10% APS-Lösung	100 µl	150 µl	75 µl
TEMED	10 µl	15 µl	7,5 µl
Wasser (demineralisiert)	6,1 ml	6,5 ml	2,4 ml

3.4.3 Coomassie-Färbung

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen oder auf Membranen wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Diese Art der Färbung beruht auf reversibler Anlagerung des Farbstoffs Coomassie (Brilliant) Blue[®] an Amino-Gruppen der Proteine. Membranen wurden zunächst für 5 bis 10 Sekunden in Färbelösung gelegt und anschließend in Entfärbelösung gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Gele wurden eine Stunde in die Färbelösung gelegt und über Nacht entfärbt.

3.4.4 Western Blot

Zur Detektion der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine mittels Western Blot wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert (Towbin, 1979). Dazu wurden jeweils drei Whatmanpapierstücke in Gelgröße in den Transferpuffern A, B und C getränkt. Zunächst wurden je drei Whatmanpapierstücke A und B auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol befeuchtet, für 2 min in Wasser gelegt, für weitere 5 min in Puffer B und anschließend luftblasenfrei auf die Whatmanpapierstücke B gelegt. Danach wurde das Gel, das vorher 15 min in Transferpuffer B lag, aufgelegt und wieder luftblasenfrei mit drei Lagen Whatmanpapier C bedeckt. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1 h bei 0,8 mA pro cm².

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in 0,05% TBS-T mit 10% Magermilchpulver über Nacht bei 4° C blockiert. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper während einer zweistündigen Inkubationszeit detektiert (verdünnt in 0,05% TBS-T mit 5% Magermilchpulver). Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 0,05% TBS-T gewaschen und mit einem sekundären Peroxidase (POX)-gekoppelten Antikörper (verdünnt in 0,05% TBS-T mit 5% Magermilchpulver) für eine Stunde inkubiert.

Vor der Detektion wurde erneut gewaschen (siehe oben). Die Nachweisreaktion beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion (ECL), die durch die POX-katalysierte Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Biosciences) sichtbar gemacht werden. Die Detektion des POX-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System. Die Dauer der Filmexposition variierte zwischen 30 Sekunden und 5 min.

3.4.5 Dot Blot

Beim Dot Blot-Verfahren wurde eine Proteinlösung (in PBS) punktförmig direkt auf eine trockene Nitrocellulosemembran aufgetüpfelt. Diese Membran wurde anschließend über Nacht in 0,05% TBS-T mit 10% Magermilchpulver bei 4° C blockiert. Zur Detektion des Antigens wurde genauso vorgegangen wie mit der PVDF-Membran im Western Blot.

3.4.6 Biotinylierung von Antikörpern

Zur Biotinylierung von Antikörpern wurde ein Biotinyl- ϵ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS) eingesetzt, der spontan bei Zugabe zu Proteinen hydrolysiert und dabei das Biotin-X über eine kovalente Peptidbindung an die ϵ -Aminogruppen der Lysin-Reste koppelt. Der aliphatische ϵ -Aminocapronsäure-Rest (X) zwischen dem Biotin-Molekül und der reaktiven Gruppe fungiert dabei als „Spacer“, um einer sterischen Behinderung zwischen dem IgG-Molekül und dem kleineren Biotin-Molekül entgegenzuwirken.

Das Biotinylierungsreagenz Biotin-X-NHS wurde unmittelbar vor der Reaktion in Dimethylformamid (DMF) gelöst, um die Eigenhydrolyse gering zu halten. Zur Biotinylierung wurden zu 10 mg Antikörper (in 1 ml) 11 mg Biotin-X-NHS in 0,25 ml DMF gegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde anschließend bei 4° C dreimal über Nacht gegen PBS dialysiert.

3.5 Arbeiten mit RNA

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten mit RNA mit Handschuhen durchgeführt. Der Arbeitsplatz wurde vorher mit RNaseZAP[®] behandelt, des weiteren kamen nur sterile Glaswaren, Plastikreaktionsgefäße, gestopfte Pipettenspitzen sowie autoklavierte Lösungen zum Einsatz. Wasser wurde mit 0,1% Diethylpyrocarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag vier Stunden bei 121° C autoklaviert (DEPC-Wasser).

3.5.1 Isolierung von total-RNA aus Zellen

Zur Isolierung von total-RNA aus Zellen wurde TRIzol[®]-Reagenz verwendet. Dazu wurden ca. 5×10^6 Zellen ohne weitere Vorbehandlung in 1 ml TRIzol[®]-Reagenz aufgenommen und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. RNA wurde nach dem Präzipitationsschritt mit Isopropanol durch Zugabe von kaltem 75% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser aufgenommen (auf Eis). Wenn die RNA nicht sofort weiter verarbeitet werden konnte, wurde sie bei -80°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt. Maß für die Reinheit einer RNA-Lösung ist das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge. Der Wert für $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte für RNA zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

3.5.2 Isolierung von total-RNA aus Darmgewebe

Aus dem distalen Teil Dickdarms wurde ein etwa 3-5 mm langes Gewebestück entnommen und bis zur RNA-Isolation in 150 μl RNeasy[®] bei -80°C aufbewahrt. Zur Isolierung von total-RNA aus Maus-Dickdarm wurde dieser zunächst mittels eines Ultra-Turrax-Stabes (IKA Labortechnik) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension durch QIAshredder zentrifugiert und RNA mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Am Ende wurde die gewonnene RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Konzentration und Reinheit der RNA wurden wie in 3.5.1 beschrieben photometrisch ermittelt.

3.5.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) verwendet. Sie synthetisiert DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (complementary DNA, cDNA). Für die reverse Transkription wurden pro Ansatz 1 μg RNA eingesetzt. Diese wurde zu einem Endvolumen von 19,5 μl mit RNase-freiem Wasser verdünnt und im folgenden Reaktionsansatz (Reverse Transcription System, Promega) eingesetzt.

Zusammensetzung des kompletten Reaktionsansatzes (pro Probe):

MgCl ₂	8 μl
10xPuffer	4 μl
dNTPs	4 μl
Random Primer	2 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Reverse Transkriptase	1,5 μl
	= 20,5 μl
+ RNA in RNase-freiem Wasser	19,5 μl
	= 40 μl

Der Ansatz wurde 15 min bei 42° C, anschließend 5 min bei 95° C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert. Zur Amplifizierung spezifischer cDNA-Fragmente durch PCR wurden 2 µl (LightCycler) bzw. 5 µl (PCR auf mLIGHT) der erhaltenen cDNA-Lösung eingesetzt.

3.6 Arbeiten mit DNA

3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Maus-Schwänzen

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden ca. 0,6 cm der Schwänze abgeschnitten und über Nacht bei 56° C in 500 µl Lysepuffer mit 10 µl Proteinase K und 25 µl aktivierter Pronase E (alle Angaben pro Maus-Schwanz) verdaut. Am nächsten Tag wurde der Rest des lysierten Maus-Schwanzes bei 13.200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit gleichem Volumen an Phenol durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde der klare Überstand erneut in ein neues Eppendorf-Cup überführt und wieder mit gleichem Volumen an Phenol gemischt. Nach dem Zentrifugieren (s.o.) wurde nun der vorherige Schritt mit Phenol/ Chloroform zweimal hintereinander durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation mit gleichem Volumen an Chloroform durch Schwenken gemischt und anschließend wieder zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Der so gewonnene klare Überstand wurde vorsichtig, ohne die untere Phase mitzuziehen, in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Die Fällung der DNA erfolgte nun mit 2 Teilen Ethanol (100%, p.a.) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung bei -20° C für 20 min. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 30 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit je 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut bei 13.200 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet 5 bis 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, dann je nach Größe in Nuclease-freiem Wasser resuspendiert und bei 4° C gelagert.

3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.6.2.1 Genotypisierung konditioneller LT β -/- Mäuse

Die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt.

Folgender Reaktionsansatz wurde pro Probe pipettiert:

	B-LT β -/-	T-LT β -/- (I)	T-LT β -/- (II)	„gefloخته LT β “
genomische DNA (0,2 μ g)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
10xPCR-Puffer ¹	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Primer 1 (1:10)	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Primer 2 (1:10)	5 μ l	5 μ l	-----	5 μ l
Primer 3 (1:10)	5 μ l	-----	5 μ l	5 μ l
dNTPs (10 mM) ¹	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Taq-DNA-Polymerase ¹	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Wasser	27 μ l	32 μ l	32 μ l	27 μ l

¹ (von Roche)

In allen vier Fällen wurde folgendes Programm durchgeführt:

Temperatur	Zeit	
94° C	3 min	} 35 Zyklen
94° C	40 s	
62° C	45 s	
72° C	1 min	
72° C	10 min	
4° C	bis Abbruch	

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden anschließend auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

3.6.2.2 PCR auf mLIGHT

Zunächst wurde aus PMMI-Zellen RNA isoliert (siehe 3.5.1), in cDNA umgeschrieben (3.5.3) und pro Probe folgender 50 μ l-Ansatz pipettiert:

	mLIGHT	β -Aktin
cDNA	5 μ l	5 μ l
10xPCR-Puffer ¹	5 μ l	5 μ l
Primer 1 (1:10)	5 μ l	5 μ l
Primer 2 (1:10)	5 μ l	5 μ l
dNTPs (10 mM) ¹	1 μ l	1 μ l
Taq-DNA-Polymerase ¹	1 μ l	1 μ l
Wasser	28 μ l	28 μ l

¹ (von Roche)

In beiden Fällen wurde folgendes Programm durchgeführt:

Temperatur	Zeit	
95° C	5 min	} 35 Zyklen
95° C	1 min	
60° C	1 min	
72° C	1 min	
72° C	10 min	
4° C	bis Abbruch	

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden anschließend auf einem 1% Agarosegel analysiert.

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge erfolgte in Agarosegelen, wobei die Agarosekonzentration 1% betrug. Dazu wurde Agarose in TAE-Laufpuffer aufgeköcht und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 5 μ l Loading Dye Solution versetzt, in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert (30 μ l pro Tasche) und durch Anlegen einer elektrischen Spannung (5-10 V/cm) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragment-Länge wurden zusätzlich entsprechende DNA-Standards (DNA-Molekulargewichtsstandard II, III, X, XIV) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt, auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 245 nm sichtbar gemacht und photographiert.

3.6.4 Quantitative RT-PCR mittels LightCycler

Zur Quantifizierung von mRNA aus Dickdarmgewebe wurde zunächst RNA isoliert (siehe 3.5.2), in cDNA umgeschrieben (siehe 3.5.3) und mittels LightCycler-Technik (Roche) nach Angaben des Herstellers quantifiziert. Hierzu wurde für jede Probe folgender Ansatz hergestellt (Endvolumen jeweils 20 µl pro Probe):

	TNF	IL-6	β-Aktin
cDNA	2 µl	2 µl	2 µl
RNase freies Wasser	10,4 µl	9,6 µl	12,4 µl
MgCl ₂	1,6 µl	2,4 µl	1,6 µl
5´ Primer ¹	2 µl	2 µl	1 µl
3´ Primer ¹	2 µl	2 µl	1 µl
Mastermix (Roche)	2 µl	2 µl	2 µl

¹Die ursprünglichen Primer-Lösungen wurden bei TNF und IL-6 in einer 1:20-Verdünnung eingesetzt, bei β-Aktin wurde eine 1:10-Verdünnung hergestellt.

Beim Umgang mit dem Mastermix musste auf Lichtschutz geachtet werden. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne cDNA pipettiert (dafür Wasser eingesetzt). Der Ansatz wurde gleich in speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries) zusammen pipettiert, dabei wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet und darauf geachtet, dass die Kapillaren nicht am Glas berührt wurden. Die Glaskapillaren wurden anschließend mit dem dafür vorgesehenen Stopfen verschlossen, in den LightCycler Centrifuge Adapter überführt und bei 3.000 rpm für 10 s zentrifugiert. Der Versuchsansatz wurde dann im LightCycler durch folgende Zyklenabfolge (**45x**) amplifiziert:

Denaturierung:	95° C, 5 s
Primerannealing:	62° C, 10 s
Elongation:	72° C, 20 s

Die Auswertung erfolgte am speziellen LightCycler-Programm.

3.7 Zellbiologische Methoden

3.7.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminarflow-Bank) durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37° C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe) kultiviert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen je nach Zelldichte dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 bis 1:20 geteilt. Medienwechsel oder Waschschrte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falconröhrchen 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und anschließend das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert wurde.

3.7.2 Zellkulturmedien

Die verwendeten Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

PMMI:

RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin, 0,004 µg/ml 2-Mercaptoethanol

L929:

RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin

SP2/0-Ag14:

RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin

Hybridome:

- 1.) RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin, 0,1 mmol/l Hypoxanthin, 0,4 µmol/l Aminopterin, 16 µmol/l Thymidin (**HAT-Medium**)
- 2.) RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin, 0,1 mmol/l Hypoxanthin, 16 µmol/l Thymidin (**HT-Medium**)
- 3.) RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin

Primäre Milzzellen bzw. mesenteriale Lymphozyten:

RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin, 0,004 µg/ml 2-Mercaptoethanol

3.7.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 1.200 rpm pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1x10⁶ Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50% RPMI 1640, 40% FCS, 10% Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1,5 ml in Kryoröhrchen gefüllt, diese sofort auf Eis gestellt und bei -80° C in einer Styropor-Box tiefgefroren. Nach einigen Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Sollten tiefgefrorene Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension aufgetaut, in 20 ml kaltem Medium gewaschen, zentrifugiert und in frisches Kulturmedium überführt.

3.7.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Sollten Zellen in einer definierten Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät werden, wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden meist 50 µl einer Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt (bei sehr konzentrierten Zellsuspensionen wurde stärker verdünnt). In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl an lebenden Zellen, die sich nicht durch Trypanblau-Lösung anfärben ließen, gezählt. Aus statistischen Gründen sollte eine Zählung zwischen 20 und 50 Zellen ergeben.

Die Zellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Anzahl der Zellen pro ml

3.7.5 Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe einer DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nicht-kontaminierte Zellen zeigten nur eine Kernfärbung, wohingegen eine Mycoplasmen-Kontamination durch eine starke Färbung der Mykoplasmen-DNA außerhalb des Kerns ersichtlich war.

3.7.6 Stimulierungsexperimente mit L929-Zellen

Mit Hilfe dieses Versuches wurden L929-Zellen zur Freisetzung von IL-6 angeregt. Dazu wurden 1×10^5 Zellen/ml in einer 12-Well-Platte ausgesät (500 µl pro Well) und 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurde mit 10 µg/ml S2-exprimiertem mLIGHT bzw. mit mLIGHT, das zuvor 2 h bei Raumtemperatur mit den monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörpern vorinkubiert worden war, stimuliert. Für jeden Stimulierungsansatz wurden Doppelwerte ermittelt. Nach 24 h Stimulierungszeit wurden die Kulturüberstände abgenommen, durch Zentrifugation (13.200 rpm, 5 min, Raumtemperatur) von Zellen befreit und mittels ELISA die Konzentration von IL-6 bestimmt.

3.7.7 Gewinnung einer Zellsuspension aus mesenterialen Lymphknoten bzw. Milzen

Am Ende der Colitis-Induktion wurden die Mäuse durch Genickzug getötet, mit 70% Ethanol angefeuchtet, mesenteriale Lymphknoten (mLN) bzw. Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen und in sterilen 50 ml Falconröhrchen (mit 30 ml RPMI 1640, 10% FCS, 50 µg/ml Gentamycin, 0,004 µg/ml 2-Mercaptoethanol) auf Eis zwischengelagert. Die mLN bzw.

Milzen wurden anschließend unter sterilen Bedingungen sorgfältig durch ein Metall-Zellsieb gedrückt, um die Zellen in Suspension zu bringen. Nach zwei Waschschritten mit kaltem Medium und anschließender Zentrifugation bei 1.200 rpm, 5 min, 4° C wurden die Zellen gezählt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in 12-Well-Platten mit 1×10^7 Zellen pro ml (1 ml pro Well) ausgesät und 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände abgenommen, durch Zentrifugation (13.200 rpm, 5 min, Raumtemperatur) von Zellen befreit und mittels ELISA die Konzentration von TNF, IL-6, IL1 β , IFN- γ , MIP-2 und RANTES bestimmt.

3.7.8 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem FACScan Flow Cytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt, als Listmode-Dateien gespeichert und die Auswertung in WinMDI 2.8 vorgenommen. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC-, PE- und APC-Farbstoffe. Außerdem wurden die Zellen kurz vor der Messung mit Propidium-Iodid (PI), einem DNA-Farbstoff, versetzt, um PI-positive und damit tote Zellen ausschließen zu können. Für die Belegung der verschiedenen Kanäle des FACScan Durchflusszytometers ergibt sich demnach:

1. Forward Scatter (FSC)	Zellform/ Zellgröße
2. Sideward Scatter (SSC)	Granularität
3. Fluoreszenzkanal 1 (FL1-H)	FITC-Fluoreszenzintensität
4. Fluoreszenzkanal 2 (FL2-H)	PE-Fluoreszenzintensität
5. Fluoreszenzkanal 3 (FL3-H)	PI-Fluoreszenzintensität
6. Fluoreszenzkanal 4 (FL4-H)	APC-Fluoreszenzintensität

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Zur FACS-Untersuchung wurden die Zellen mit PBS/10% FCS gewaschen, auf FACS-Röhrchen verteilt (ca. 0,5 bis 1×10^6 Zellen pro Röhrchen), bei 1.200 rpm, 5 min, 4° C pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Anschließend folgte ein Blockierungsschritt, durch den unspezifische Bindungen der Antikörper verringert werden sollten. Im Falle der primären CD8⁺ T-Zellen erfolgte der Block für 20 min und in 50 μ l Volumen mit einem spezifischen Antikörper gegen die Fc γ -Rezeptoren II und III in PBS/10% FCS, im Falle der PMMI-Zellen mit Ziegen-Serum (1:100 in PBS/10% FCS) in 100 μ l Volumen. Bei den primären CD8⁺ T-Zellen wurden anschließend die Antikörper in weiteren 50 μ l PBS/10% FCS zugegeben, womit das Reaktionsvolumen für die Färbung 100 μ l betrug. Bei den PMMI-Zellen wurde noch mal zentrifugiert (siehe oben), der Überstand abgenommen und 500 μ l Hybridom-Überstand zugegeben. Nach Inkubation für 1 h auf Eis wurden die Zellen pelletiert und der Überstand abgenommen. Es folgte ein Waschschriff der

Zellen in 4 ml PBS/10% FCS mit anschließender Zentrifugation. Bei nicht direkt Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgt eine 30-minütige zweite Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der ebenfalls durch einen Waschschrift (siehe oben) wieder entfernt wurde. Sämtliche Inkubationen wurden auf Eis und, sobald Fluoreszenz-markierte Antikörper beteiligt waren, im Dunkeln durchgeführt. Zur Messung wurden die Zellen in 250 μ l PBS/10% FCS aufgenommen. Kurz vor der Messung wurden die Proben mit PI-Lösung versetzt, um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen vornehmen zu können.

3.7.9 MACS-Reinigung

Zur Anreicherung von primären CD8⁺ T-Zellen aus 3 Maus-Milzen wurde zunächst anhaftendes Bindegewebe entfernt, das Organ dann auf einer Seite aufgeschnitten und die Zellen vorsichtig mit einer Pinzette aus der Organhülle ausgestrichen. Die Gewebestücke wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt und diese durch Filtration über ein Zellsieb (Maschenweite 40 μ m) von übrig gebliebenen, größeren Aggregaten befreit. Nach einem Waschschrift in RPMI-Medium/10% FCS wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und die enthaltenen Erythrozyten durch hypotone Lyse mittels ACK-Puffer (5 ml, 4 min) entfernt. Nach Abstoppen der Lyse mit 45 ml RPMI-Medium/10% FCS und einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen erneut über ein Zellsieb filtriert, um bei der Lyse entstandene Zellklumpen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen gezählt, pelletiert und pro 1×10^8 Zellen 900 μ l PBS/10% FCS und 100 μ l CD8a MicroBeads zugegeben. Die Inkubation mit den Magnet-gekoppelten Beads erfolgte für 20 min auf Eis. Die Zellen wurden dann in 50 ml MACS-Puffer gewaschen, erneut filtriert, pelletiert und in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung der CD8⁺, mit magnetischen Beads versehenen T-Zellen erfolgte durch Bindung an eine im magnetischen Feld befindliche MACS Separations-Säule, die vorher mit MACS-Puffer equilibriert wurde. In drei Waschschriften mit je 3 ml MACS-Puffer wurden die CD8⁻, unspezifisch haftenden Zellen von der Säule gespült. Nachdem die MACS-Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, konnte die CD8⁺-Fraktion eluiert, mit PBS/10% FCS rekonstituiert und gezählt werden. Die Reanalyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Zur Stimulierung der CD8⁺ T-Zellen wurde eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Ein Teil der Zellen wurde auf einer 24-Well-Platte, die über Nacht bei 4° C mit 1 μ g/ml anti-CD3 Antikörper beschichtet worden war, mit je 1 ml pro Kultur ausgesät und zusätzlich mit 1 μ g/ml löslichem anti-CD28 Antikörper versetzt. Ein zweiter Teil der CD8⁺ T-Zellen wurde mit 50 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin stimuliert (24-Well-Platte, 1 ml pro Well), ein dritter Teil wurde nicht stimuliert. Anschließend wurden alle drei Gruppen von CD8⁺ T-Zellen für 3 h inkubiert, bevor eine durchflusszytometrische Analyse vorgenommen wurde.

3.8 Untersuchung von Patienten-Seren

Serumproben von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten und von Kontrollprobanden wurden von der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Klinikums der Universität Regensburg bezogen. Die Patienten wurden über die Studie informiert und nur mit ihrer Zustimmung wurden die Seren untersucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität geprüft und genehmigt.

Untersucht wurden Serumproben von Colitis ulcerosa-Patienten mit akutem Schub (CUA) bzw. mit chronischer Entzündung (CUC) und von Morbus Crohn-Patienten mit akutem Schub (MCA) bzw. mit chronischer Entzündung (MCC). Der Immunstatus der Patienten sollte möglichst der realen, unbehandelten Krankheitssituation entsprechen, daher wurden Patienten mit Glukokortikoid-, anti-TNF- oder immunsuppressiver Therapie nicht in die Studie mit eingeschlossen. Als Kontrollgruppe wurde das Serum von „Darm-gesunden“ Probanden verwendet.

Zur Serumgewinnung wurde das Blut bei 3.000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in Aliquots bei -20° C gelagert. Mittels Human-LIGHT Quantikine[®]-ELISA (R&D Systems) wurden die Serumproben nach den Vorschriften des Herstellers auf die Konzentration an hLIGHT untersucht.

3.9 Statistik

Die Ergebnisse der Tierexperimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden in allen untersuchten Parametern mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test bestimmt. Statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS Version 10.0 durchgeführt (SPSS, Chicago).

4. Ergebnisse

4.1 $LT\alpha\beta$ -/- Mäuse in DSS-induzierter Colitis

Um die Aktivierung des $LT\beta R$ in akuter und chronischer Colitis untersuchen zu können, wurden verschiedene gendefiziente Mäuse, in erster Linie Ligand-defiziente Mäuse, in DSS-induzierter Colitis charakterisiert. Es sollte geklärt werden, welcher Ligand des $LT\beta R$ auf welchen Zellen zur intestinalen Entzündung beiträgt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die Blockade des $LT\beta R$ mit Hilfe eines $LT\beta R$ -Ig Fusionsproteins in der chronischen DSS-induzierten Colitis zu einer signifikanten Reduktion der intestinalen Entzündung (Stopfer, 2004), in der akuten DSS-Colitis zu einer Verschlimmerung der Entzündung führte (Manuskript eingereicht).

Bei den hier eingesetzten $LT\alpha\beta$ -/- Mäusen fehlen beide LT-Moleküle. Es fehlt somit sowohl die Interaktion von $LT\alpha_1\beta_2$ mit dem $LT\beta R$, als auch die Interaktionen von $LT\alpha_3$ mit HVEM und den beiden TNF-Rezeptoren (TNFR), sowie eine mögliche, aber bisher nicht nachgewiesene Interaktion von $LT\alpha_2\beta_1$ mit den TNFR.

4.1.1 $LT\alpha\beta$ -/- Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis

$LT\alpha\beta$ -/- Mäuse (genetischer Hintergrund C57BL/6) und C57BL/6-Kontrollmäuse (WT-Mäuse) mit einem Körpergewicht von > 22 g erhielten 7 Tage DSS gelöst im Trinkwasser. Täglich erfolgte die Bestimmung des Körpergewichts, um den Schweregrad der induzierten Diarrhö verfolgen zu können.

4.1.1.1 Gewichtsverlust

Die $LT\alpha\beta$ -/- Mäuse zeigten an den letzten beiden Tagen der DSS-Verabreichung starken Durchfall mit blutigem Stuhl. Diesen Mäusen ging es im Verlauf der DSS-Gabe zunehmend sichtbar schlechter (struppiges Fell, langsamere Bewegungen). Hinsichtlich des Gewichtsverlustes zeichnete sich an den Tagen 6 und 7 eine signifikant größere Abnahme in der $LT\alpha\beta$ -/- Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe ab (Abb. 4-1).

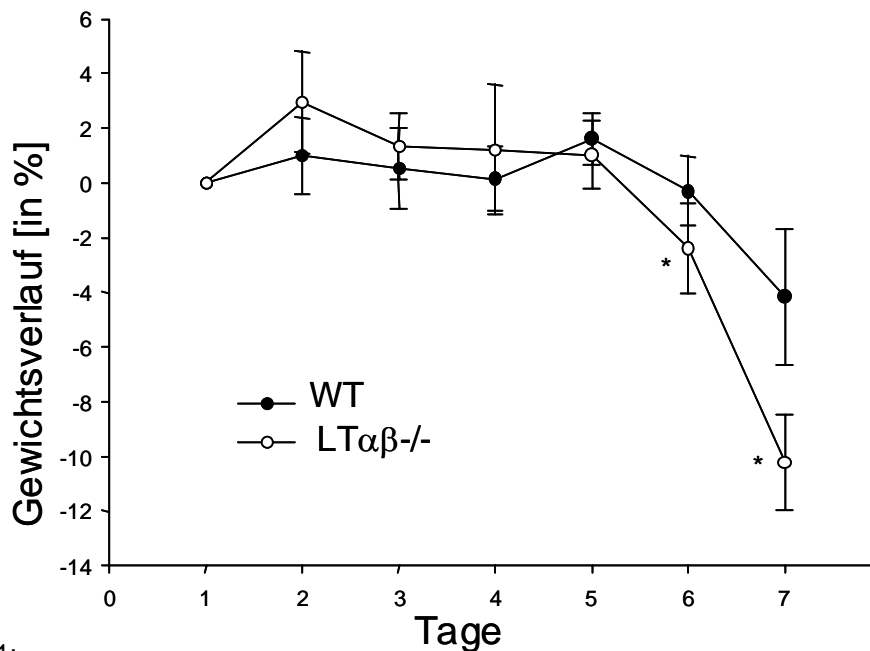


Abbildung 4-1:

Gewichtsverlust der LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäuse während der DSS-induzierten akuten Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % des ursprünglichen Gewichts der Mäuse (n=10). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die ermittelten Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$

4.1.1.2 Histologie und histologischer Score

Die aussagekräftigsten Entzündungsparameter nach einer akuten Colitis sind die Histologie und der daraus abgeleitete histologische Score. An ihm lassen sich die charakteristischen Zeichen einer intestinalen Entzündung ablesen, wie Verlust von Becherzellen und Krypten, aber auch entzündliches Infiltrat. Dieses entzündliche Infiltrat besteht nach einer akuten Colitis überwiegend aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, aber auch vereinzelt aus Lymphozyten. Die LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäuse zeigten einen flächenhaften Verlust von Becherzellen und Krypten nach sieben Tagen DSS-Gabe. Außerdem wurde ein ausgedehntes entzündliches Infiltrat, das bis in die Submucosa reichte, sichtbar (Abb. 4-2A). In der WT-Kontrollgruppe fand sich lediglich ein Verlust von Becherzellen und Infiltrat zwischen den Krypten und bis in die Muscularis Mucosae. Diese Beobachtungen, die im distalen Bereich des Dickdarms gemacht wurden, sind im histologischen Score dargestellt (Abb. 4-2B). Am Tag sieben der DSS-induzierten Colitis war der histologische Score der LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe signifikant erhöht.

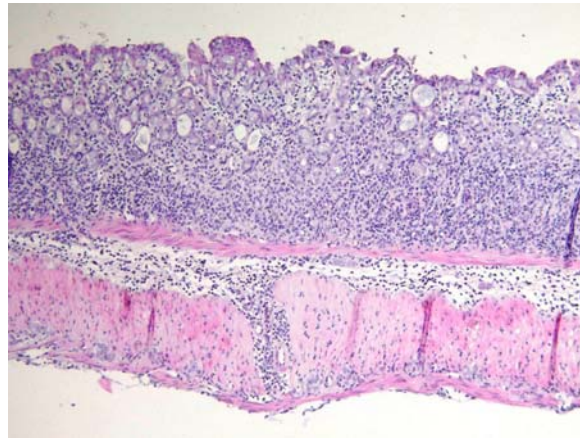
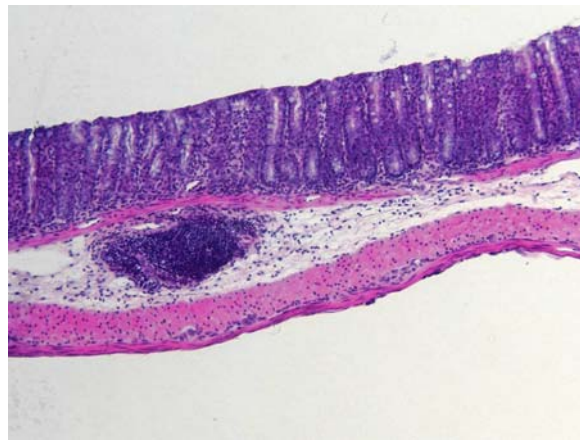
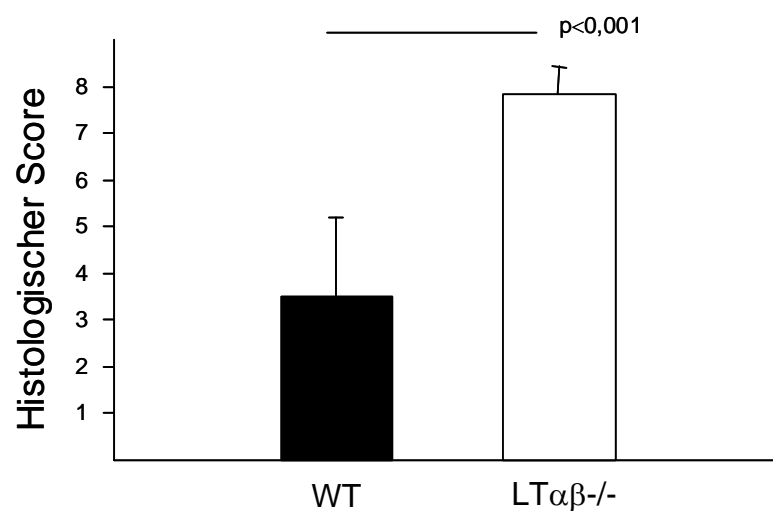
A**LT $\alpha\beta$ ^{-/-}****WT****B**

Abbildung 4-2:

Histologie und histologischer Score der LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe (Tag 7). A) Repräsentative histologische Schnitte der distalen Dickdarmbereiche nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin (Vergrößerung x100). B) Histologischer Score der Mäuse im distalen Dickdarmbereich aus A) beurteilt (n=10). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.1.3 Lymphfollikel-Anzahl

Interessant bei den $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen war die Tatsache, dass sie während einer DSS-induzierten Colitis nicht in der Lage waren, tertiäre Lymphfollikel („colonic lymphoid follicles“ oder „colonic patches“) auszubilden. Die Bildung dieser Strukturen wird durch intestinale Entzündung ausgelöst, eine ansteigende Lymphfollikel-Anzahl ist somit ein weiterer Entzündungsparameter des Dickdarms (Spahn, 2002). Während die $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse keine Lymphfollikel ausbilden konnten, zeigte sich jedoch eine signifikant erhöhte Anzahl in der WT-Kontrollgruppe (Abb. 4-3).

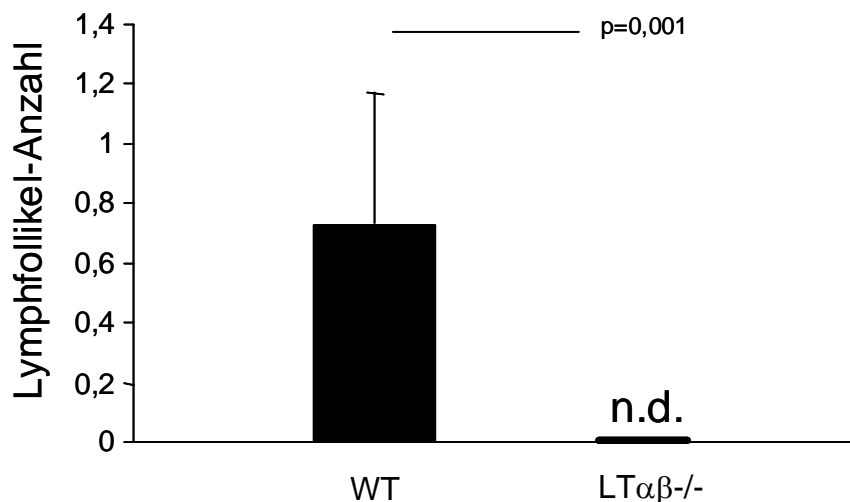


Abbildung 4-3:

Lymphfollikel-Anzahl von $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe (Tag 7). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=10). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität

Um abzuklären, ob diese starke Entzündung in den $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen auch auf ein verstärktes Einwandern von Granulozyten zurückzuführen ist, wurde die Aktivität von Myeloperoxidase (ein Enzym in neutrophilen Granulozyten) bestimmt. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Enzym-Aktivität in den $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe (Abb. 4-4), was auf einen hohen Anteil an neutrophilen Granulozyten im Dickdarmgewebe der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse schließen lässt.

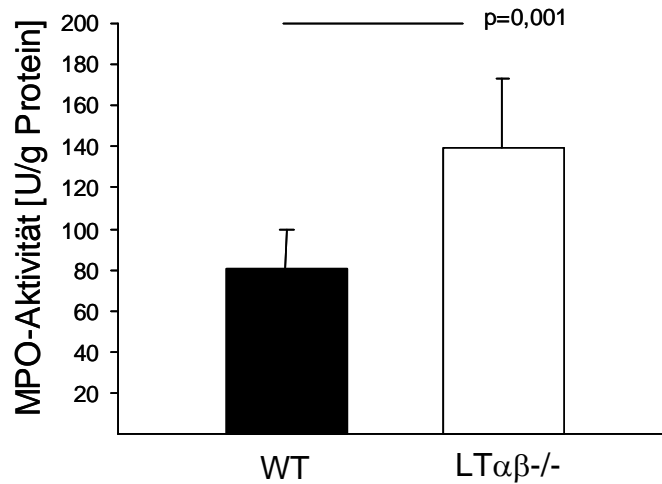


Abbildung 4-4:

Myeloperoxidase-Aktivität von $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe (Tag 7), angegeben in Einheiten pro g Gesamtprotein. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt ($n=10$). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.1.5 Dickdarmlänge

Ein leicht messbarer Entzündungsparameter nach DSS-induzierter Colitis ist die Länge des Dickdarms. Mit zunehmender intestinaler Entzündung nimmt die Dickdarmlänge aufgrund von Ödemen und Schwellungen ab. Am Tag 7 der DSS-Colitis wiesen die $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse einen signifikant verkürzten Dickdarm gegenüber den Kontrollmäusen auf (Abb. 4-5).

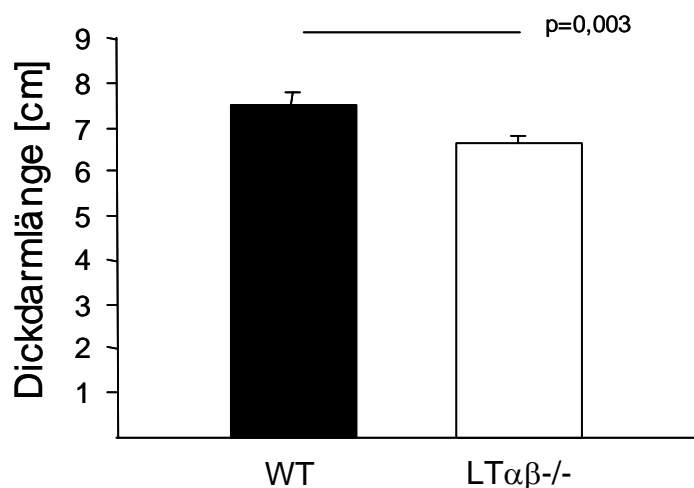


Abbildung 4-5:

Dickdarmlänge der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe (Tag 7), angegeben in cm. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=10$). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.1.6 Zytokinsekretion von Milzzellen

Des weiteren wurde in $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen die Produktionsfähigkeit für Zytokine und Chemokine untersucht. Da diese Mäuse keine mesenterialen Lymphknoten besitzen, wurden hier Milzzellen verwendet. Nach der Induktion der akuten Colitis wurden am Tag 7 die Milzen entnommen, eine Zellsuspension hergestellt und 24 h ohne Stimulierung inkubiert. Die daraus resultierenden Zellkulturüberstände wurden auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ , IL-1 β und RANTES untersucht. Die Konzentration dieser Parameter war in der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe deutlich erhöht (Tabelle 4-1).

	WT [in pg/ml]	$LT\alpha\beta^{-/-}$ [in pg/ml]
TNF	< 20	60 \pm 14
IL-6	385 \pm 38	800 \pm 58
IFN-γ	< 20	524 \pm 64
IL-1β	< 20	60 \pm 11
RANTES	607 \pm 31	642 \pm 40

Tabelle 4-1:

Zytokinsekretion von Milzzellen der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Am Tag 7 wurden die Milzen entnommen (pro Gruppe gepoolt), Einzelzellsuspensionen hergestellt und 10^7 Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ , IL-1 β und RANTES untersucht. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.2 $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis

$LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse wurden auch im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis untersucht. Nachdem es den gendefizienten Mäusen auch bei der Induktion dieser Form der Colitis sehr schlecht ging, erhielten sie vier verkürzte DSS-Zyklen (erster Zyklus sieben Tage, anschließend 4-tägige Zyklen), dazwischen jeweils 12-14 Tage normales Trinkwasser. Diese Abweichung des Standard-Protokolls wurde vorgenommen, um ein Sterben der Tiere zu vermeiden.

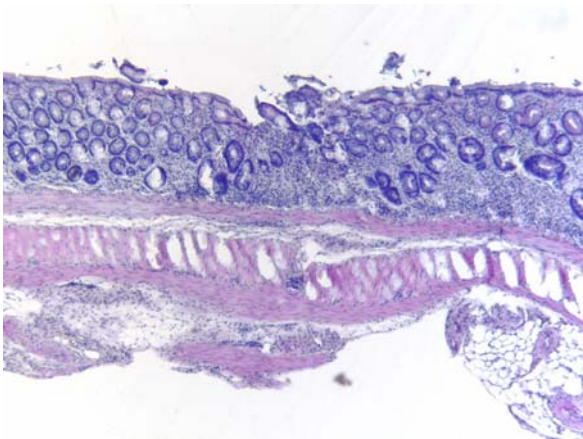
Ab Tag 5 des ersten DSS-Zykluses wurde bei den $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen starker Durchfall beobachtet, der sich bis zum Ende des Versuchs fortsetzte. Auch während der Wasser-Zyklen war keine deutliche Verbesserung zu erkennen. Diese gendefizienten Mäuse zeigten also keine Zeichen der Regeneration. Bei den Kontrollmäusen dagegen war nur jeweils am Ende der DSS-Zyklen leichter Durchfall zu beobachten, der während der Wasser-Gabe sehr schnell verschwand.

4.1.2.1 Histologie und histologischer Score

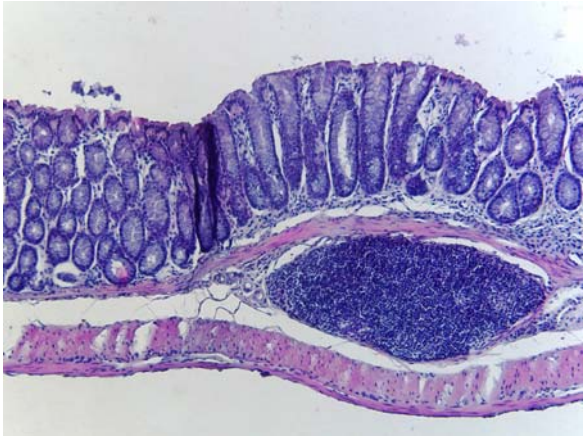
Etwa 2-3 Wochen nach Beendigung des letzten DSS-Zykluses zeigten die $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse einen flächenhaften Verlust von Becherzellen und vereinzelt Kryptenverlust. Außerdem wurde ein ausgedehntes entzündliches Infiltrat, das bis in die Submucosa reichte, sichtbar (Abb. 4-6A). Normalerweise besteht dieses Infiltrat bei einer chronischen Colitis vor allem aus Lymphozyten, bei den $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen fand sich aber noch ein erstaunlich hoher Anteil an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im Infiltrat (Abb. 4-6B). Dies zeigt, dass diese Mäuse nicht vollständig in eine chronische Colitis übergegangen waren, sie wiesen also noch deutliche Anzeichen einer akuten Entzündung auf. 75% der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse zeigten eine Ausbildung von Dysplasien im Colon.

In der Kontrollgruppe fand sich lediglich ein Verlust einzelner Becherzellen, die Epithelschicht des Darms war also in der DSS-induzierten chronischen Colitis weniger angegriffen als in der akuten Colitis. Leichtes Infiltrat zwischen den Krypten, das überwiegend aus Lymphozyten bestand, war zu sehen. Diese Beobachtungen aus dem distalen Bereich des Dickdarms sind im histologischen Score zusammenfassend gezeigt (Abb. 4-6C). Nach der DSS-induzierten chronischen Colitis war der histologische Score in der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

A

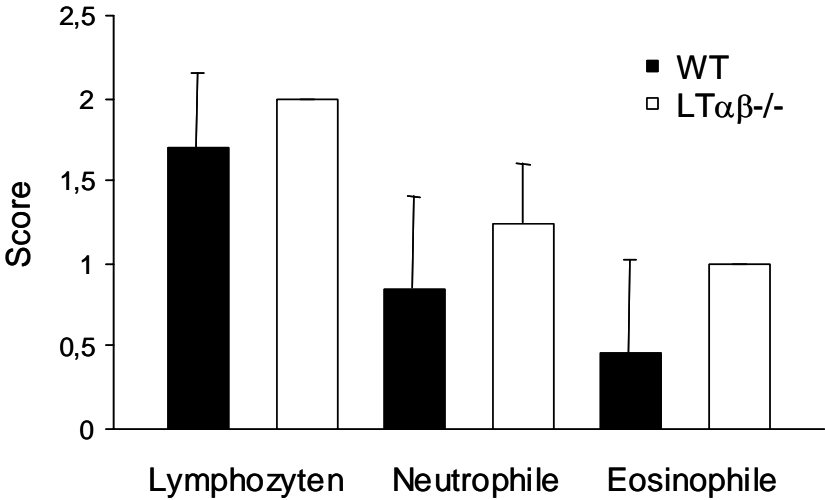


LT $\alpha\beta$ ^{-/-}



WT

B



C

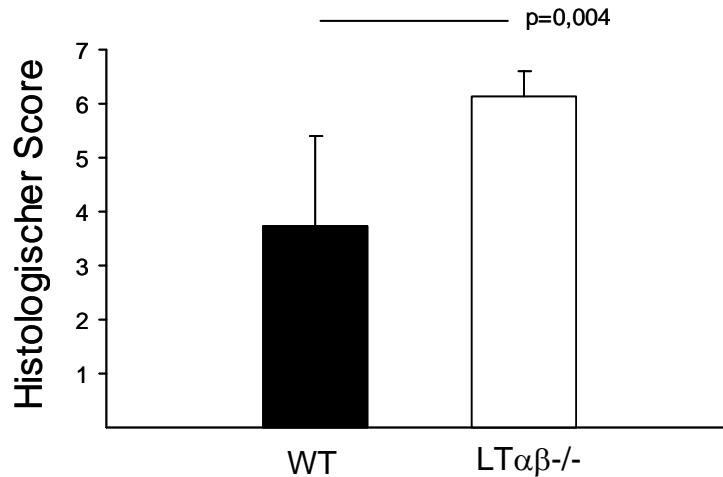


Abbildung 4-6:

Histologie und histologischer Score der LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. A) Repräsentative histologische Schnitte der distalen Dickdarmbereiche nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin (Vergrößerung x100). B) Anteile der infiltrierenden Zellen im Dickdarm (getrennt nach Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen). C) Histologischer Score der Mäuse im distalen Dickdarmbereich (n=10). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.2.2 Lymphfollikel-Anzahl

Auch in diesem Colitis-Modell waren keine tertiären Lymphfollikel bei den LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäusen zu finden. Daher zeigte sich hier wieder eine signifikant erhöhte Lymphfollikel-Anzahl in der WT-Kontrollgruppe (Abb. 4-7).

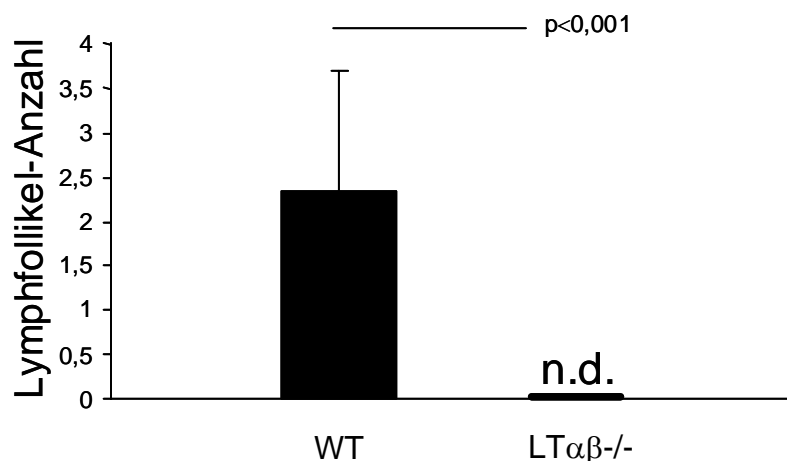


Abbildung 4-7:

Lymphfollikel-Anzahl von LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=10). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.2.3 Dickdarmlänge

Auch nach DSS-induzierter chronischer Colitis hatten die $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse einen verkürzten Dickdarm im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 4-8).

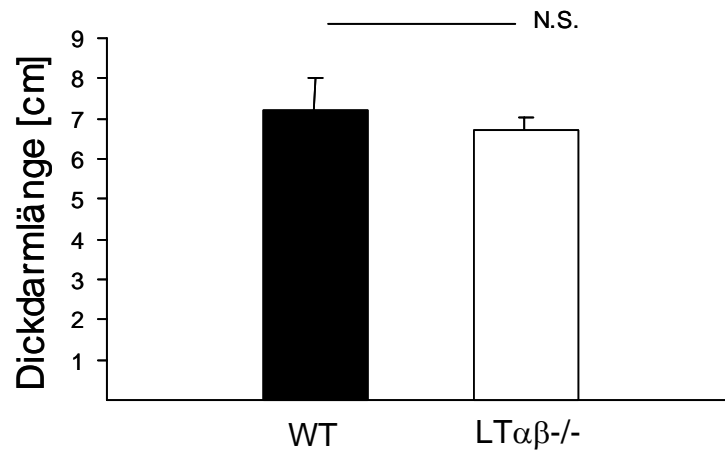


Abbildung 4-8:

Dickdarmlänge der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe, angegeben in cm. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=10). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.1.2.4 Zytokinsekretion von Milzzellen

Um die Produktionsfähigkeit für Zytokine und Chemokine in $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen nach der chronischen DSS-induzierten Colitis zu untersuchen, wurden nach der Induktion der Colitis die Milzen entnommen. Eine Zellsuspension wurde hergestellt, und nach 24 h Inkubation ohne Stimulierung wurden die Überstände der Zellkultur auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ , MIP-2 und RANTES untersucht. Die Konzentration dieser Parameter war in der $LT\alpha\beta^{-/-}$ Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe wiederum deutlich erhöht (Tabelle 4-2).

	WT [in pg/ml]	LT$\alpha\beta$-/- [in pg/ml]
TNF	499 \pm 51	675 \pm 38
IL-6	76 \pm 14	2787 \pm 116
IFN-γ	2547 \pm 238	2985 \pm 129
MIP-2	< 20	1585 \pm 67
RANTES	89 \pm 16	934 \pm 189

Tabelle 4-2:

Zytokinsekretion von Milzzellen der LT $\alpha\beta$ -/- Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Milzen wurden entnommen (pro Gruppe vereint), Einzelzellsuspensionen hergestellt und 10^7 Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ , MIP-2 und RANTES untersucht. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.2 Konditionelle LT β -/- Mäuse in DSS-induzierter Colitis

Offensichtlich ist nach diesen Erkenntnissen die Aktivierung des LT β R über LT $\alpha_1\beta_2$ wichtig, um eine intestinale Entzündung in Schach halten zu können. Wie gezeigt, ging es den LT $\alpha\beta$ -/- Mäusen in beiden Colitis-Modellen sehr schlecht. Da LT in erster Linie auf aktivierten B-, T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird, sollte als nächstes geklärt werden, welcher Art von Lymphozyten die entscheidende Rolle zukommt, oder ob T- und B-Zellen gleichermaßen beteiligt sind.

Für diese Untersuchung standen konditionelle LT β -/- Mäuse zur Verfügung: B-LT β -/- Mäuse, die kein LT β (also somit kein LT $\alpha_1\beta_2$) auf B-Lymphozyten tragen und T-LT β -/- Mäuse, die kein LT β auf T-Lymphozyten tragen.

4.2.1 Zucht der konditionellen LT β -/- Mäuse

Zunächst soll die Zucht der konditionellen LT β -/- Mäuse erläutert werden. Die Grundlage der beiden konditionellen gendefizienten Linien ist das Cre/ loxP-System. Das Zielgen, hier LT β , wird von 2 loxP-Erkennungssequenzen flankiert („floxed LT β “). Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym, das Gensequenzen, die zwischen den beiden loxP-Sequenzen liegen, heraus schneidet. Wenn die Inaktivierung des Zielgens nur in bestimmten Zellen (hier: B- oder T-Lymphozyten) erfolgen soll, wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Zelltyp-

spezifischen Promotors exprimiert. Somit wird dieses Enzym nur in den Zellen produziert, in denen das Zielgen deletiert werden soll.

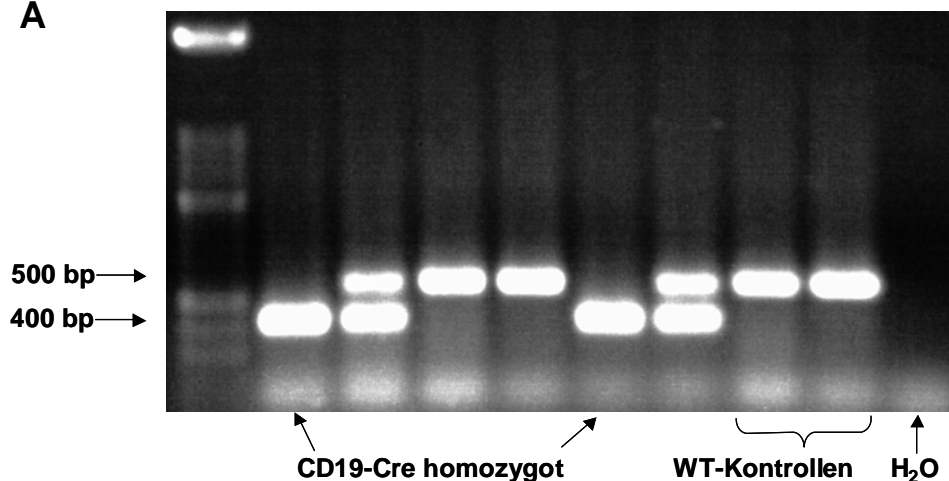
Als B-Zell-spezifischer Promotor wurde bei den B-LT β ^{-/-} Mäusen CD19 verwendet. CD19 wird nur auf B-Zellen exprimiert, dies geschieht bereits sehr früh in deren Entwicklung und bleibt während der ganzen Reifung und Differenzierung der B-Zellen erhalten (Rickert, 1997). Um eine CD19-spezifische Expression von Cre zu erreichen, wurde Cre in das zweite Exon von CD19 inseriert („CD19 knock-in“). Heterozygote CD19-Cre Mäuse besitzen somit noch ein funktionelles CD19-Allel, sind phänotypisch normal und können für B-Zell-spezifische Deletion bestimmter Gene genutzt werden. Homozygote CD19-Cre Mäuse sind CD19-defiziente Mäuse, da beide CD19-Allele durch Cre-Insertion zerstört wurden. Dies ist bei der Zucht konditioneller gendefizienter Mäuse nicht erwünscht und muss durch Genotypisierung ausgeschlossen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten B-LT β ^{-/-} Mäuse besitzen folgenden Genotyp (Tumanov, 2003):



Das heißt, das LT β -Gen ist homozygot „gefloxt“ und die Cre-Insertion erfolgte in nur ein CD19-Allel (CD19-Cre heterozygot). Bei Zuchtstart wurden die Mäuse mit dem oben gezeigten Genotyp zunächst untereinander verpaart, um (unter anderem) LT $\beta^{\text{flox/flox}}\text{CD19}^{\text{Cre/Cre}}$ -Mäuse (CD19-Cre homozygot) für die weitere Zucht zu erhalten. Die Genotypisierung erfolgte auf CD19-Cre, wobei homozygote CD19-Cre Mäuse eine Bande bei 400 bp zeigen (Abb. 4-9A).

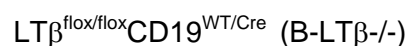
A



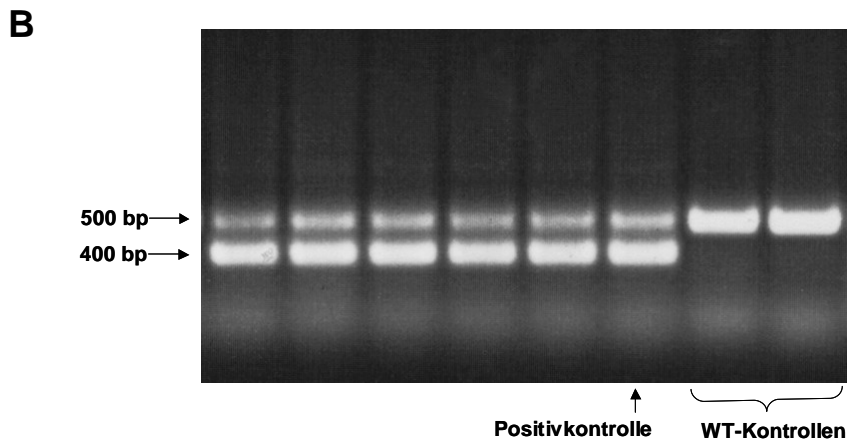
Diese Mäuse wurden schließlich wie folgt verpaart:



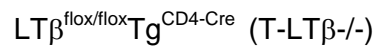
Alle Nachkommen dieser Verpaarung besitzen den gewünschten Genotyp:



Diese B-LT $\beta^{-/-}$ Mäuse wurden bei den nachfolgend gezeigten Versuchen verwendet, wobei Mäuse mit dem richtigen Genotyp, also heterozygote CD19-Cre Mäuse, eine Bande bei 400 bp (CD19-Cre) und eine Bande bei 500 bp (WT CD19) zeigen (Abb. 4-9B).



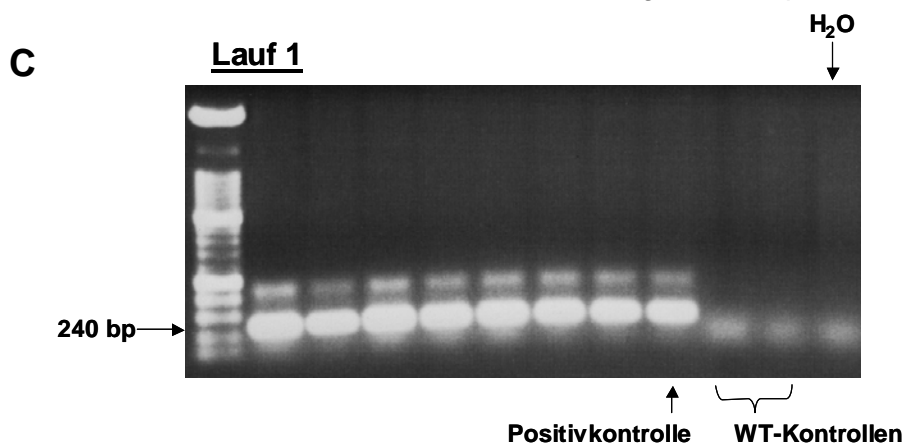
T-LT $\beta^{-/-}$ Mäuse exprimieren den T-Zell-spezifischen Promotor CD4. CD4-Cre wurde bei dieser Linie aber als Transgen integriert, das heißt, irgendwo im Genom. T-LT $\beta^{-/-}$ Mäuse besitzen also folgenden Genotyp:

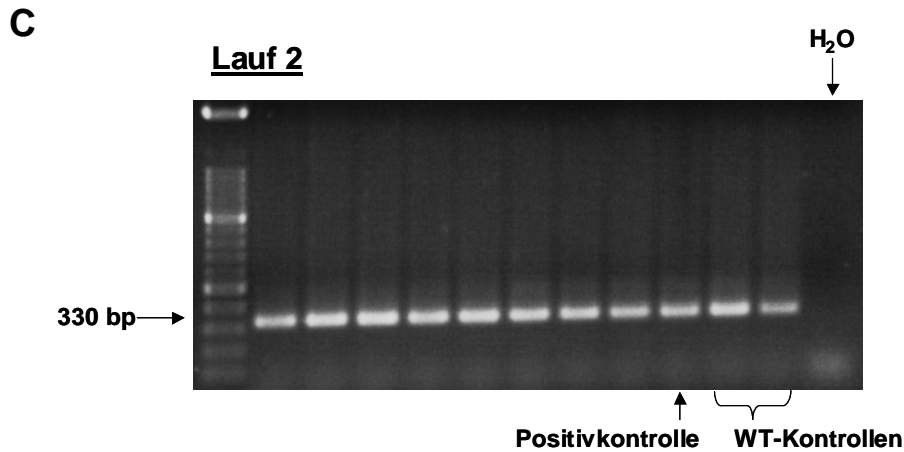


Diese Mäuse werden wie folgt gezüchtet:



Die Nachkommen dieser Zucht müssen auf das Vorhandensein des CD4-Cre-Transgens genotypisiert werden, denn nur etwa 50% der Nachkommen sind rein statistisch Transgen-positiv. Dabei kann nicht festgestellt werden, ob die Mäuse homozygot oder heterozygot für das CD4-Cre-Transgen sind. Die Genotypisierung erfolgte auf CD4-Cre, wobei zwei verschiedene PCR-Läufe durchgeführt werden mussten. Lauf 1 mit den Primern CD4cre1 und CD4cre2 weist das CD4-Cre-Transgen bei 240 bp nach. Lauf 2 erfolgte mit den Primern CD4cre1 und CD4cre3 zum Nachweis des Wildtyp-CD4 bei 330 bp. Ein PCR-Lauf mit allen drei Primern funktionierte nicht, die Wildtyp-CD4-Bande war nicht mehr zu sehen. Mäuse mit dem richtigen Genotyp (T-LT $\beta^{-/-}$) müssen beide Banden zeigen. Dies ist in Abb. 4-9C dargestellt, alle Nachkommen sind hier CD4-Cre-transgen und exprimieren Wildtyp-CD4.





Jeder zweite bis dritte Wurf einer Zucht beider konditioneller $LT\beta$ -defizienter Linien wurde auf das „Noch-Vorhandensein“ des „gefloxten $LT\beta$ “ überprüft. Wie in Abb. 4-9D gezeigt, müssen alle homozygot „gefloxten“ Tiere eine Bande bei 250 bp aufweisen, die WT-Kontrollen eine Bande bei 200 bp (Wildtyp $LT\beta$).

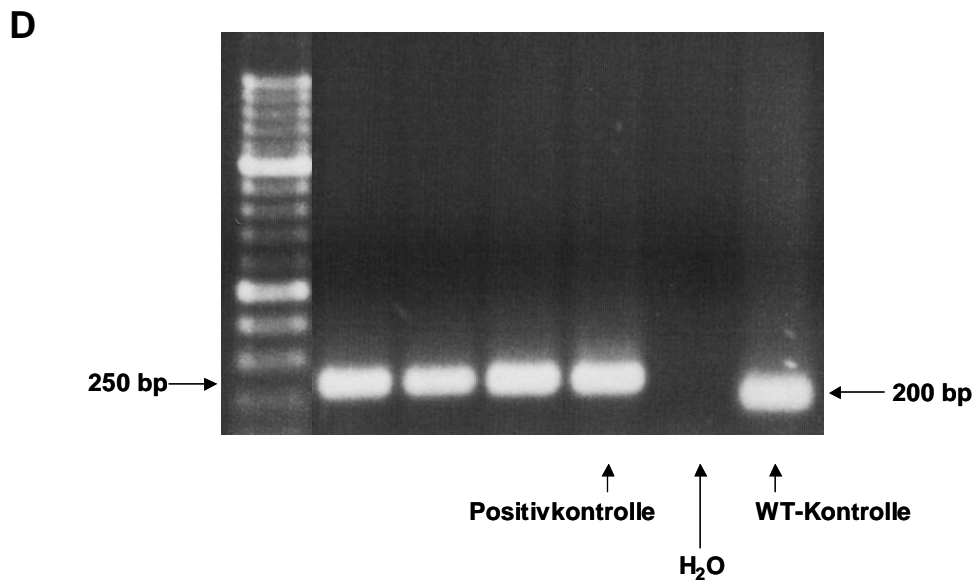
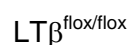


Abbildung 4-9:

Genotypisierung der konditionellen $LT\beta^{-/-}$ Mäuse. A) Nachkommen der Zucht auf $LT\beta^{flox/flox}CD19^{Cre/Cre}$ B) B- $LT\beta^{-/-}$ Mäuse, C) T- $LT\beta^{-/-}$ Mäuse, D) „gefloxte $LT\beta$ “ Mäuse. Alle gezeigten WT-Kontrollen sind von C57BL/6-Mäusen. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von DNA pipettiert, die DNA-Positivkontrollen stammen jeweils von original „Nedospasov-Mäusen“ (typisiert und mit dem richtigen Genotyp ausgewiesen).

Als Kontrollmäuse für die nachfolgend erläuterten Colitis-Experimente dienten „gefloxte $LT\beta$ “ Mäuse mit folgendem Genotyp:



4.2.2 Konditionelle $LT\beta^{-/-}$ Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis

B- und T- $LT\beta^{-/-}$ Mäuse und die Kontrollgruppe erhielten über sieben Tage DSS im Trinkwasser. Gegen Ende der Woche konnte in der T- $LT\beta^{-/-}$ Gruppe starker Durchfall beobachtet werden, die Kontrollgruppe zeigte mäßigen Durchfall und die B- $LT\beta^{-/-}$ Mäuse normalen Stuhl. Diese Beobachtung wurde durch die Entzündungsparameter des Dickdarms bestätigt.

4.2.2.1 Gewichtsverlust

Die B- $LT\beta^{-/-}$ Mäuse zeigten keinen Gewichtsverlust über den Beobachtungszeitraum von sieben Tagen. Ab Tag 5 verloren sowohl die Kontrollgruppe, als auch die T- $LT\beta^{-/-}$ Gruppe an Gewicht. Am Tag 6 war der Unterschied zwischen den T- $LT\beta^{-/-}$ Mäusen und den Kontrollen bzw. auch den B- $LT\beta^{-/-}$ Mäusen signifikant. Am Tag 7 war der Unterschied im Gewichtsverlust zwischen den B- $LT\beta^{-/-}$ Mäusen und den T- $LT\beta^{-/-}$ Mäusen, die am Ende der Colitis etwa 10% des Ausgangsgewichtes verloren hatten, signifikant (Abb. 4-10).

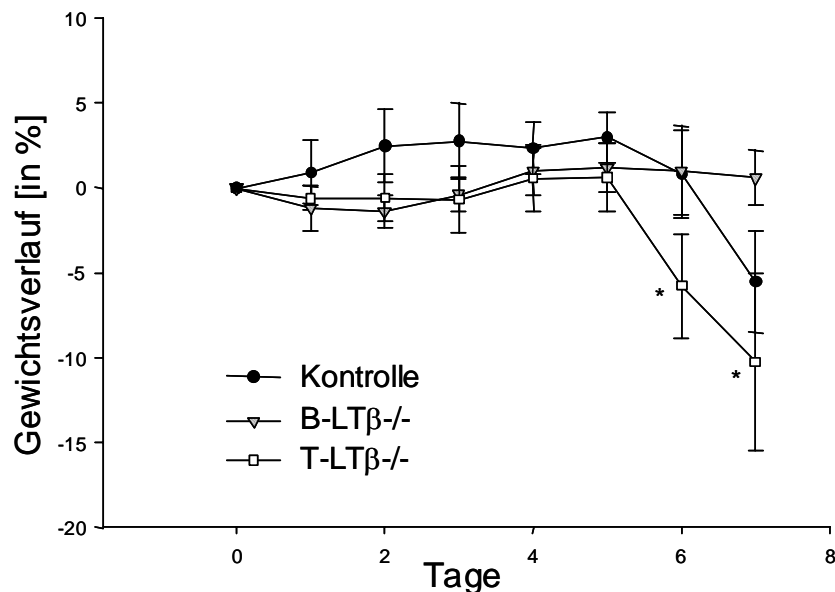


Abbildung 4-10:

Gewichtsverlust der konditionellen $LT\beta^{-/-}$ Mäuse während der DSS-induzierten akuten Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % des ursprünglichen Gewichts der Mäuse (n=6). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die ermittelten Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$

4.2.2.2 Histologischer Score

Im folgenden wird nicht mehr näher auf die Histologie eingegangen, da aus dem histologischen Score der Schweregrad der intestinalen Entzündung hervorgeht. Für die Bestimmung des histologischen Scores wurden Dickdarmschnitte von allen Mäusen angefertigt, die exemplarisch im Punkt 4.1.1.2 erläutert werden. Am Tag 7 der akuten DSS-

induzierten Colitis hatten die B-LT β ^{-/-} Mäuse einen sehr niedrigen histologischen Score, die T-LT β ^{-/-} Mäuse einen signifikant höheren, der Score der Kontrollgruppe lag dazwischen (Abb. 4-11).

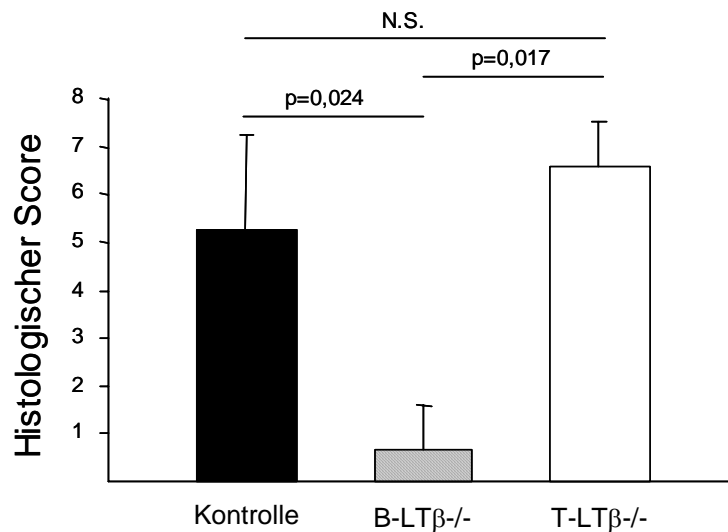


Abbildung 4-11:

Histologischer Score der konditionellen LT β ^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 7). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt (n=6). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.2.2.3 Myeloperoxidase-Aktivität

Die MPO-Aktivität in Dickdarm-Biopsien am Tag 7 der DSS-induzierten Colitis war in der T-LT β ^{-/-} Gruppe im Vergleich zur B-LT β ^{-/-} Gruppe signifikant erhöht. Die Kontrollgruppe lag dazwischen, wobei der Unterschied B-LT β ^{-/-} Mäuse zu Kontrollen signifikant war (Abb.4-12).

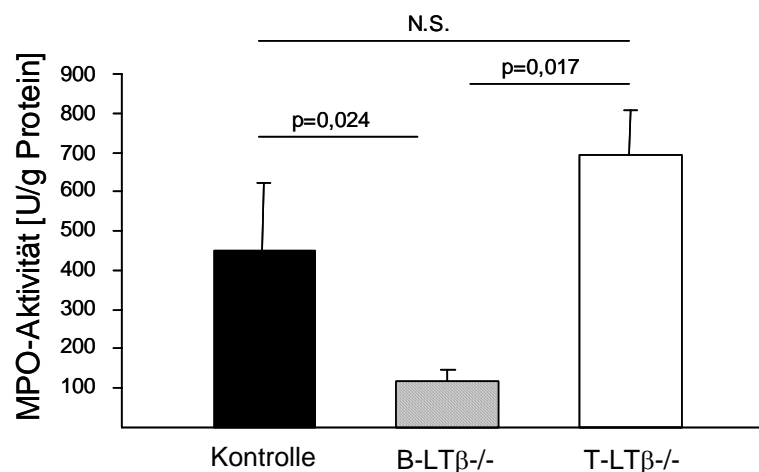


Abbildung 4-12:

Myeloperoxidase-Aktivität von konditionellen LT β ^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 7), angegeben in Einheiten pro g Gesamtprotein. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=6). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt.

4.2.2.4 Dickdarmlänge

Am Ende der akuten Colitis hatten T-LT β ^{-/-} Mäuse und Kontrollen einen signifikant kürzeren Dickdarm im Vergleich zu B-LT β ^{-/-} Mäusen. Der Unterschied zwischen T-LT β ^{-/-} Mäusen und Kontrollen war marginal (Abb. 4-13).

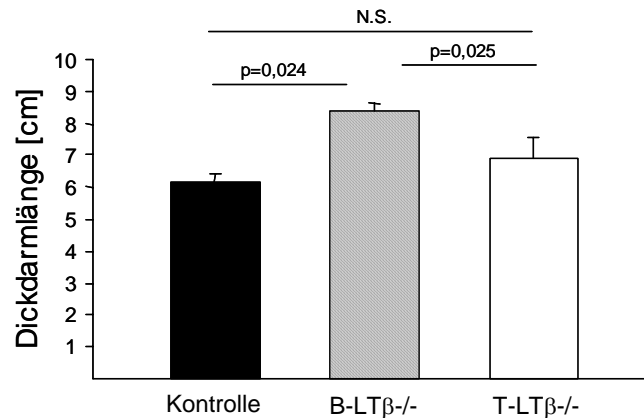


Abbildung 4-13:

Dickdarmlänge von konditionellen LT β ^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis angegeben in cm. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt (n=6). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.2.2.5 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

Auch in diesen Mäusen wurde die Produktionsfähigkeit für Zytokine und Chemokine nach akuter DSS-induzierter Colitis gemessen. Da die konditionellen LT β ^{-/-} Mäuse mesenteriale Lymphknoten besitzen, wurden am Tag 7 der akuten Colitis diese entnommen. Nach 24 h Inkubation ohne Stimulierung wurden die Zellkulturüberstände auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ und MIP-2 untersucht. Die Konzentration dieser Parameter war in der T-LT β ^{-/-} Gruppe deutlich erhöht, in der B-LT β ^{-/-} Gruppe stark verringert bzw. unter dem Detektionsniveau (Tabelle 4-3).

	Kontrolle [in pg/ml]	B-LTβ^{-/-} [in pg/ml]	T-LTβ^{-/-} [in pg/ml]
TNF	96 \pm 17	< 20	323 \pm 125
IL-6	323 \pm 43	194 \pm 35	409 \pm 45
IFN-γ	84 \pm 40	< 20	169 \pm 5
MIP-2	248 \pm 30	141 \pm 29	916 \pm 38

Tabelle 4-3:

Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten der konditionellen LT β ^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. mLN wurden entnommen (pro Gruppe gepoolt) und 10⁷ Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mittels ELISA auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ und MIP-2 untersucht. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.2.3 Konditionelle $LT\beta^{-/-}$ Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis

Die chronische Colitis der konditionellen $LT\beta^{-/-}$ Mäuse wurde mit vier einwöchigen DSS-Zyklen (0,5% DSS) induziert. Gegen Ende der letzten drei Zyklen zeigte nur die T- $LT\beta^{-/-}$ Gruppe leichten Durchfall. 19 Tage nach dem letzten DSS-Zyklus wurden die Entzündungsparameter des Dickdarms bestimmt.

4.2.3.1 Histologischer Score

Auch hier war der histologische Score, wie schon in der akuten Colitis, in der T- $LT\beta^{-/-}$ Gruppe im Vergleich zur B- $LT\beta^{-/-}$ Gruppe signifikant erhöht. Der Unterschied zur Kontrollgruppe, deren Score zwischen den beiden konditionellen Mauslinien lag, war jeweils nicht signifikant (Abb. 4-14).

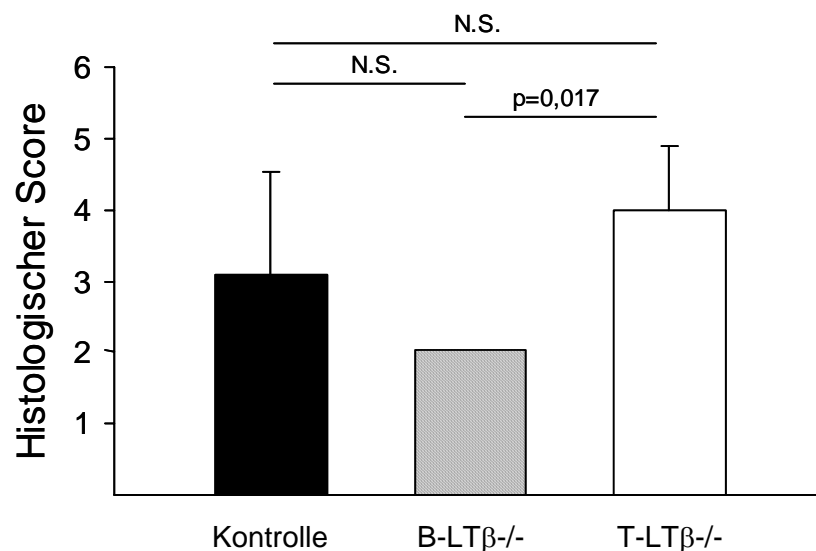


Abbildung 4-14:

Histologischer Score der konditionellen $LT\beta^{-/-}$ Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt ($n=5$). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.2.3.2 Lymphfollikel-Anzahl

In den B- $LT\beta^{-/-}$ Mäusen waren im Dickdarm nur sehr wenig tertiäre Lymphfollikel zu finden, daher war hier die Anzahl zwischen 0 und 0,5 mit einem signifikanten Unterschied zu den T- $LT\beta^{-/-}$ Mäusen (Anzahl zwischen 1 und 1,5). Die Anzahl der Lymphfollikel der Kontrollgruppe lag zwischen den beiden konditionellen gendefizienten Linien (Abb. 4-15).

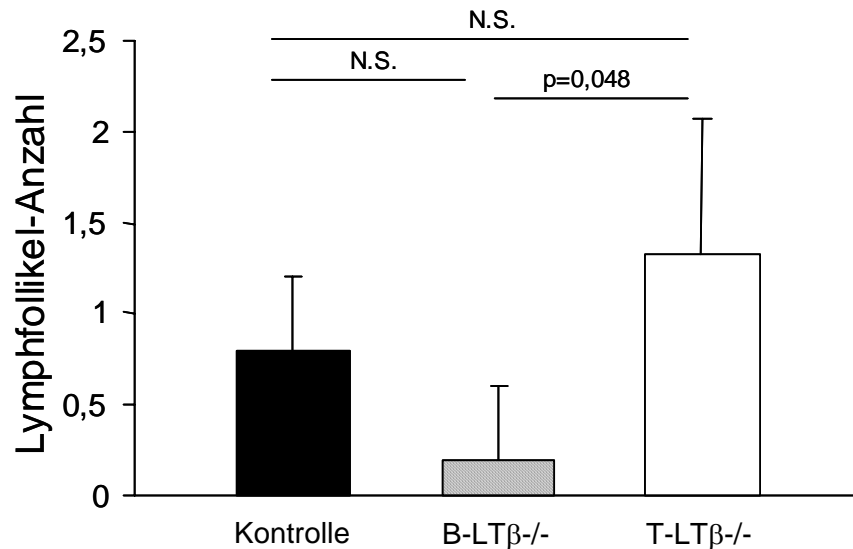


Abbildung 4-15:

Lymphfollikel-Anzahl von konditionellen LT β ^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt.

4.2.3.3 Dickdarmlänge

Die B-LT β ^{-/-} Linie zeigte am Ende der chronischen Colitis einen signifikant längeren Dickdarm als die T-LT β ^{-/-} Linie und die Kontrollgruppe. Zwischen den T-LT β ^{-/-} Mäusen und den Kontrollmäusen war kein Unterschied in der Dickdarmlänge (Abb. 4-16).

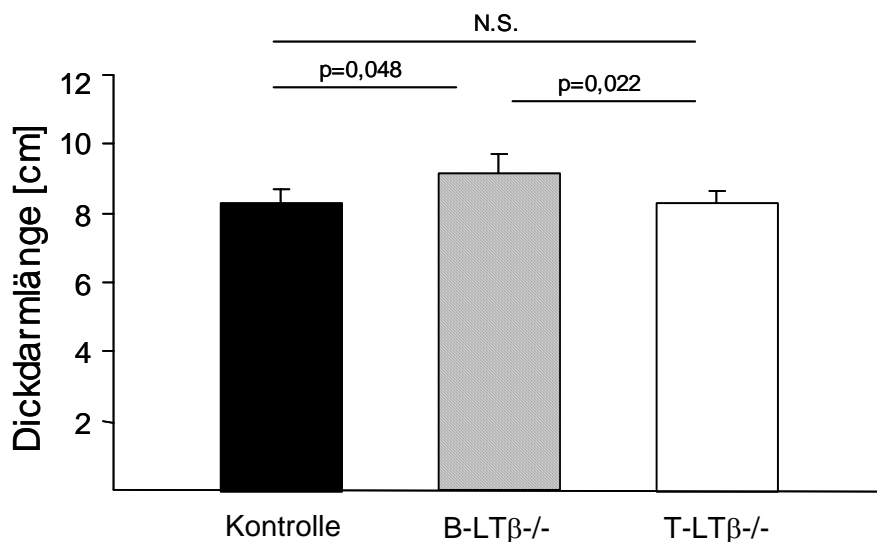


Abbildung 4-16:

Dickdarmlänge von konditionellen LT β ^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter chronischer Colitis angegeben in cm. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=5).

4.2.3.4 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

Nach 24 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände der mesenterialen Lymphozyten auf folgende Parameter untersucht: TNF, IL-6, IFN- γ und RANTES. Die Konzentration dieser Parameter war in der T-LT β -/- Gruppe im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht, in der B-LT β -/- Gruppe verringert (Tabelle 4-4).

	Kontrolle [in pg/ml]	B-LTβ-/- [in pg/ml]	T-LTβ-/- [in pg/ml]
TNF	41 \pm 27	< 20	48 \pm 7
IL-6	224 \pm 89	135 \pm 76	433 \pm 155
IFN-γ	131 \pm 20	88 \pm 18	195 \pm 78
RANTES	2458 \pm 123	1429 \pm 168	2526 \pm 93

Tabelle 4-4:

Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten der konditionellen LT β -/- Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. mLN wurden entnommen (pro Gruppe gepoolt) und 10^7 Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand auf TNF, IL-6, IFN- γ und RANTES untersucht. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.3 LIGHT^{-/-} Mäuse in DSS-induzierter Colitis

Um die Rolle von LIGHT, dem zweiten Liganden des LT β R, in intestinaler Entzündung charakterisieren zu können, wurden LIGHT^{-/-} Mäuse in DSS-induzierter Colitis untersucht.

4.3.1 LIGHT^{-/-} Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis

An den letzten beiden Tagen der Colitis wurde in der Kontrollgruppe leichter, blutiger Durchfall beobachtet, wohingegen bei den LIGHT^{-/-} Mäusen ganz normaler Stuhl vorhanden war. Diese Beobachtungen wurden in der Auswertung der nachfolgenden Parameter bestätigt.

4.3.1.1 Gewichtsverlust

Bei der WT-Kontrollgruppe war ab Tag 4 der Colitis-Induktion eine kontinuierliche Abnahme des Gewichts festzustellen, die LIGHT^{-/-} Tiere verloren an den letzten beiden Tagen leicht an Gewicht. An diesen beiden Tagen war der Unterschied im Gewichtsverlust signifikant (Abb. 4-17).

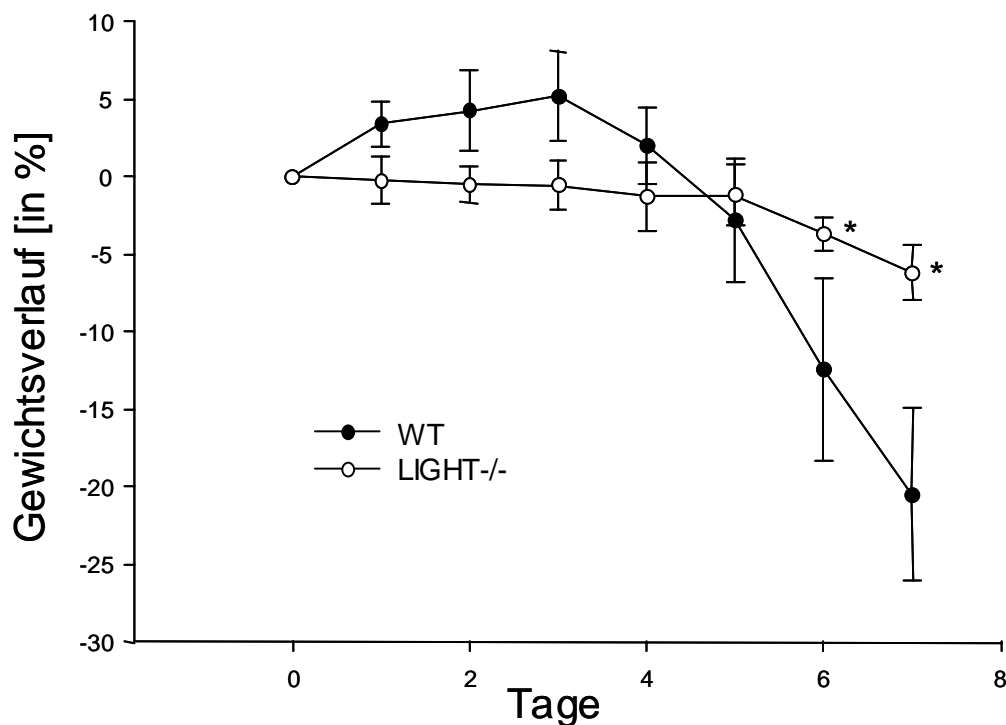


Abbildung 4-17:

Gewichtsverlust der LIGHT^{-/-} Mäuse während der DSS-induzierten akuten Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % des ursprünglichen Gewichts (n=7). Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. * p<0,05

4.3.1.2 Histologischer Score

Der histologische Score war am Tag 7 der akuten DSS-induzierten Colitis in der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 4-18). Bei den LIGHT^{-/-} Mäusen wurde nur sehr geringer Epithelschaden und wenig Infiltrat gefunden, was in einem Score zwischen 1 und 2 gezeigt ist.

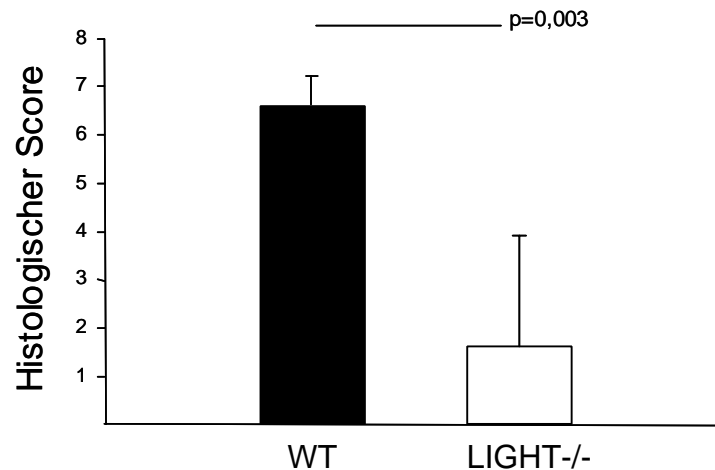


Abbildung 4-18:

Histologischer Score der LIGHT^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 7). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt (n=7). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.3.1.3 Lymphfollikel-Anzahl

Im Gegensatz zu den LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Mäusen bildeten die LIGHT^{-/-} Mäuse wenige tertiäre Lymphfollikel nach DSS-induzierter Colitis aus. In der WT-Gruppe zeigten sich wesentlich mehr Follikel, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 4-19).

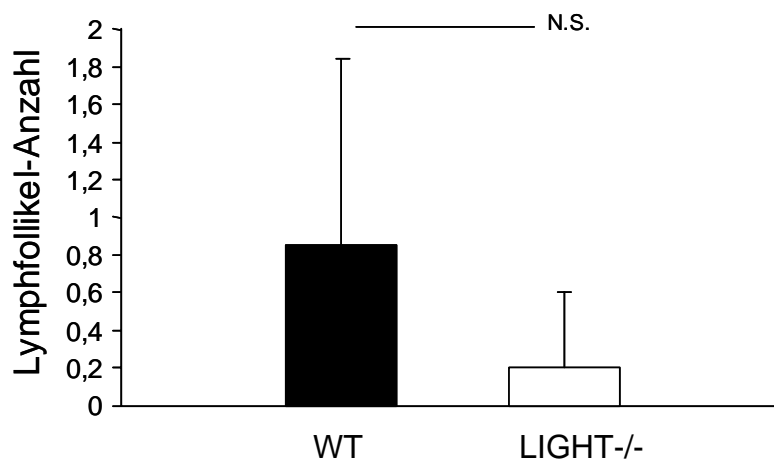


Abbildung 4-19:

Lymphfollikel-Anzahl von LIGHT^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt (n=7). Die Balken zeigen Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.3.1.4 Myeloperoxidase-Aktivität

Auch in diesem Entzündungsparameter des Dickdarms fand sich eine signifikant erhöhte Enzym-Aktivität in der Kontrollgruppe (Abb. 4-20). In den LIGHT^{-/-} Mäusen war nur eine geringe MPO-Aktivität messbar, was zeigt, dass sehr wenig neutrophile Granulozyten in das Gewebe des Dickdarms eingewandert sind.

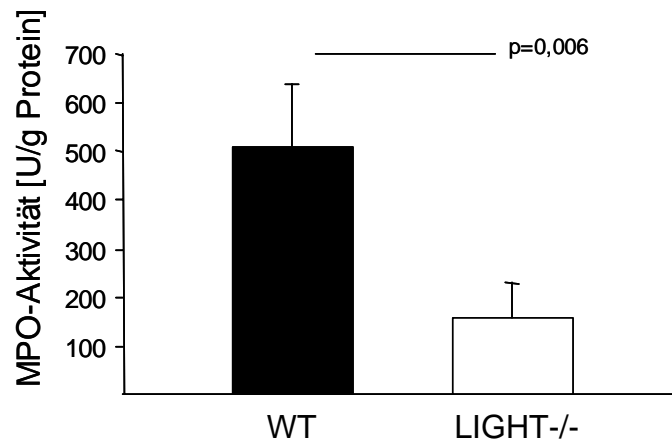


Abbildung 4-20:

Myeloperoxidase-Aktivität von LIGHT^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur WT-Kontrolle (Tag 7), angegeben in Einheiten pro g Gesamtprotein. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet (n=7). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.3.1.5 Dickdarmlänge

7 Tage DSS-Gabe führte in der WT-Kontrollgruppe zu einer signifikanten Verkürzung des Dickdarms im Vergleich zu den LIGHT^{-/-} Mäusen (Abb. 4-21).

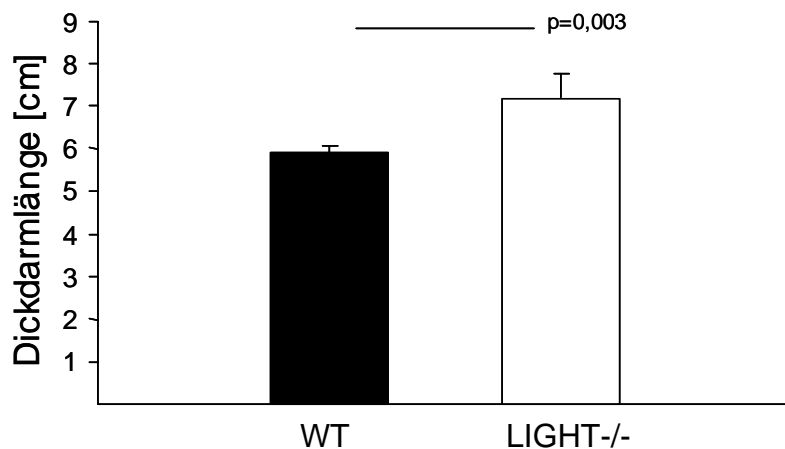


Abbildung 4-21:

Dickdarmlänge der LIGHT^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe (Tag 7), angegeben in cm. Mit den Balken sind Mittelwerte \pm Standardabweichung gezeigt (n=7). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt.

4.3.1.6 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

Die Zellkulturüberstände der mesenterialen Lymphozyten wurden nach 24 h Inkubation auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ und MIP-2 untersucht. In den Überständen der LIGHT-/- Gruppe waren wesentlich geringere Zytokin-/ Chemokin-Spiegel messbar als in der WT-Kontrollgruppe (Tabelle 4-5).

	WT [in pg/ml]	LIGHT-/- [in pg/ml]
TNF	243 \pm 80	151 \pm 35
IL-6	123 \pm 15	< 20
IFN-γ	419 \pm 174	209 \pm 127
MIP-2	770 \pm 70	290 \pm 70

Tabelle 4-5:

Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten der LIGHT-/- Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. mLN wurden entnommen (pro Gruppe gepoolt), Einzelzellsuspensionen hergestellt und 10^7 Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ und MIP-2 untersucht. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.3.1.7 Zytokinexpression im Dickdarmgewebe

Um Unterschiede der Zytokinexpression im Dickdarm von Mäusen mit akuter DSS-induzierter Colitis untersuchen zu können, wurde die Methode der quantitativen PCR mittels LightCycler benutzt. Hierzu wurde aus dem distalen Dickdarmabschnitt am Tag 7 der Colitis-Induktion RNA isoliert. Anschließend wurde die mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 gemessen. Wie erwartet, war die Expression von TNF und IL-6 in WT-Mäusen höher als in den LIGHT-/- Mäusen (Abb. 4-22).

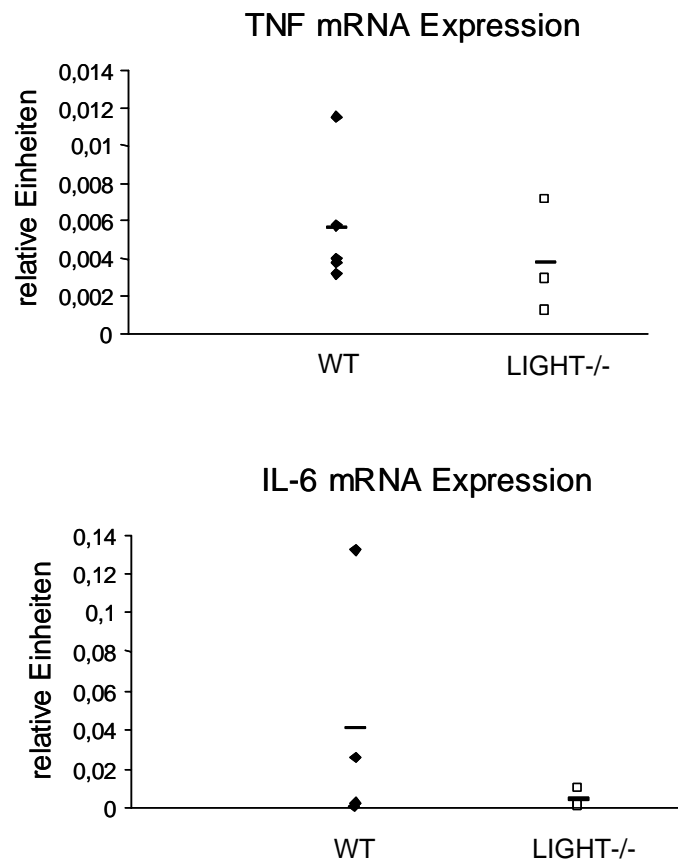


Abbildung 4-22:

mRNA Expression von TNF und IL-6 im Dickdarmgewebe der LIGHT^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe (Tag 7) angegeben in relativen Einheiten. mRNA Expression wurde mittels LightCycler-Technik quantifiziert. Rauten/Quadrate repräsentieren die einzelnen Mäuse, die Querbalken zeigen die Mittelwerte.

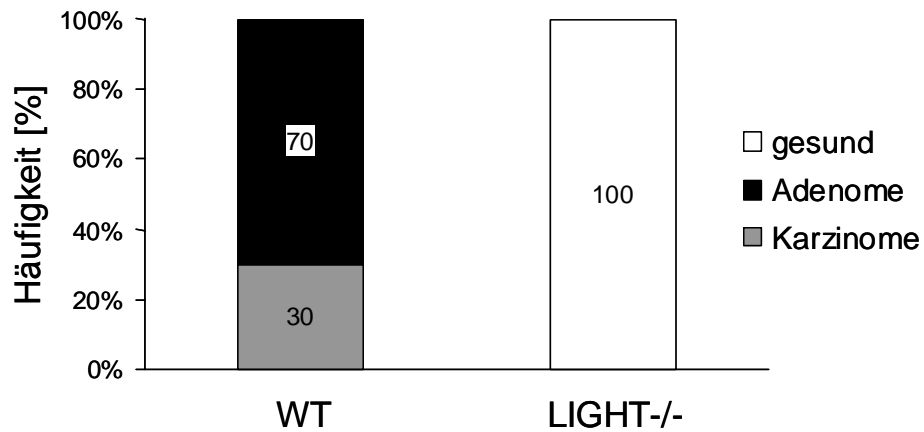
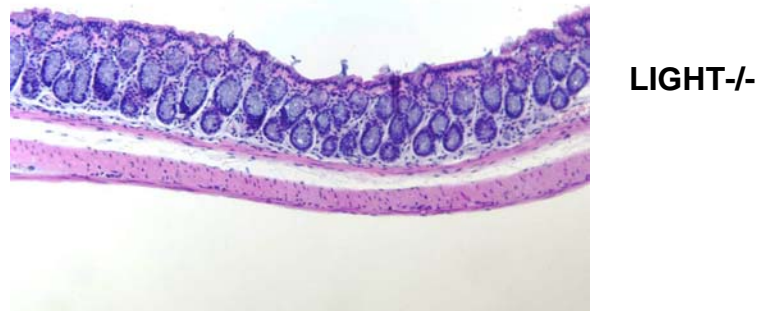
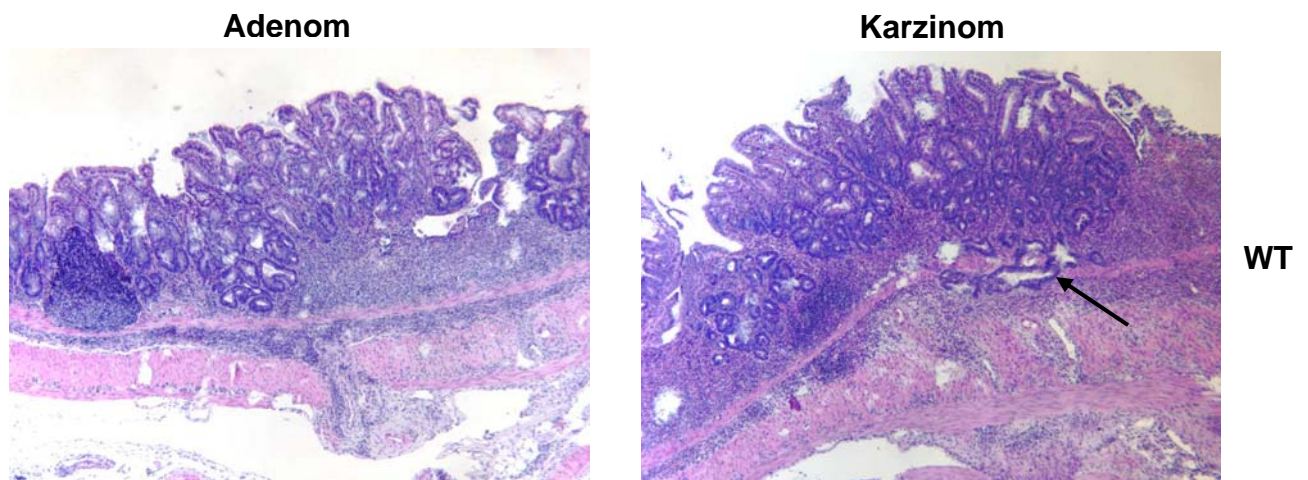
4.3.2 LIGHT^{-/-} Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis

Nachdem die LIGHT^{-/-} Mäuse nach vier 0,5%igen DSS-Zyklen überhaupt keine intestinale Entzündung aufwiesen, wurde die Dosis auf vier 0,75%ige DSS-Zyklen erhöht, um zu untersuchen, ob dieser Effekt bei hohen DSS-Dosen erhalten bleibt. Tatsächlich hatten die LIGHT^{-/-} Tiere auch während der vier erhöhten DSS-Zyklen überhaupt keinen Durchfall, den Kontrolltieren ging es jedoch sehr schlecht. Während den drei letzten Zyklen war in den Kontrollen starker Durchfall zu beobachten, der sich während der Wasser-Gaben nur geringfügig besserte.

4.3.2.1 Histologie und Histologischer Score

Bei der Histologie der Kontrollmäuse zeigte sich ein ganz erstaunliches Bild. Die 2,5 Monate der Colitis-Induktion mit vier 0,75%igen DSS-Zyklen hatten ausgereicht, um in der Kontrollgruppe Adenome und sogar Karzinome im Dickdarm zu generieren, und dies mit einer Häufigkeit von 100% (Abb. 4-23A). Die LIGHT^{-/-} Mäuse dagegen waren völlig gesund (Abb. 4-23B). Die Adenome der Kontrollen waren gekennzeichnet durch verzweigte Drüsen

mit Nachweis von Epitheldysplasien. Die Zellen zeigten eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation und Kernpleomorphie (Abb. 4-23C). Der Übergang vom Adenom zum Karzinom wird durch das invasive Wachstum der Karzinomdrüsen durch die Muscularis Musosae (siehe Pfeil) bestimmt. Dadurch ist der Anschluss an die Blutgefäße der Maus möglich. Diese Beobachtungen hatten natürlich auch Einfluss auf den histologischen Score, der in der WT-Kontrollgruppe im Vergleich zur LIGHT^{-/-} Gruppe signifikant erhöht war (Abb. 4-23D).

A**B****C**

D

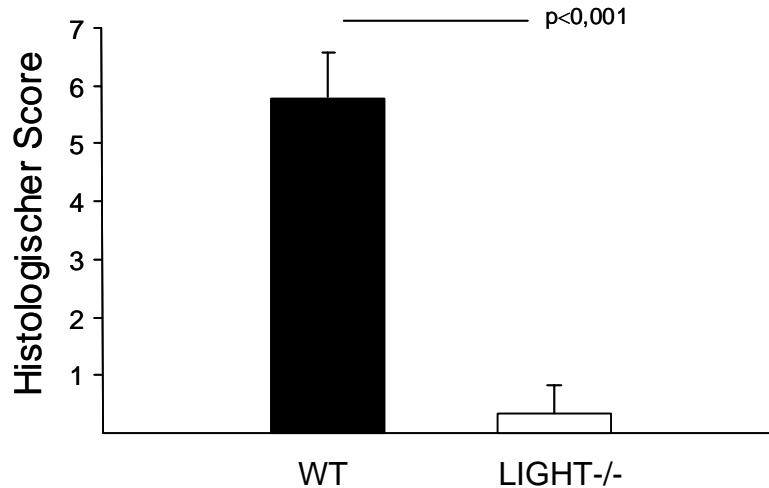


Abbildung 4-23:

Histologie und histologischer Score der LIGHT-/- Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. A) Häufigkeit Adenom/ Karzinom im WT. B, C) Repräsentative histologische Schnitte der distalen Dickdarmbereiche nach Anfärbung mit Eosin-Hämatoxylin (Vergrößerung x100). D) Histologischer Score der Mäuse im distalen Dickdarmbereich (n=10). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.3.2.2 Lymphfollikel-Anzahl

Auch nach der chronischen Colitis konnte beobachtet werden, dass LIGHT-/- Mäuse in der Lage waren, tertiäre Lymphfollikel auszubilden. Nachdem diese gendefizienten Mäuse so gut wie keine intestinale Entzündung entwickelten, war die Anzahl jedoch sehr klein und der Unterschied zur WT-Kontrollgruppe signifikant (Abb. 4-24).

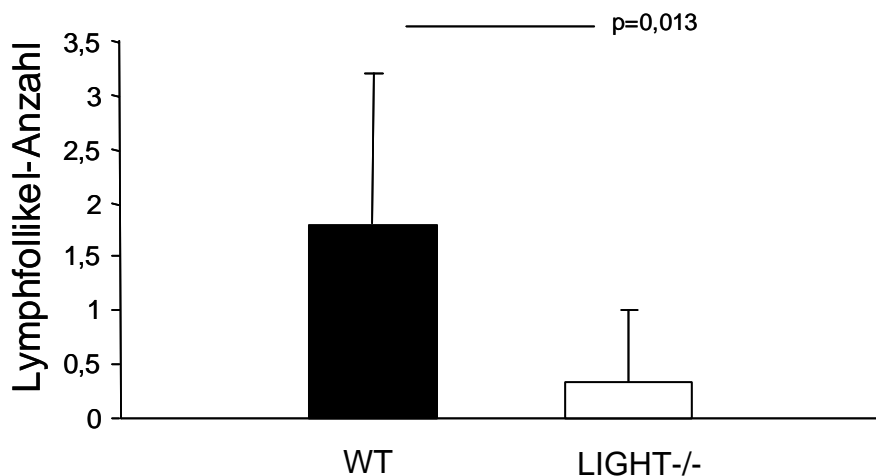


Abbildung 4-24:

Lymphfollikel-Anzahl von LIGHT-/- Mäusen nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=10). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet.

4.3.2.3 Dickdarmlänge

LIGHT^{-/-} Mäuse hatten nach der Induktion einer chronischen DSS-Colitis einen signifikant längeren Dickdarm verglichen mit den WT-Mäusen (Abb. 4-25).

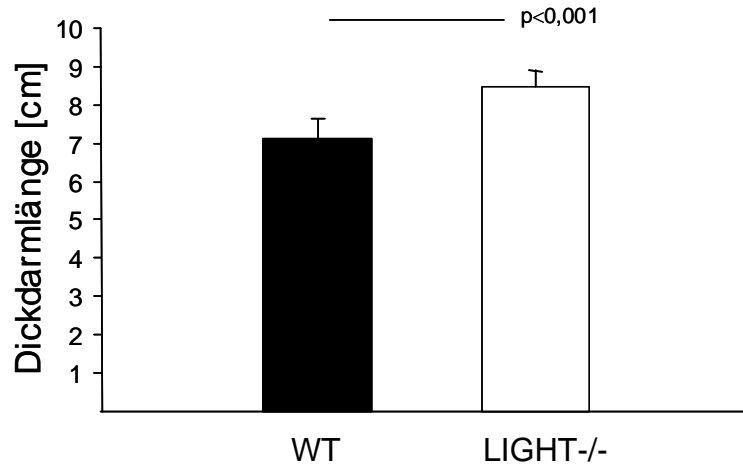


Abbildung 4-25:

Dickdarmlänge der LIGHT^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe, angegeben in cm. Mit den Balken sind Mittelwerte \pm Standardabweichung gezeigt (n=10). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.3.2.4 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

TNF-, IL-6-, IFN- γ - und RANTES-Konzentrationen wurden in den Überständen der mesenterialen Lymphozyten bestimmt. In der Kontrollgruppe fanden sich wesentlich höhere Konzentrationen der untersuchten Parameter als in der LIGHT^{-/-} Gruppe (Tabelle 4-6).

	WT [in pg/ml]	LIGHT ^{-/-} [in pg/ml]
TNF	144 \pm 15	80 \pm 18
IL-6	371 \pm 61	246 \pm 53
IFN-γ	481 \pm 37	181 \pm 20
RANTES	2171 \pm 106	1688 \pm 102

Tabelle 4-6:

Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten der LIGHT^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. mLN wurden entnommen (pro Gruppe gepoolt), Einzelzellsuspensionen hergestellt und 10^7 Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand auf die Konzentration von TNF, IL-6, IFN- γ und RANTES untersucht. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.4 HVEM^{-/-} Mäuse in DSS-induzierter Colitis

Nachdem LIGHT sowohl an den LT β R als auch an HVEM bindet, wurden als nächster Schritt HVEM^{-/-} Mäuse in DSS-induzierter Colitis untersucht. Für LT β R^{-/-} Mäuse konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die intestinale Entzündung nach der akuten DSS-induzierten Colitis in diesen gendefizienten Mäusen signifikant erhöht ist, wohingegen in der chronischen Colitis die LT β R^{-/-} Mäuse eine signifikante Reduktion der Entzündung aufwiesen (Manuskript eingereicht). Daher sollte abgeklärt werden, ob auch die Aktivierung von HVEM nach Bindung von LIGHT eine Rolle spielt.

4.4.1 HVEM^{-/-} Mäuse in akuter DSS-induzierter Colitis

Nach siebentägiger Verabreichung von 1,5% DSS im Trinkwasser wurde sowohl in der HVEM^{-/-} Gruppe als auch in der Kontrollgruppe blutiger Durchfall beobachtet. Auch bei den untersuchten Entzündungsparametern des Dickdarms wurde kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt. Exemplarisch sind im Folgenden Gewichtsverlust, histologischer Score und MPO-Aktivität gezeigt.

4.4.1.1 Gewichtsverlust

Bei beiden Gruppen wurde ab Tag 5 der Colitis-Induktion eine kontinuierliche Gewichtsabnahme festgestellt (Abb. 4-26). Am Ende betrug der Gewichtsverlust in WT- und HVEM^{-/-} Gruppe zwischen 10 und 15%.

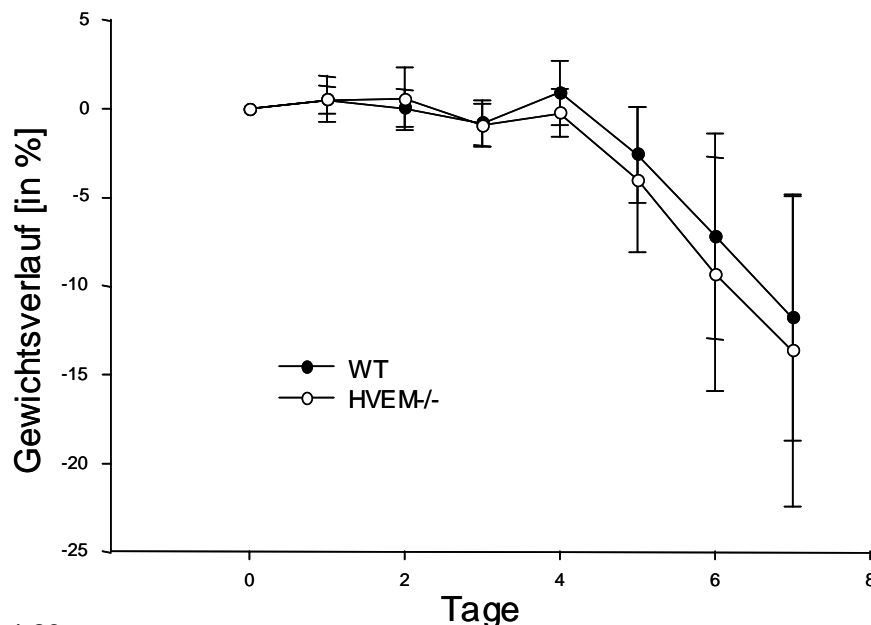


Abbildung 4-26:

Gewichtsverlust der HVEM^{-/-} Mäuse während der DSS-induzierten akuten Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % des ursprünglichen Gewichts (n=10). Die Punkte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. * p<0,05. Die Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4.4.1.2 Histologischer Score

Auch im histologischen Score war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen. Tendenziell ging es den HVEM^{-/-} Mäusen etwas besser, die Standardabweichung war jedoch sehr groß und der Unterschied somit nicht relevant (Abb. 4-27).

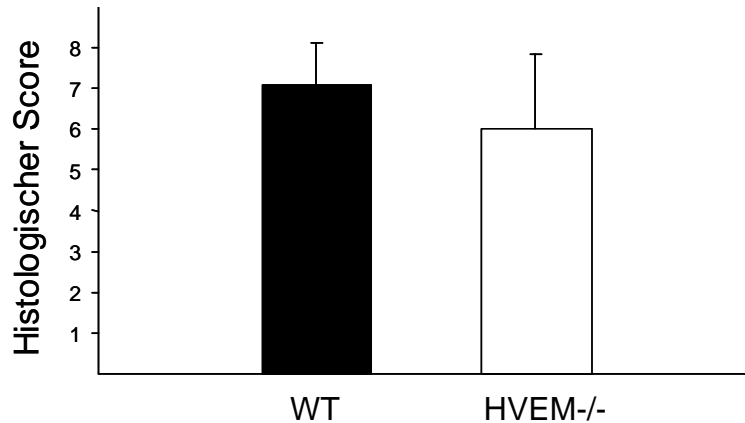


Abbildung 4-27:

Histologischer Score der HVEM^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 7). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet (n=10). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.4.1.3 Myeloperoxidase-Aktivität

Bei der MPO-Aktivität war kein Unterschied zwischen Kontrollmäusen und HVEM^{-/-} Mäusen messbar (Abb. 4-28).

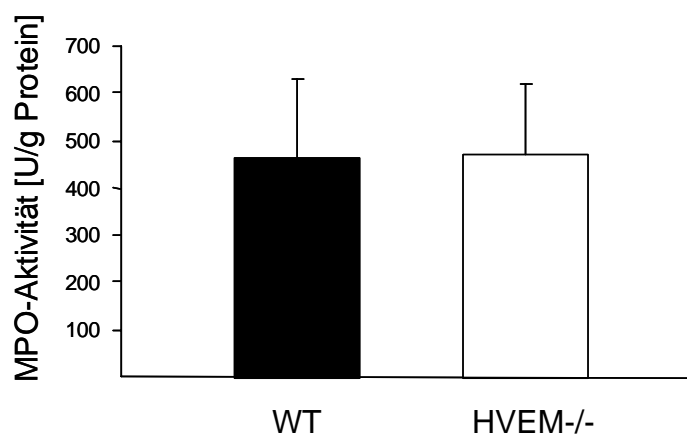


Abbildung 4-28:

Myeloperoxidase-Aktivität von HVEM^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur WT-Kontrolle (Tag 7), angegeben in Einheiten pro g Gesamtprotein. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt (n=10). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.4.2 HVEM^{-/-} Mäuse in chronischer DSS-induzierter Colitis

Nachdem in der akuten DSS-induzierten Colitis kein Unterschied zwischen HVEM^{-/-} Mäusen und der WT-Kontrollgruppe gezeigt werden konnte, wurden HVEM^{-/-} Mäuse als nächstes im Modell der chronischen Colitis untersucht.

Die chronische Colitis wurde hier wieder mit vier 0,5%igen DSS-Zyklen induziert. Gegen Ende der drei letzten Zyklen war nur in der WT-Kontrollgruppe leichter Durchfall zu beobachten. Die HVEM^{-/-} Mäuse produzierten normalen, festen Stuhl.

4.4.2.1 Histologischer Score

Zwei Wochen nach Induktion der chronischen Colitis hatten die HVEM^{-/-} Mäuse einen sehr kleinen histologischen Score mit Werten zwischen 1 und 2, die WT-Kontrollgruppe lag zwischen 4 und 5. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war hochsignifikant ($p < 0,001$) (Abb. 4-29).

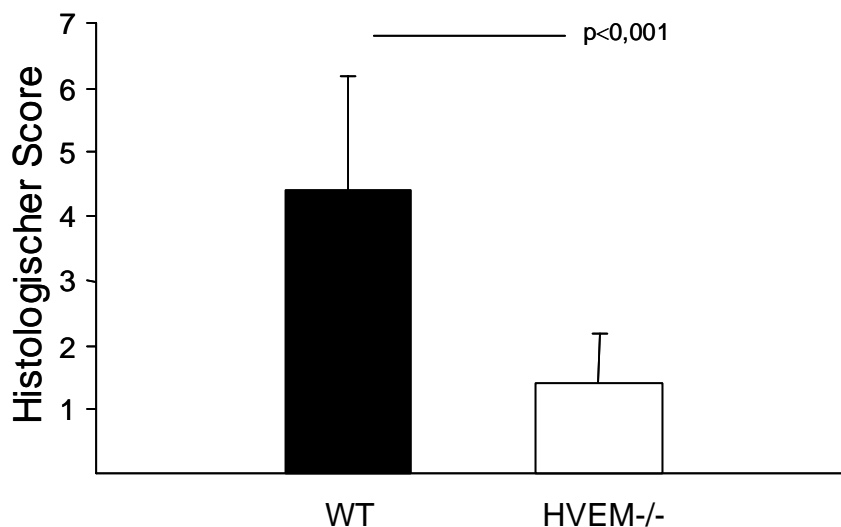


Abbildung 4-29:

Histologischer Score der HVEM^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=10$). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt.

4.4.2.2 Lymphfollikel-Anzahl

HVEM^{-/-} Mäuse zeigten eine signifikant verringerte Anzahl an Lymphfollikeln im distalen Teil des Dickdarms nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zu WT-Mäusen (Abb. 4-30).

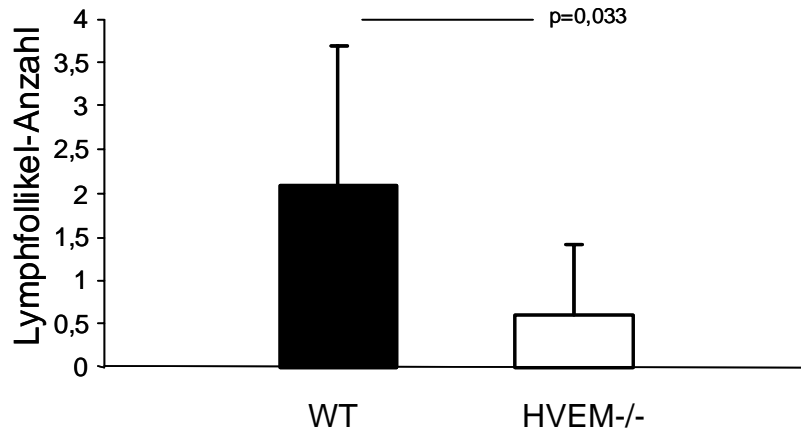


Abbildung 4-30:

Lymphfollikel-Anzahl von HVEM^{-/-} Mäusen nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur WT-Kontrolle. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=10). Die angegebenen Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test berechnet.

4.4.2.3 Dickdarmlänge

Darüber hinaus hatten HVEM^{-/-} Mäuse mit chronischer DSS-induzierter Colitis einen signifikant ($p < 0,001$) längeren Dickdarm als die WT-Kontrollmäuse (Abb. 4-31).

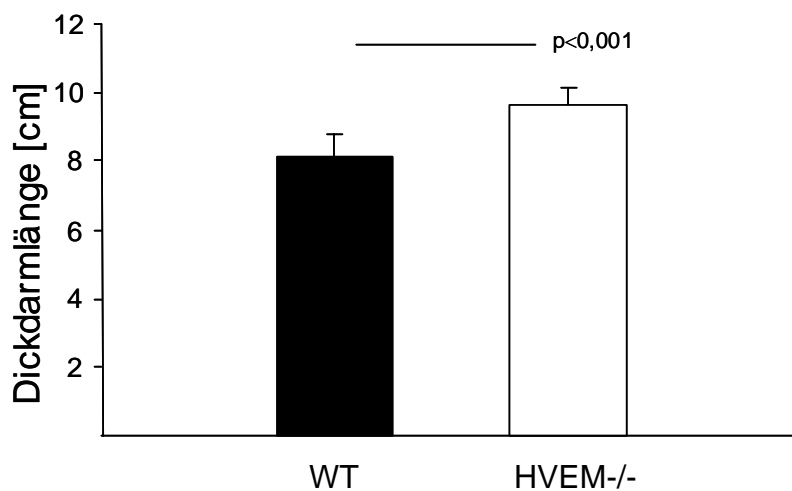


Abbildung 4-31:

Dickdarmlänge der HVEM^{-/-} Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe, angegeben in cm. Mit den Balken sind Mittelwerte \pm Standardabweichung gezeigt (n=10). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.4.2.4 Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten

Um Unterschiede in der lokalen Zytokin-/ Chemokinproduktion feststellen zu können, wurden den Mäusen am Ende der chronischen DSS-induzierten Colitis die mesenterialen Lymphknoten entnommen und daraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Überstände der Zellkulturen wurden nach 24 h Inkubation auf die Konzentration von IL-6, IFN- γ , MIP-2 und RANTES untersucht. In der WT-Gruppe fanden sich wesentlich höhere Konzentrationen an den oben genannten Parametern als in der HVEM-/- Gruppe (Tabelle 4-7).

	WT [in pg/ml]	HVEM-/- [in pg/ml]
IL-6	116 \pm 42	45 \pm 20
IFN-γ	246 \pm 22	< 20
MIP-2	804 \pm 133	714 \pm 64
RANTES	1346 \pm 78	843 \pm 121

Tabelle 4-7:

Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten der HVEM-/- Mäuse nach DSS-induzierter chronischer Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. mLN wurden entnommen (pro Gruppe gepoolt), Einzelzellsuspensionen hergestellt und 10^7 Zellen/ml für 24 h ohne Stimulierung in Quadruplikaten inkubiert (12-Well-Platten). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand auf die Konzentration von IL-6, IFN- γ , MIP-2 und RANTES untersucht. Die Werte [in pg/ml] repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4.5 Die Rolle von LIGHT in der Kontrolle von Infektionen

In Punkt 4.3 konnte gezeigt werden, dass LIGHT eine herausragende Rolle beim Fortschreiten einer intestinalen Entzündung spielt, da LIGHT^{-/-} Mäuse weder eine akute noch eine chronische Colitis entwickelten. Daher wurde untersucht, ob LIGHT auch in der Abwehr von Infektionen involviert ist. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass im Infektionsmodell mit *Mycobacterium tuberculosis* (Ehlers, 2003), sowie mit *Listeria monocytogenes* (Pfeffer K., nicht veröffentlicht) kein Unterschied zwischen LIGHT^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollen war.

Im Folgenden wird das an unserem Lehrstuhl etablierte Modell der CLP („Cecal Ligation and Puncture“) benutzt (Echtenacher, 1990), das mit LIGHT^{-/-} Mäusen und C57BL/6-Kontrollmäusen durchgeführt wurde. Dabei wird ein Teil des Blinddarms abgebunden und perforiert. Der austretende Darminhalt verursacht eine bakterielle Infektion mit systemischer Entzündung, was zum Tod der Tiere führen kann. Im unten aufgeführten Versuch wurde über einen Beobachtungszeitraum von 10 Tagen kein signifikanter Unterschied in der Mortalität zwischen LIGHT^{-/-} Mäusen und Kontrollmäusen festgestellt. Nach vier Tagen waren 40% der gendefizienten Tiere verstorben im Vergleich zu 50% der Kontrolltiere (Abb. 4-32).

Dieser Versuch und die beiden Hinweise aus der Literatur zeigen, dass LIGHT nicht an der bakteriellen Infektabwehr beteiligt zu sein scheint.

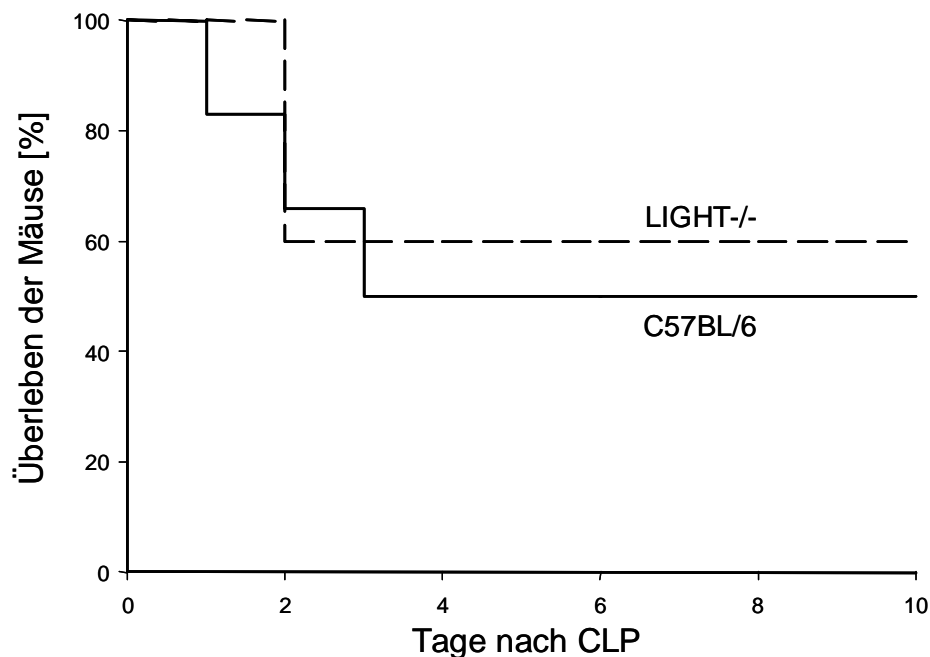


Abbildung 4-32:

LIGHT^{-/-} Mäuse nach CLP im Vergleich zur C57BL/6-Kontrollgruppe. 60% des Blinddarms der Mäuse wurden abgebunden und mit einem 0,7 mm großen Loch versehen. Die Mäuse (n=6) wurden anschließend über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet. Im Diagramm sind die überlebenden Tiere [in %] dargestellt.

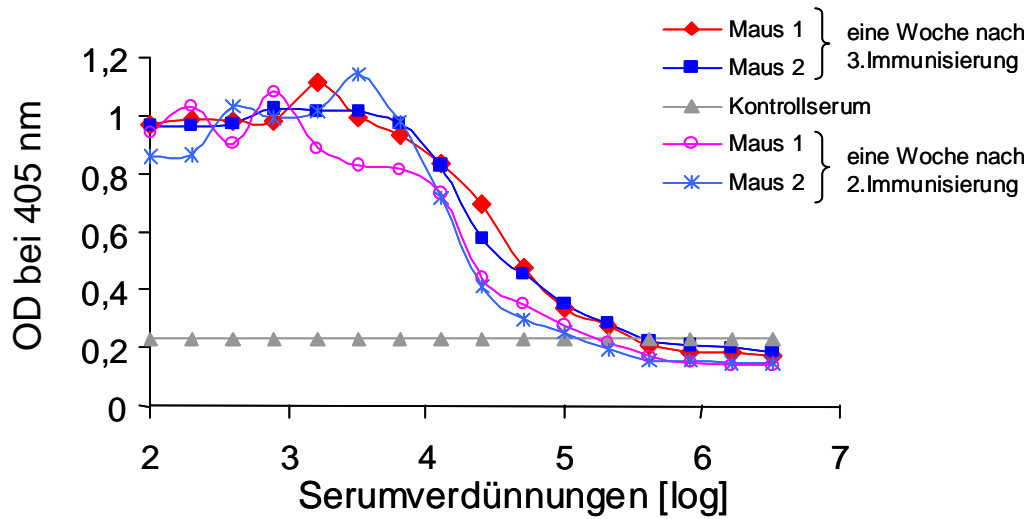
4.6 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler anti-mLIGHT-Antikörper

4.6.1 Immunisierung von LIGHT-/- Mäusen

LIGHT scheint nach bisherigen Ergebnissen speziell im Darm eine große Rolle zu spielen. In DSS-induzierter Colitis war dieser Ligand des LT β R hauptverantwortlich für die Entwicklung einer intestinalen Entzündung, wohingegen für eine erfolgreiche Infektionsabwehr bislang keine Notwendigkeit einer LIGHT-Expression nachgewiesen werden konnte. Somit wäre LIGHT also die perfekte Zielstruktur für eine Neutralisierung durch Antikörper zur Therapie der Colitis.

Zur Prüfung dieser Vermutung sollten monoklonale Antikörper gegen mLIGHT hergestellt werden. Dafür wurden zwei LIGHT-/- Weibchen wie unter 3.2.1 beschrieben mit S2-exprimiertem mLIGHT-Extrazellulärdomänen (ECD)-Protein immunisiert. Mit dieser Methode können „Maus anti-Maus“ Antikörper hergestellt werden. Das Risiko einer Komplementaktivierung aufgrund von Speziesunterschieden bei einem späteren Einsatz in der Maus wird somit umgangen. Zwischen den Immunisierungen wurde der Immunglobulintiter im Serum per ELISA bestimmt. Beide Mäuse zeigten einen ausreichend hohen Titer. In Abb. 4-33A ist zu sehen, dass der IgG-Titer in beiden Mäusen nach der dritten Immunisierung höher als nach der zweiten Immunisierung ist (Rechtsverschiebung der Kurven). Die Milz von Maus 1 wurde für die erste Fusion verwendet, die Milz von Maus 2 für die zweite Fusion. Abb. 4-33B zeigt die Titer von Maus 1 am Tag der Fusion (drei Tage nach der vierten Immunisierung) im Vergleich zu einer Woche nach der dritten Immunisierung. Am identischen Verlauf der Kurven ist abzulesen, dass die vierte Immunisierung keinen weiteren Titeranstieg mehr bewirkte. Der exakte Titer lässt sich aus den Wendepunkten der Kurven ablesen (entspricht der Konzentration, bei der die Antigenbindung auf 50% des Maximalwertes abfällt) und liegt hier bei Serumverdünnungen zwischen 1:10⁴ und 1:10⁵.

A



B

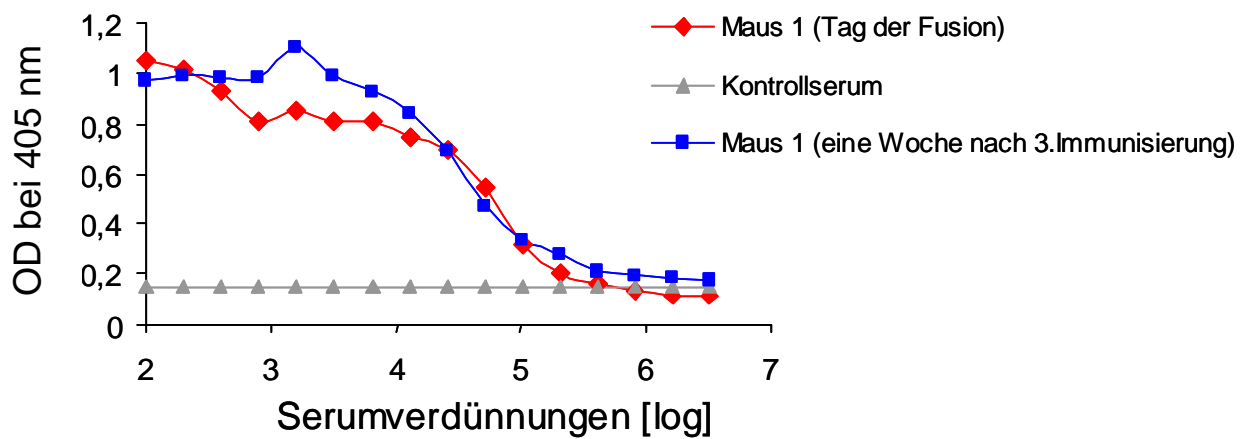


Abbildung 4-33:

Nachweis spezifischer anti-mLIGHT-Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse. mLIGHT wurde an eine Mikrotiterplatte gebunden und mit Immuns serum versetzt (Verdünnungen $1:10^2$ bis $1:10^6$ in 0,1% BSA-TBS). Als Negativkontrolle wurde das Serum einer nicht-immunisierten LIGHT^{-/-} Maus in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit anti-Maus-IgG-AP („ γ -chain specific“) und anschließender Substratumsetzung detektiert.

4.6.2 Klonierte, stabil anti-mLIGHT-Antikörper produzierende Hybridome

Elf Tage nach der Fusion waren in 138 Wells (1. Fusion) bzw. 394 Wells (2. Fusion) Klone sichtbar, deren Überstände mittels ELISA auf anti-mLIGHT-Antikörperproduktion getestet wurden (Abb. 4-34). Von den positiven Hybridomen konnten nach Subklonierung die in der folgenden Tabelle genannten Hybridome stabil etabliert werden. Alle gezeigten Hybridome produzieren Antikörper vom Isotyp IgG.

Hybridom
1A9
4B1
5G8
9D10
15B2

Tabelle 4-8:

Übersicht über die anti-mLIGHT-Antikörper (Isotyp IgG) produzierenden Hybridome

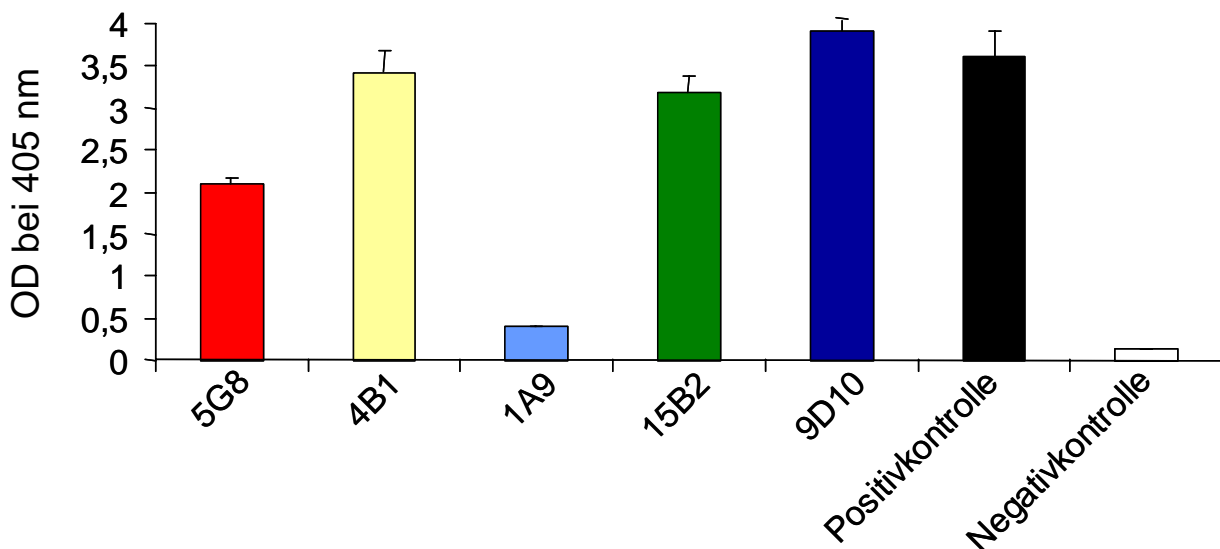


Abbildung 4-34:

Spezifität der von den Hybridomen sezernierten Antikörper. mLIGHT wurde an eine Mikrotiterplatte gebunden und mit den Überständen der Hybridome versetzt. Als Negativkontrolle diente RPMI-Medium, als Positivkontrolle das Serum einer immunisierten Maus (Verdünnung 1:10⁵). Gebundene Antikörper wurden mit anti-Maus-IgG-AP („γ-chain specific“) und anschließender Substratumsetzung detektiert.

4.6.3 Reinigung über eine Protein-G-Sepharose-Säule

Zur Herstellung größerer Mengen gereinigter Antikörper wurden die Kulturüberstände der Hybridome gesammelt und eine Proteinfällung mit Ammoniumsulfat (siehe 3.2.7) durchgeführt. Anschließend wurden daraus die Immunglobuline durch Chromatographie an einer Protein-G-Sepharose-Säule gereinigt. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen der Elution wurde mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung überprüft. Es wurden alle fünf gesammelten Hybridomüberstände auf diese Weise gereinigt und auf Reinheit geprüft, exemplarisch sind hier 5G8 und 4B1 gezeigt (Abb. 4-35). Man sieht im Gel, dass der Hauptteil der Antikörper in den Fraktionen 1.2 und 1.3 von der Säule eluierte, wobei die Bande um 60 kDa die schwere Kette des Antikörpers darstellt und die Bande um 30 kDa die leichte Kette.

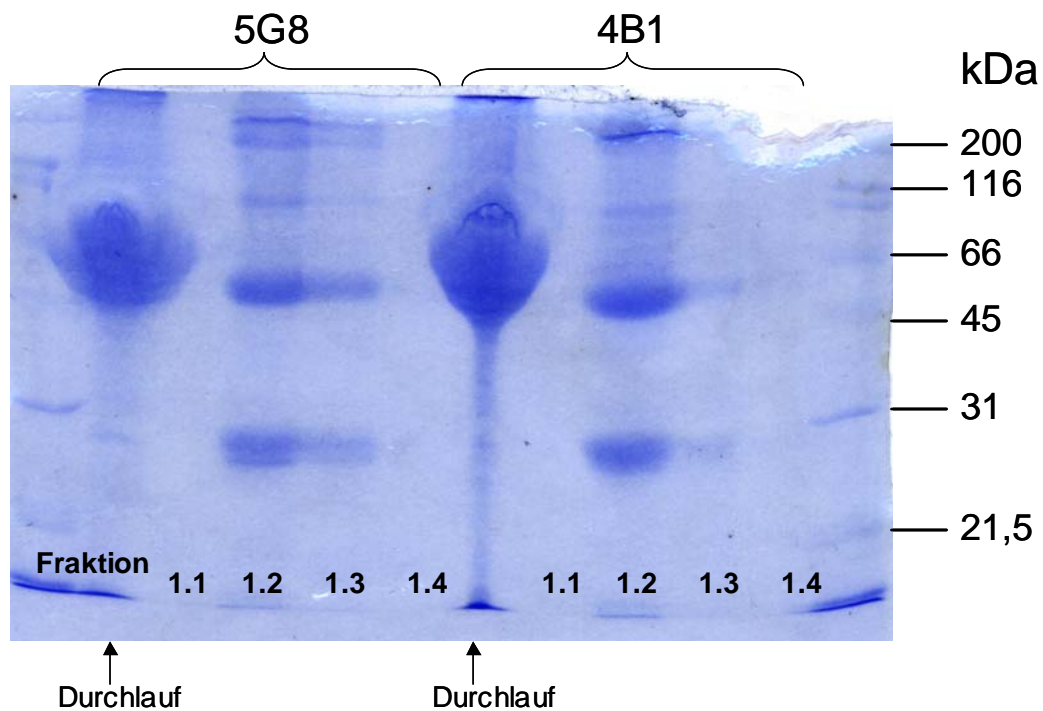


Abbildung 4-35:

Überprüfung der Reinheit der gereinigten Antikörper durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung. Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen (12,5%iges Gel). 1.1 bis 1.4: Fraktionen der Elution.

4.6.4 Detektion von rekombinantem mLIGHT im Dot Blot

Die von den Hybridom-Linien produzierten gereinigten Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit hin getestet, rekombinantes mLIGHT im Dot Blot zu erkennen. mLIGHT wurde dabei in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen, als Negativkontrolle diente BSA. Mit allen fünf Antikörpern konnte mLIGHT detektiert werden (Abb. 4-36). Die Antikörper zeigten keine Reaktion mit BSA, was die Spezifität der Antikörper unterstreicht. Die Kontrolle zeigt, dass der verwendete Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-POX allein nicht an mLIGHT bindet (Negativkontrolle), wohl aber an gereinigtes mIgG (Positivkontrolle).

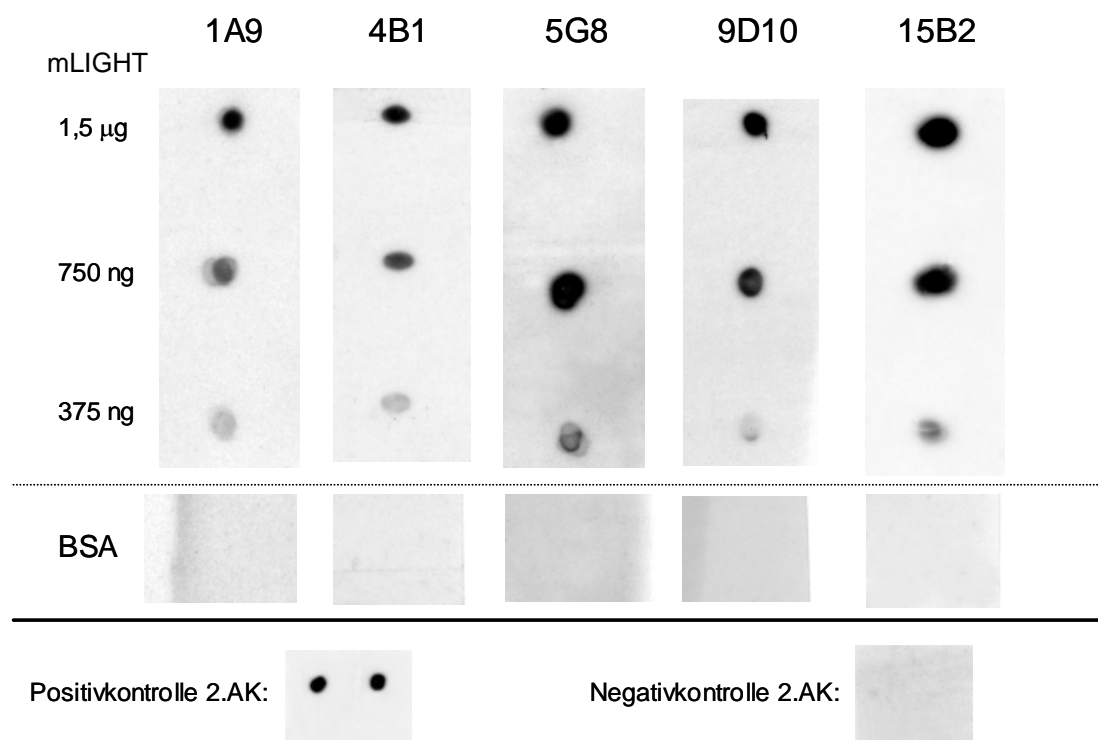


Abbildung 4-36:

Detektion von mLIGHT durch monoklonale anti-mLIGHT-Antikörper im Dot Blot. Jeweils 1,5 µg, 750 ng und 375 ng mLIGHT wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Nach Inkubation mit den verschiedenen gereinigten Hybridomüberständen diente als Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-POX. Positivkontrolle Sekundär-AK: Auftragung von mIgG₁, kein Hybridomüberstand, dann anti-Maus-IgG-POX. Negativkontrolle Sekundär-AK: Auftragung von mLIGHT, kein Hybridomüberstand, dann anti-Maus-IgG-POX.

4.6.5 Detektion von rekombinantem mLIGHT im Western Blot

Als nächstes wurden die gereinigten monoklonalen Antikörper im Western Blot getestet. Dabei wurde nicht nur die Bindung an Maus-LIGHT, sondern auch die Bindung an Human-LIGHT (hLIGHT) untersucht. mLIGHT und hLIGHT besitzen 77% Aminosäure-Homologie (Tamada, 2000b). Beide Proteine wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel durch Erhitzen mit Mercaptoethanol reduziert. Nach der Elektrophorese im denaturierenden SDS-Gel und Membrantransfer konnte mit 9D10, 15B2 und 4B1 mLIGHT detektiert werden, wobei nur 15B2 mit hLIGHT kreuzreagierte (Abb. 4-37). 5G8 und 1A9 zeigten hier keine spezifische Bindung.

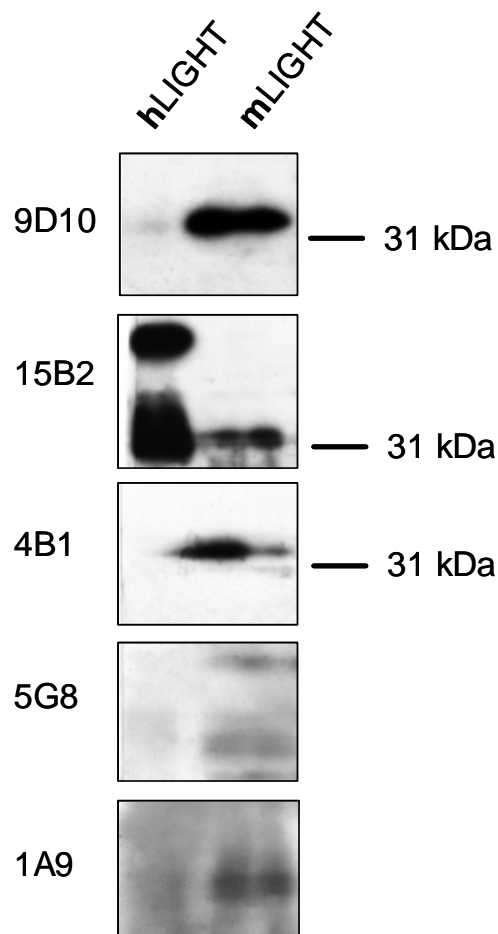


Abbildung 4-37:

Detektion von LIGHT durch monoklonale anti-mLIGHT-Antikörper im Western Blot. Pro Spur wurden 1,5 μ g mLIGHT bzw. hLIGHT im denaturierenden SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend per Kapillarblot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die monoklonalen Antikörper wurden mit anti-Maus-IgG-POX detektiert.

4.6.6 Detektion von endogenem mLIGHT mittels Durchflusszytometrie

Für diesen Versuch mussten zunächst Zellen identifiziert werden, die LIGHT in ausreichender Menge auf ihrer Oberfläche exprimierten. Nachdem aus der Literatur bereits bekannt war, dass LIGHT in erster Linie auf aktivierten T-Lymphozyten, unreifen Dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden ist (Kim, 2005; Mauri, 1998; Tamada, 2000a), wurde hier die CD8⁺ Tumor-T-Zelllinie PMMI gewählt. Diese Zellen wurden mit PMA und Ionomycin für 4 Stunden stimuliert. Mit humanen CD8⁺ T-Zellen wurde kürzlich gezeigt, dass unter diesen Inkubationsbedingungen LIGHT auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wenn auch nur in sehr geringen Mengen (Cohavy, 2005).

4.6.6.1 PCR auf mLIGHT mit stimulierten PMMI

Zunächst wurde mittels RT-PCR überprüft, ob nach Stimulierung der PMMI-Zellen eine Expression von mLIGHT nachzuweisen ist. Dazu wurde aus stimulierten und unstimulierten PMMI-Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und ein für LIGHT spezifisches Fragment in der PCR amplifiziert. Tatsächlich konnte für die stimulierten PMMI eine stark erhöhte Expression von mLIGHT gefunden werden (Abb. 4-38), wohingegen die unstimulierten PMMI keine LIGHT-Expression zeigten. Dieses Experiment gibt allerdings keinen Aufschluss über die tatsächliche Menge an LIGHT-Protein auf der Oberfläche der Zellen.

Eine Publikation zeigt, dass LIGHT nicht nur auf der Zelloberfläche nachweisbar ist. Bei einer humanen T-Zelllinie (IL-23) wurde eine Isoform von hLIGHT intrazellulär (im Cytosol) gefunden, bei einer humanen Nierenzelllinie (293T) fand man abgespaltenes hLIGHT im Zellkulturüberstand (Granger, 2001).

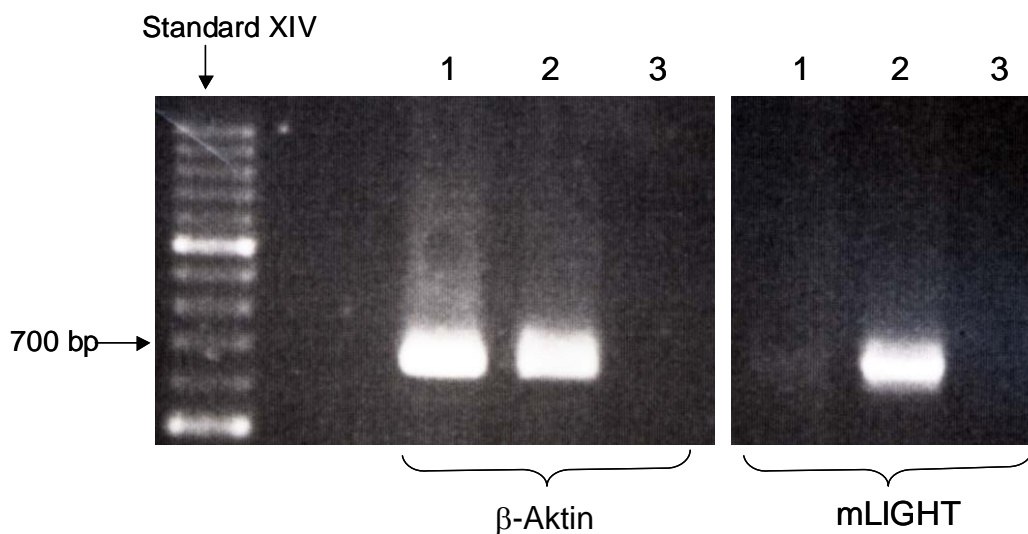


Abbildung 4-38:

RT-PCR auf mLIGHT. PMMI-Zellen wurden 4 h mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert, RNA wurde mittels TRizol-Reagenz isoliert. Für die Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von cDNA verwendet. Reihe 1: unstimulierte PMMI, Reihe 2: stimulierte PMMI, Reihe 3: Negativkontrolle.

4.6.6.2 Durchflusszytometrie mit stimulierten PMMI

Um die Eignung der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper für die Durchflusszytometrie zu testen, wurden stimulierte und nicht stimulierte PMMI mit gereinigten 1A9, 5G8, 4B1, 15B2 und 9D10 inkubiert und anschließend mit einem anti-Maus-IgG-FITC Antikörper gefärbt. Dieser Sekundärantikörper ist „Fab-spezifisch“, er bindet daher sehr spezifisch nur an Maus-IgG. In einem Kontrollversuch konnte nachgewiesen werden, dass keine Bindung des Sekundärantikörpers an die PMMI-Zellen stattfand, die ja auch mäuseichen Ursprungs sind. Einer der monoklonalen Antikörper, nämlich 5G8, zeigte Bindung an die stimulierten PMMI, nicht jedoch an die unstimulierten Zellen (Abb. 4-39). Bei allen anderen monoklonalen Antikörpern war keine Signalverschiebung zu beobachten, was bedeutet, dass sie nicht gebunden haben. Tote Zellen wurden mit Propidium-Iodid (PI) gefärbt und in der unten gezeigten Abbildung bereits ausgeschlossen.

5G8 ist somit für die Durchflusszytometrie geeignet, alle übrigen Antikörper nicht. Es bleibt jedoch ungeklärt, wieviel mLIGHT-Protein tatsächlich auf der Oberfläche der stimulierten PMMI-Zellen vorhanden war.

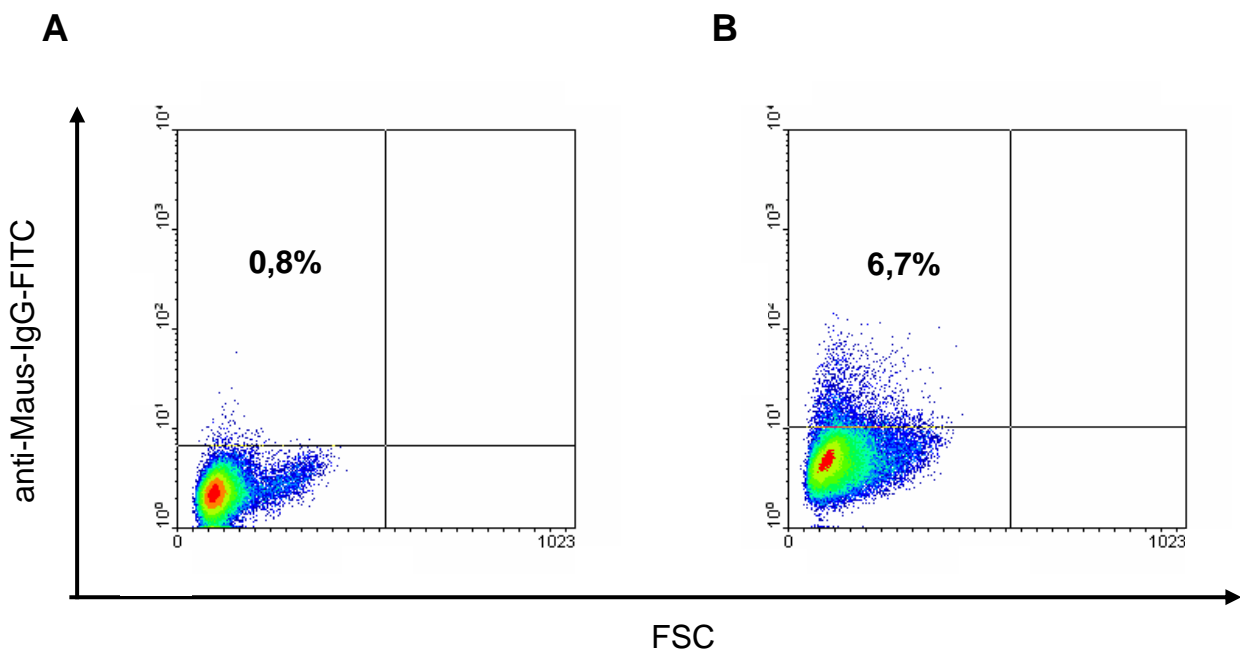


Abbildung 4-39:

Durchflusszytometrische Detektion von mLIGHT auf PMMI mit dem Antikörper 5G8.

A) unstimulierte PMMI. B) stimulierte PMMI, Zellen wurden 4 h mit 50 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Nach einer Blockierung mit Ziegen-Serum (1:100) wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 5G8 inkubiert. Zur Detektion wurde ein anti-Maus-IgG-FITC-markierter Antikörper (Fab-spezifisch) eingesetzt. Tote Zellen wurden mit PI gefärbt und ausgeschlossen.

4.6.6.3 Durchflusszytometrie mit CD8⁺ T-Lymphozyten aus der Maus

Als nächstes wurden die gereinigten monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper auf die Fähigkeit hin getestet, an aktivierte T-Zellen aus der Maus zu binden. Mit Hilfe von LIGHT^{-/-} Mäusen könnte somit ein weiterer Nachweis für die Spezifität der Antikörper erbracht werden, indem sie nur an aktivierte T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen, nicht aber an T-Zellen aus LIGHT^{-/-} Mäusen binden. Wie in den letzten beiden Punkten erläutert, ist es allerdings sehr schwierig, ausreichend LIGHT an die Oberfläche der untersuchten Zellen zu bringen. Daher wurde zunächst ein Versuch durchgeführt, der klären sollte, ob nach Stimulierung überhaupt LIGHT an der Zelloberfläche nachzuweisen ist. Dies geschah mit Hilfe eines Fusionsproteins, LTβR-Ig, das sowohl LIGHT als auch LTα₁β₂ bindet, also beide Liganden des LTβR (Hehlhans, 2002). Um „Störsignale“ durch die Bindung des LTβR-Ig an LTα₁β₂ zu verhindern, wurden für diesen Versuch T-Zellen aus einer LTαβ^{-/-} Maus verwendet. Falls das Fusionsprotein an die aktivierten T-Zellen der LTαβ^{-/-} Maus bindet, kann dies nur über eine Bindung an LIGHT geschehen.

Da mit sehr wenig LIGHT-Protein an der Oberfläche gerechnet wurde, sollte eine möglichst reine CD8⁺ T-Zell-Population generiert werden. Dafür wurden aus Milzen von LTαβ^{-/-} Mäusen mittels magnetvermittelter Zellsortierung (MACS) zunächst CD8⁺ T-Zellen gewonnen. Durch Reanalyse der sortierten Zellen in der Durchflusszytometrie konnte eine Anreicherung der CD8⁺ T-Zell-Population auf ca. 91% der gesamten T-Zellen detektiert werden (Abb. 4-40A). Diese CD8⁺ T-Zellen wurden anschließend mit PMA/ Ionomycin bzw. alternativ mit anti-CD3/ anti-CD28-Antikörpern für 3 h stimuliert.

Mit den humanen CD8⁺ T-Zellen konnte auch durch Stimulierung mit anti-CD2/ anti-CD28-Antikörpern LIGHT in geringen Mengen auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Cohavy, 2005). Bei einer speziellen Kinetik wurde ein Maximum nach Stimulierungszeiten von 2 bis 6 h beschrieben.

Wie in Abb. 4-40B gezeigt, konnte hier weder nach Stimulierung mit PMA/ Ionomycin noch nach Stimulierung mit anti-CD3/ anti-CD28-Antikörpern eine Bindung des LTβR-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Das heißt, mLIGHT war gar nicht, oder nicht in ausreichender Menge auf der Oberfläche der stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus der Mausmilz vorhanden. Auf Grund dieser Erkenntnis wurde auf die Untersuchung der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper in diesem durchflusszytometrischen Testsystem verzichtet.

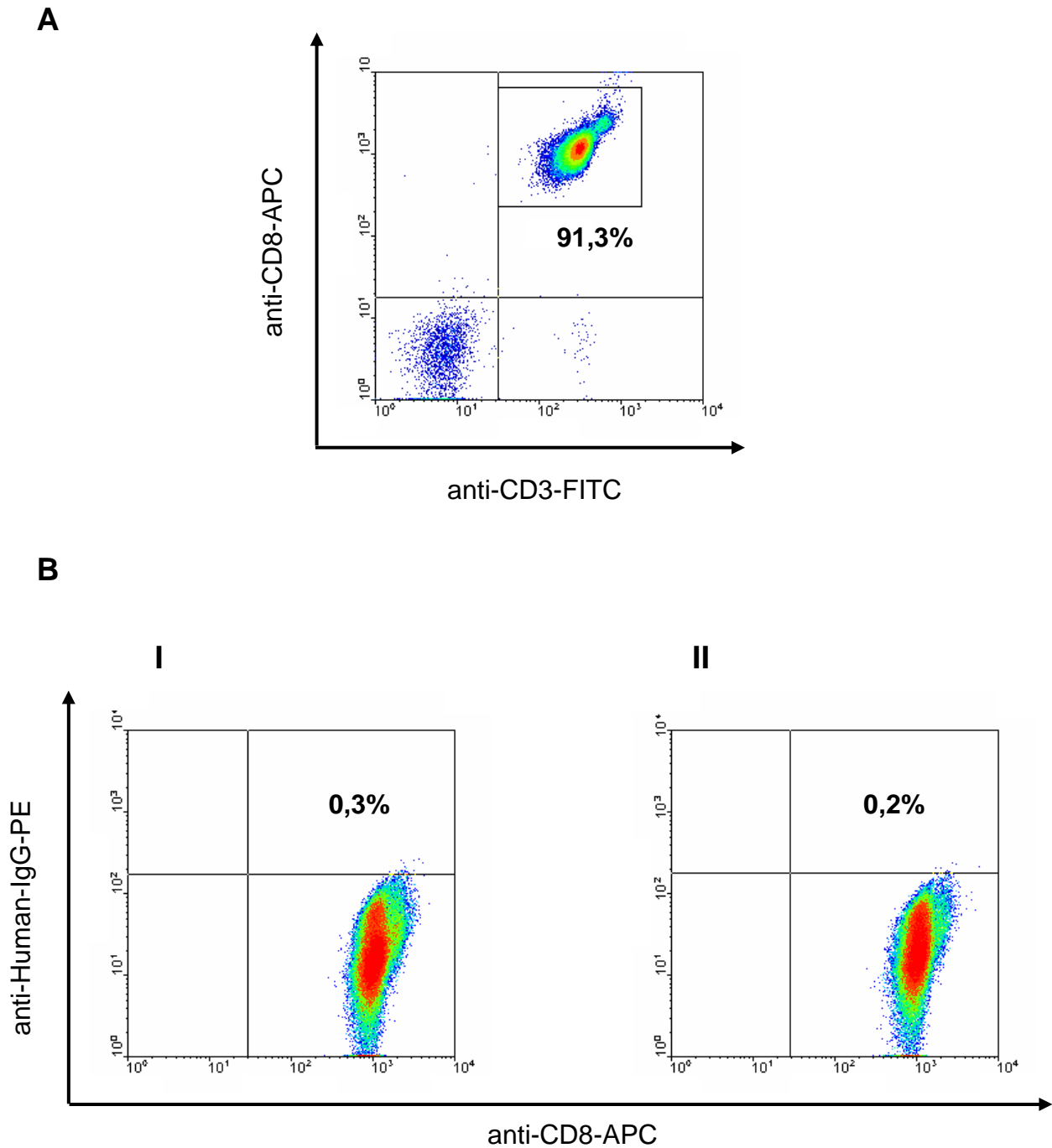


Abbildung 4-40:

Durchflusszytometrische Detektion von mLIGHT auf CD8⁺ T-Zellen aus LT α β ^{-/-} Mäusen mit LT β R-Ig. A) Reanalyse der sortierten CD8⁺ T-Zellen. B) (I) Zellen wurden 3 h mit 50 ng/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin bzw. (II) mit 1 μ g/ml eines anti-CD3-Antikörpers (*plate bound*) und 1 μ g/ml eines löslichen anti-CD28-Antikörpers stimuliert. Nach Blockierung wurden die Zellen mit LT β R-Ig inkubiert. Zur Detektion wurde ein anti-Human-IgG-PE-markierter Antikörper eingesetzt. Tote Zellen wurden mit PI gefärbt und ausgeschlossen.

4.6.7 *In vitro*-Test der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper

Es wurde bereits beschrieben, dass die Aktivierung des LT β R auf humanen Melanomzellen (A375) durch hLIGHT zur verstärkten Produktion von IL-8 führt (Hehlgans, 2001). Bei L929-Zellen resultiert die Stimulierung mit mLIGHT in der Aktivierung von NF κ B und der Produktion von MIP-2 und IL-6 (Hehlgans, 2003). Letzteres wurde bei diesem *in vitro*-Experiment genutzt. L929-Zellen wurden mit mLIGHT stimuliert bzw. mit mLIGHT, das zuvor mit den anti-mLIGHT-Antikörpern vorinkubiert worden war. Falls die Antikörper mLIGHT neutralisieren, indem sie so binden, dass mLIGHT nicht mehr an den LT β R binden kann, sollte kein Anstieg der IL-6 Produktion mehr zu beobachten sein.

L929-Zellen wurden ausgesät und 24 h wachsen gelassen. Anschließend wurde mit mLIGHT bzw. mit mit anti-mLIGHT-Antikörpern vorinkubiertem mLIGHT für 24 h stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf die Konzentration an IL-6 untersucht. Für 1A9, 4B1 und 5G8 konnte ein positives Ergebnis dieses Tests gezeigt werden (Abb. 4-41), das heißt, diese Antikörper können mLIGHT *in vitro* neutralisieren und so eine Aktivierung des LT β R verhindern.

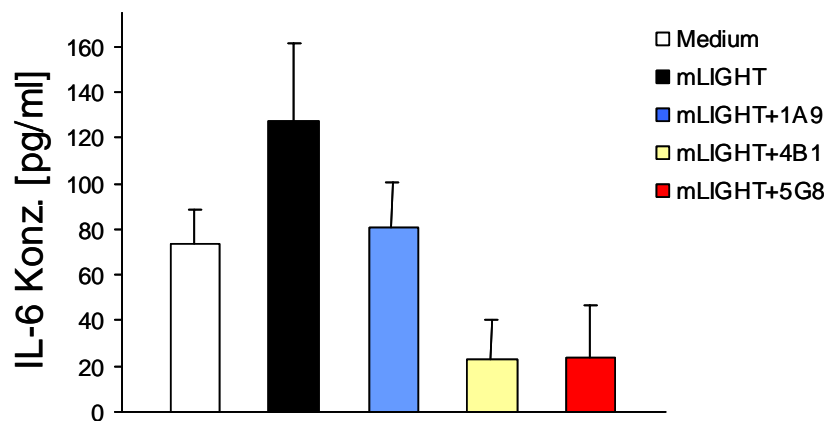


Abbildung 4-41:

IL-6 Produktion von L929-Zellen nach 24 h Stimulierung mit 10 μ g/ml mLIGHT bzw. mit mit anti-mLIGHT-Antikörpern vorinkubiertem mLIGHT (für 2 h). Mittels ELISA wurde die IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Als Kontrolle diente Medium allein.

4.6.8 *In vivo*-Test der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper

Das ursprüngliche Ziel der Herstellung dieser monoklonalen Antikörper war deren Verwendung in der DSS-Colitis. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass LIGHT-/- Mäuse so gut wie keine intestinale Entzündung nach der Induktion der DSS-Colitis entwickelten, sollte nun die Wirkung einer Neutralisierung des Liganden LIGHT mit den monoklonalen Antikörpern in diesem Modell untersucht werden. Wenn die anti-mLIGHT-Antikörper *in vivo* neutralisierend binden und dadurch die Aktivierung der Rezeptoren und

anschließende proinflammatorische Effekte verhindern, sollte es den Mäusen nach Antikörper-Behandlung im Colitis-Modell besser gehen. Um diese These zu klären, wurde in C57BL/6-Mäusen eine akute DSS-Colitis induziert. An den Tagen 1 bis 6 während der DSS-Gabe wurde den Mäusen täglich 100 µg 5G8, 9D10 bzw. 15B2 intraperitoneal verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt 100 µg mIgG. Innerhalb der sieben Tage verlor die Kontrollgruppe etwa 10% ihres Ausgangsgewichtes, die mit anti-mLIGHT-Antikörpern behandelten Tiere verloren lediglich 0 bis 2% ihres Ausgangsgewichtes. Am Tag 7 war der Unterschied im Gewichtsverlust zwischen der 15B2- und der mIgG-behandelten Gruppe signifikant (Abb. 4-42). Der histologische Score konnte mit den Antikörpern 9D10 und 15B2 signifikant, im Vergleich zur Kontrollgruppe fast um die Hälfte reduziert werden (Abb. 4-43). Bei der 5G8-behandelten Gruppe ergab sich ein ähnlicher histologischer Score wie bei der Kontrollgruppe. 15B2 und 9D10 sind somit *in vivo* wirkungsvolle Antikörper, die im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis die intestinale Entzündung effektiv bekämpfen und abschwächen konnten.

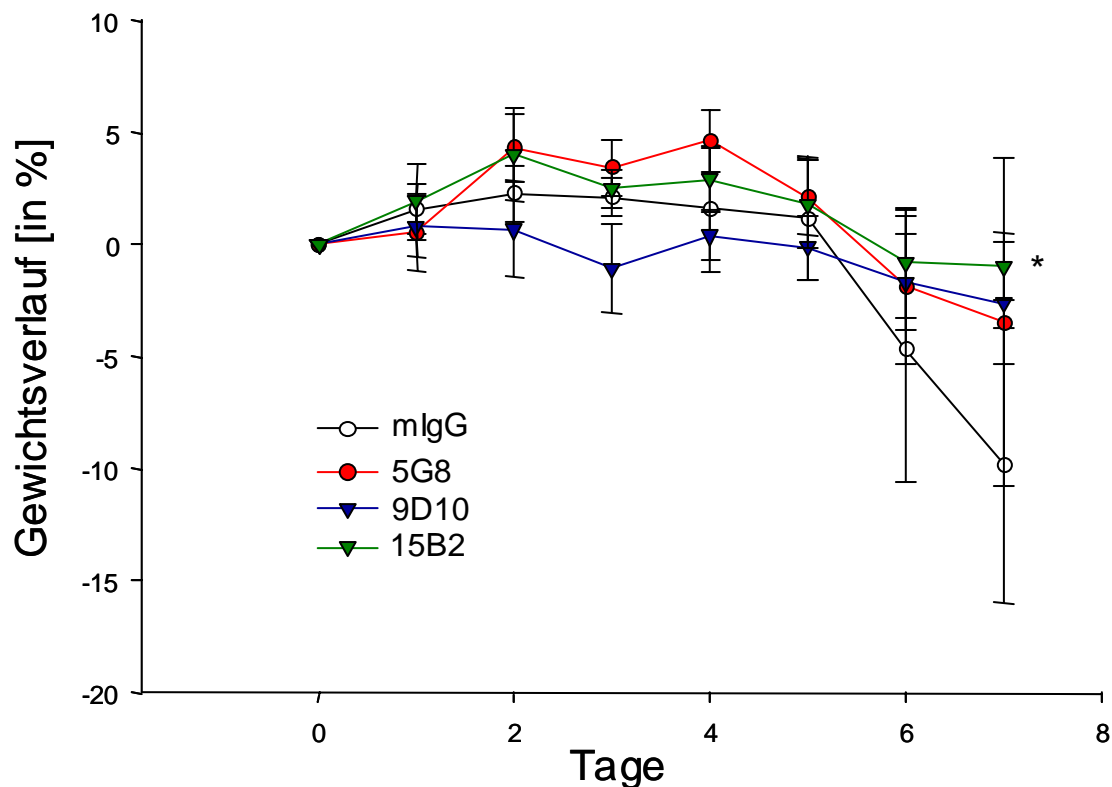


Abbildung 4-42:

Gewichtsverlust der mit anti-mLIGHT-Antikörpern behandelten Mäuse während der DSS-induzierten akuten Colitis im Vergleich zur mIgG-behandelten Kontrollgruppe. Der Gewichtsverlust ist angegeben in % des ursprünglichen Gewichts der Mäuse (n=5). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$

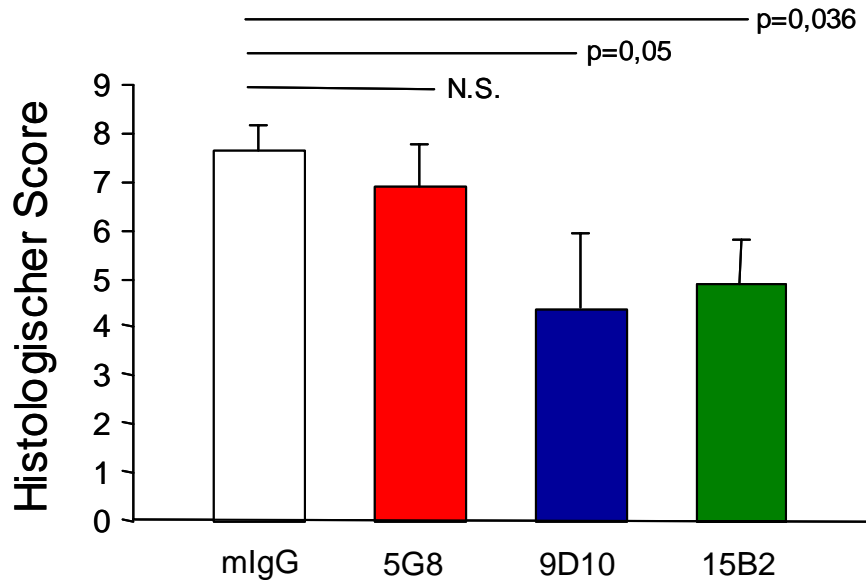


Abbildung 4-43:

Histologischer Score der mit anti-mLIGHT-Antikörpern behandelten Mäuse nach DSS-induzierter akuter Colitis im Vergleich zur mIgG-behandelten Kontrollgruppe (Tag 7). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test ermittelt (n=5). Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.6.9 Vergleichende Epitopbestimmung mittels ELISA

Zur Vervollständigung der Charakterisierung der hergestellten Antikörper und insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Verwendung im ELISA, wurden vergleichend die von den einzelnen Antikörpern erkannten Epitope bestimmt. Für einen Einsatz im Sandwich-ELISA wären zwei Antikörper nötig, die verschiedene Epitope des Antigens (mLIGHT) erkennen, nur so könnte einer als „Fang-Antikörper“ und einer als Sekundäntikörper fungieren. Mit einem ELISA wie diesem könnte zum Beispiel das Serum von Mäusen mit DSS-Colitis auf das Vorkommen von löslichem mLIGHT untersucht werden.

Zur Epitopbestimmung mittels ELISA wurde einer der Antikörper (4B1) mit Biotin markiert. mLIGHT wurde an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einer Mischung aus unmarkiertem und Biotin-markiertem Antikörper inkubiert. Dabei wurde das Verhältnis des unmarkierten zu Biotin-markiertem Antikörper von 0-, 20-, 50- bis 80-fachen Überschuss an unmarkiertem Antikörper variiert. Die Menge an Biotin-markiertem Antikörper wurde dabei konstant gehalten. Als Positivkontrolle für maximale Verdrängung wurde eine Mischung aus der biotinylierten und der nicht biotinylierten Form von 4B1 benutzt. Erwartungsgemäß trat mit zunehmender Menge an 4B1 eine Abnahme der Anheftung von 4B1-Biotin an das immobilisierte Antigen ein, was zu einer Abnahme der Absorption führte (Abb. 4-44A).

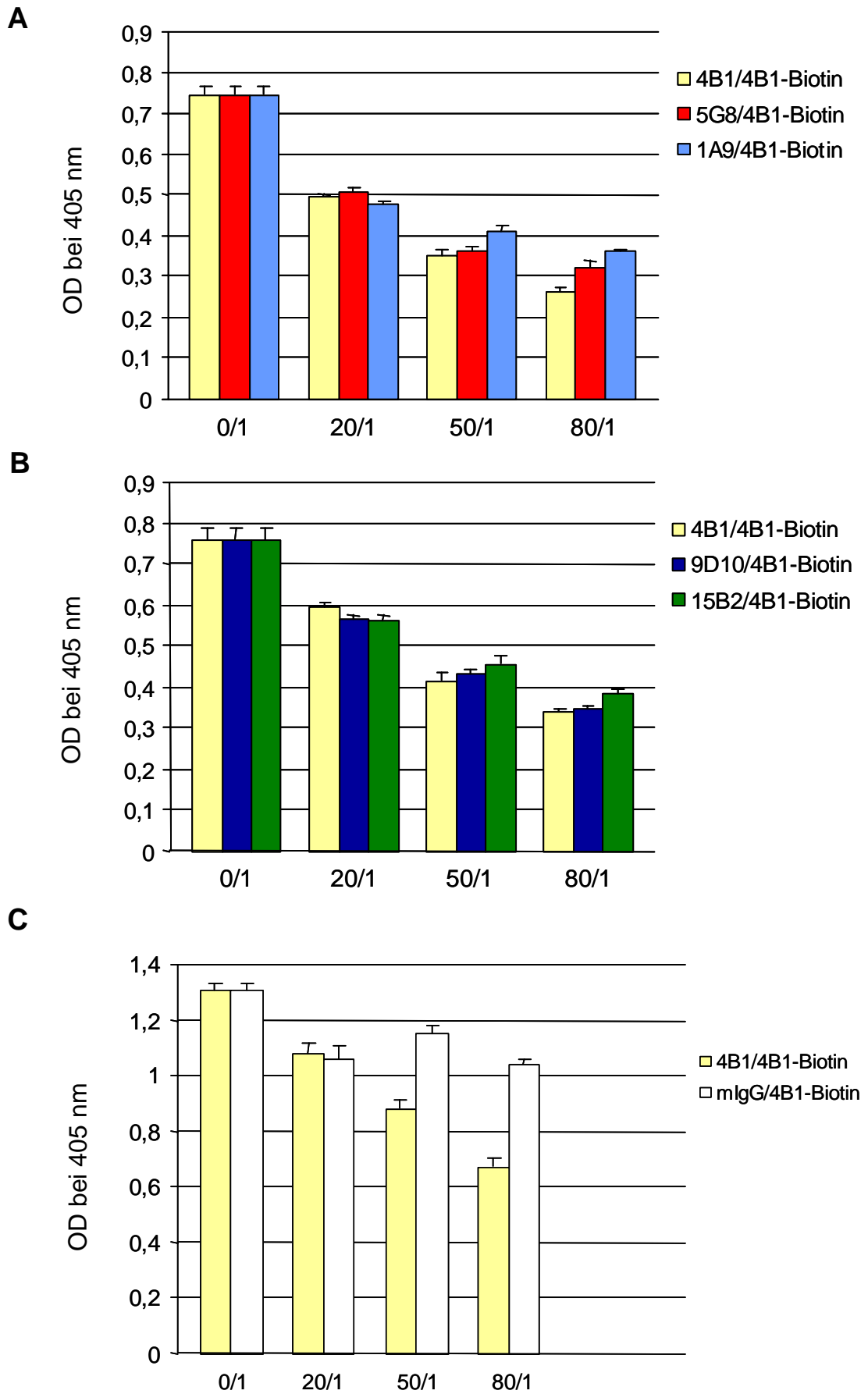


Abbildung 4-44:

Epitopbestimmung der monoklonalen Antikörper mittels kompetitivem ELISA. An eine Mikrotiterplatte wurde mLIGHT (5 µg/ml) immobilisiert und mit einer Mischung aus unmarkiertem und Biotin-markiertem Antikörper (Verhältnis 0/1, 20/1, 50/1, 80/1) inkubiert. In A) sind die Paare 4B1/4B1-Biotin, 5G8/4B1-Biotin und 1A9/4B1-Biotin dargestellt, in B) die Paare 4B1/4B1-Biotin, 9D10/4B1-Biotin und 15B2/4B1-Biotin. C) Kontroll-mIgG/4B1-Biotin. Die Detektion erfolgte mit HRP-gekoppeltem Streptavidin und ABTS-Substrat-Umsetzung.

Wie aus Abb. 4-44A und B ersichtlich ist, verursachten ansteigende Konzentrationen an 5G8, 1A9, 15B2 und 9D10 ebenfalls eine Abnahme der Absorption. In Abb. 4-44C wurde in ansteigender Konzentration ein irrelevanter Kontroll-Antikörper (mIgG) verwendet. Dieses Kontroll-IgG verdrängte 4B1-Biotin nicht, die Absorption blieb in etwa auf Ausgangsniveau.

Das heißt, dass 4B1 und die anderen vier Antikörper um das gleiche Epitop konkurrieren und sich gegenseitig verdrängen. Die monoklonalen Antikörper müssen nicht unbedingt exakt die gleiche Aminosäuresequenz binden, aber sie behindern sich sterisch bei der Bindung an das Epitop. Durch die Konkurrenz der Antikörper untereinander sind diese ungeeignet für einen gemeinsamen Einsatz im ELISA.

4.7 LIGHT-Serumspiegel in Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten

In Punkt 4.6.9 wurde gezeigt, dass mit den monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörpern kein ELISA zur Detektion von mLIGHT etabliert werden kann. Ziel eines solchen ELISAs wäre zum Beispiel die Serum-Untersuchung von Mäusen mit DSS-Colitis auf das Vorhandensein von mLIGHT. Nachdem seit kurzem ein ELISA zur Detektion von humanem LIGHT (hLIGHT) kommerziell erhältlich ist, wurde mit Hilfe dieses ELISAs das Serum von Colitis ulcerosa- (CU) und Morbus Crohn-Patienten (MC) untersucht. Der Immunstatus der Patienten sollte möglichst der realen, unbehandelten Krankheitssituation entsprechen, daher wurden Patienten mit Glukokortikoid-, anti-TNF- oder immunsuppressiver Therapie nicht in die Studie mit eingeschlossen. Bei beiden Krankheitsbildern wurden jeweils Patienten mit akutem Schub und Patienten mit chronischer Entzündung untersucht, bei der Kontrollgruppe handelt es sich um „Darm-gesunde“ Probanden. Tatsächlich wurden in allen vier Patienten-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere hLIGHT-Spiegel im Serum gefunden (Abb. 4-45). Zwischen MC- und CU-Patienten bzw. zwischen Patienten mit akutem Schub und chronischer Entzündung ergaben sich keine Unterschiede im hLIGHT-Serumspiegel.

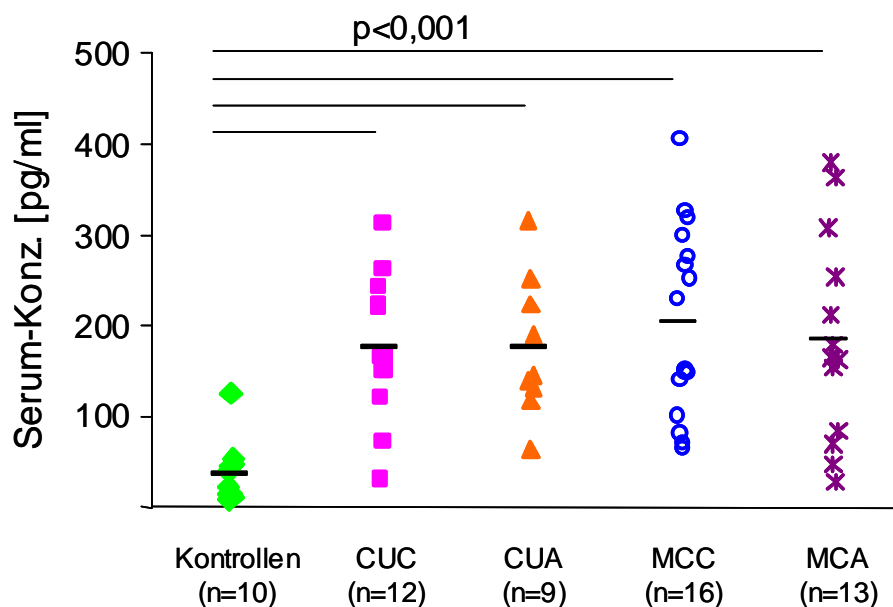


Abbildung 4-45:

Serum-Untersuchung von Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten auf hLIGHT im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mittels Quantikine®-ELISA wurden Serumproben von Colitis ulcerosa-Patienten mit akutem Schub (CUA) bzw. mit chronischer Entzündung (CUC) und von Morbus Crohn-Patienten mit akutem Schub (MCA) bzw. mit chronischer Entzündung (MCC) untersucht. Als Kontrollgruppe wurde das Serum von „Darm-gesunden“ Probanden verwendet.

5. Diskussion

5.1 $LT\alpha\beta$ und LIGHT in akuter DSS-induzierter Colitis

Um die Rolle der Aktivierung des $LT\beta R$ in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersuchen zu können, wurde das Modell der DSS-induzierten Colitis mit verschiedenen gendefizienten Mäusen durchgeführt. DSS ist ein Polymer, das den Mäusen über das Trinkwasser verabreicht wird. Nach wenigen Tagen führt dies bei den Mäusen zu Gewichtsverlust, Durchfall, Entzündung des Dickdarms und Ulzerationen (Okayasu, 1990). Die akute DSS-induzierte Colitis erstreckt sich über 7 Tage. Histologisch zeigen sich nach der Colitis-Induktion in erster Linie Makrophagen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, aber auch Lymphozyten im Infiltrat der Lamina propria. Das den Mäusen verabreichte DSS führt zu Epithelschädigungen und zum fokalen Untergang von mucosalen Krypten und Becherzellen. Pathogenetisch spielen aktivierte Makrophagen, die das DSS phagozytieren, eine große Rolle. Nachweislich steigt der histologische Score, der wichtigste und aussagekräftigste Parameter nach DSS-induzierter Colitis, mit zunehmender DSS-Konzentration an (Egger, 2000). Dabei ist die absolute Menge an DSS-Wasser, das die Mäuse zu sich nehmen, nicht entscheidend. Die intestinale Entzündung führt hierbei in erster Linie zur verstärkten Expression von Th1-Zytokinen, wie zum Beispiel $IFN-\gamma$, TNF und IL-1.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des $LT\beta R$ durch $LT\alpha_1\beta_2$ im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis essentiell ist, um die intestinale Entzündung bekämpfen zu können. Die untersuchten **$LT\alpha\beta$ -defizienten Mäuse** wiesen hinsichtlich der Parameter Gewichtsverlust, Histologie mit histologischem Score, Dickdarmlänge, MPO-Aktivität und *ex vivo*-Zytokinsekretion von Milzzellen eine signifikant größere intestinale Entzündung auf als die WT-Kontrollgruppe. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die Neutralisierung der $LT\beta R$ -Liganden durch ein $LT\beta R$ -Ig Fusionsprotein im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis die intestinale Entzündung verstärkte. Weiterhin wurden auch $LT\beta R$ -defiziente Mäuse untersucht, die nach der Induktion der akuten DSS-Colitis ebenfalls eine signifikant erhöhte intestinale Entzündung zeigten (Dissertation P. Stopfer). Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, dass zum einen die Interaktion von $LT\alpha_1\beta_2$ mit dem $LT\beta R$ wichtig ist, um der Entwicklung und Manifestation einer intestinalen Entzündung entgegenwirken zu können. Zum anderen fehlen bei den in dieser Arbeit näher charakterisierten $LT\alpha\beta$ -defizienten Mäusen die möglichen Interaktionen von $LT\alpha_3$ mit den beiden TNF-Rezeptoren und mit HVEM. Auch die Aktivierung dieser Rezeptoren durch $LT\alpha_3$ könnte für die Gegenregulation der intestinalen Entzündung essentiell sein. Die Relevanz von $LT\alpha$ in der DSS-induzierten Colitis wird in der Literatur

näher erläutert. $LT\alpha$ -defiziente Mäuse hatten in diesem Modell der akuten Colitis eine signifikant stärkere Entzündung im Dickdarm als die Kontrollgruppe (Spahn, 2002). Den $LT\alpha$ -defizienten Mäusen fehlen - genau wie den $LT\alpha\beta$ -defizienten Mäusen - Lymphknoten und Peyer's Patches. Diese Tatsache wurde als Ursache für die erhöhte intestinale Entzündung diskutiert. Mesenteriale Lymphknoten (mLN) und Peyer's Patches (PP) sind für die Aufrechterhaltung der mucosalen Barrierefunktion und für die Kontrolle intestinaler Entzündung wichtige Organe. Spahn et al. sehen mLN und PP als absolut notwendig an, um eine orale Toleranz entwickeln zu können. Weiterhin wurden in dieser Veröffentlichung Mäuse *in utero* mit $LT\beta$ R-Ig bzw. mit $LT\beta$ R-Ig und TNFRI-Ig behandelt, um die Bildung von PP bzw. von PP und mLN zu verhindern. Nur wenn sowohl mLN als auch PP fehlten, war die intestinale Entzündung deutlich stärker ausgeprägt als in den Kontrollmäusen, ein alleiniges Fehlen der PP hatte keinen Einfluss auf die Schwere der Colitis. Die Abwesenheit von PP und mLN und die eventuell damit verbundene fehlende Toleranz könnte auch in den hier untersuchten $LT\alpha\beta$ -defizienten Mäusen die Ursache für die signifikant erhöhte Entzündung sein. Mit der Anwendung eines agonistischen $LT\beta$ R-Antikörpers während der Colitis-Induktion könnte abgeklärt werden, ob der Phänotyp der $LT\alpha\beta$ -defizienten Mäuse oder die fehlende Aktivierung des $LT\beta$ R für die verstärkte Entwicklung und Manifestation der Colitis entscheidend ist.

Interessant ist auch die Tatsache, dass die $LT\alpha\beta$ -defizienten Mäuse sowohl nach der akuten als auch nach der chronischen DSS-induzierten Colitis nicht in der Lage waren, tertiäre Lymphfollikel im Dickdarm auszubilden. Die Bildung dieser Strukturen („colonic lymphoid patches“) wird durch intestinale Entzündung ausgelöst und wurde bereits mehrfach in experimentellen Colitis-Modellen, aber auch bei CED-Patienten beschrieben. Durch immunhistochemische Färbungen wurde festgestellt, dass diese Follikel überwiegend aus $B220^+$ B-Lymphozyten bestehen und nur aus wenigen $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Lymphozyten (Spahn, 2002). Nach akuter Colitis zeigten $LT\alpha$ -defiziente Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen noch weniger T-Zellen in den tertiären Follikeln, wobei es bei den gendefizienten Mäusen keine klare Trennung zwischen B- und T-Zellbereichen gab. Unklar ist, warum die $LT\alpha$ -defizienten Mäuse tertiäre Lymphfollikel im Darm ausbilden konnten, die $LT\alpha\beta$ -defizienten in unseren Experimenten jedoch nicht. Bisher wurde $LT\beta$ als Ligand immer nur als Komplex mit $LT\alpha$ beschrieben, daher kann das Fehlen von $LT\beta$ kaum die Ursache sein. Die Aktivierung des $LT\beta$ R über $LT\alpha_1\beta_2$ scheint nach den Ergebnissen in dieser Arbeit für die Bildung der tertiären Lymphfollikel entscheidend zu sein. Bei früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden jedoch auch in $LT\beta$ R-defizienten Mäusen nach DSS-induzierter Colitis tertiäre Lymphfollikel im Dickdarm gefunden (Dissertation P. Stopfer). Folglich ist $LT\alpha_1\beta_2$ wichtig, eine Aktivierung des $LT\beta$ R jedoch nicht entscheidend. Dieser

Befund würde für die Existenz eines weiteren, noch nicht beschriebenen Rezeptors von $LT\alpha_1\beta_2$ sprechen.

5.1.1 Die Rolle von Bakterien

Ein weiterer Punkt, der in der Entwicklung der intestinalen Entzündung von großer Bedeutung ist und in vielen experimentellen Modellen bereits untersucht wurde, ist die bakterielle Infektion. Durch die Schädigung des Epithels im Darm kommt es zur Translokation fäkaler Bakterien, deren LPS und andere bakterielle Bestandteile zu einer starken Aktivierung von Makrophagen führen. Zusätzlich aktivieren bestimmte Bestandteile der bakteriellen DNA, die CpG-Motive („cytosin-guanosin dinucleotide“), eine ganze Reihe von Immunzellen. CpG-Motive kommen in Bakterien wesentlich häufiger (1/16) vor als in Wirbeltieren (1/60) und sind nur in Bakterien nicht methyliert. Die CpG-reichen Oligonukleotide können direkt oder auch indirekt Dendritische Zellen, Makrophagen, Lymphozyten oder NK-Zellen aktivieren (Obermeier, 2005b). Die prophylaktische Verabreichung von CpG-ODN („oligodeoxynucleotide“) vor der Induktion einer Colitis im Maus-Modell konnte die intestinale Entzündung signifikant reduzieren (Obermeier, 2005b; Obermeier, 2005a). Darüber hinaus war in akuter DSS-induzierter Colitis - nicht jedoch in chronischer DSS-Colitis - eine Behandlung mit Antibiotika erfolgreich (Hans, 2000).

Die Relevanz von $LT\alpha$ in der Bekämpfung von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen ist mehrfach in der Literatur beschrieben. $LT\alpha$ -defiziente Mäuse waren gegenüber einer Infektion mit Herpesviren oder Cytomegalie-Viren anfälliger als die untersuchten Kontrollmäuse (Benedict, 2001; Kumaraguru, 2001). Bei Infektionen mit Lymphozytären-Choriomeningitis-Viren zeigten $LT\alpha$ - und $LT\beta$ -defiziente Mäuse eine erhöhte Sterblichkeit auf Grund einer fehlenden Aktivierung Virus-spezifischer $CD8^+$ T-Lymphozyten (Berger, 1999; Suresh, 2002). Auch bei CED-Patienten wird häufig eine virale Infektion als Ursache der intestinalen Entzündung diskutiert.

$LT\alpha$ - und $LT\beta$ -defiziente Mäuse konnten aufgrund eines Defekts in der von Makrophagen exprimierten NO-Synthetase eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* nicht abwehren (Ehlers, 2003; Roach, 2001). Die Defekte der sekundären lymphatischen Strukturen spielten, wie mit Knochenmark-Chimären gezeigt, hier keine Rolle.

Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten $LT\alpha\beta$ -defizienten Mäusen könnte daher eine unzureichende Immunantwort der Makrophagen auf translozierte Bakterien eine weitere Ursache für die signifikant erhöhte intestinale Entzündung sein.

5.1.2 Die Rolle von $LT_{\alpha\beta}$ -exprimierenden Lymphozyten

Die Beteiligung von Lymphozyten am Entzündungsgeschehen in der akuten DSS-induzierten Colitis wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Studie belegt, dass die Anwesenheit von Lymphozyten nicht notwendig ist, um eine akute DSS-induzierte Colitis entwickeln zu können (Dieleman, 1994). Denn auch bei SCID-Mäusen, die keine B- und T-Lymphozyten besitzen, wurde im Modell der akuten Colitis eine intestinale Entzündung beobachtet. Dies wurde mit der Epithelschädigung des DSS, anschließender Aktivierung von Makrophagen und deren Produktion proinflammatorischer Zytokine wie $IL-1\beta$, $IL-6$ und TNF erklärt.

Bei anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Lymphozyten im Fortschreiten einer akuten experimentellen Colitis durchaus eine Rolle spielen. So scheinen aktivierte $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der Mucosa mit LPS bzw. mit LPS-aktivierten Makrophagen zu interagieren und die intestinale Entzündung voran zu treiben (Egger, 2000). Ebenso wird eine Beteiligung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten an der akuten DSS-induzierten Colitis beschrieben. Eine Veröffentlichung zeigte, dass der Transfer von T-Lymphozyten, die mit DSS-beladenen Makrophagen vorinkubiert wurden, kurz vor der Induktion einer akuten DSS-induzierten Colitis die intestinale Entzündung signifikant ansteigen ließ (Shintani, 1998). Die vorherige Depletion von $CD4^+$ T-Zellen *in vitro* in der transferierten T-Zell-Population hebte diesen Effekt auf. Auch die Depletion von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bzw. $CD8^+$ T-Lymphozyten durch spezifische Antikörper *in vivo* führte zu einer signifikant reduzierten Entzündung im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Yoshihara, 2006). Die Produktion von $IFN-\gamma$, TNF und $IL-12$ der Lamina propria-Zellen war in beiden Antikörper-behandelten Gruppen am Tag 5 der DSS-Gabe stark erniedrigt. Daher scheinen auch NK-Zellen und $CD8^+$ T-Lymphozyten an der Entwicklung und Manifestation der akuten Colitis beteiligt zu sein.

Durch die Ergebnisse mit den **konditionellen LT_{β} -defizienten Mäusen** wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich gemacht, dass sowohl T- als auch B-Lymphozyten am Entzündungsgeschehen in der akuten DSS-induzierten Colitis beteiligt sind. Nach der Colitis-Induktion war die intestinale Entzündung in T- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu B- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäusen nach den Parametern Gewichtsverlust, histologischer Score, MPO-Aktivität und Dickdarmlänge signifikant erhöht. Auch die Zytokinsekretion von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten war in den T- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäusen stark erhöht. Die Kontrollgruppe lag in allen untersuchten Parametern (bis auf die Dickdarmlänge) zwischen den beiden konditionellen gendefizienten Linien. Aktivierte, und somit $LT_{\alpha_1\beta_2}$ -exprimierende B-Lymphozyten scheinen in diesem Modell eine entscheidende Komponente in der Entwicklung und im Voranschreiten der intestinalen Entzündung zu sein. Denn, wie gezeigt, weisen gendefiziente Mäuse, die kein LT_{β} und somit kein $LT_{\alpha_1\beta_2}$ auf B-Lymphozyten

exprimieren, im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis so gut wie keine Entzündung des Dickdarms auf. $LT_{\alpha_1\beta_2}$ auf aktivierten B-Lymphozyten könnte beispielsweise den $LT_{\beta}R$ auf intestinalen Epithelzellen, auf Stromazellen oder auf Makrophagen aktivieren, was zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und somit zur Zunahme der Entzündung führen könnte. Möglicherweise sind auch $LT_{\beta}R$ -exprimierende Mastzellen involviert, die nach Colitis-Induktion in der Mucosa in unmittelbarer Nähe von Lymphozyten gefunden wurden (eigene, nicht gezeigte Beobachtung). *In vitro*-Experimente unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Mastzellen nach der Aktivierung des $LT_{\beta}R$ durch mLIGHT oder durch agonistische $LT_{\beta}R$ -Antikörper verstärkt IL-4, IL-6, TNF, MIP-2 und RANTES produzieren (Stopfer, 2004a). Die Produktion dieser Zytokine bzw. Chemokine erfolgte auch, wenn die Mastzellen mit aktivierten, $LT_{\alpha_1\beta_2}$ -exprimierenden T-Lymphozyten kultiviert wurden. Welche $LT_{\beta}R$ -tragende Zelle im Darm kausal beteiligt ist, wird momentan untersucht.

Der Phänotyp der konditionellen $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäuse hinsichtlich der sekundären lymphatischen Organe scheint hier weniger eine Rolle zu spielen. Bei T- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäusen entwickeln sich LN, PP und Milz normal (Tumanov, 2003). B- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäuse besitzen vollständig intakte LN und PP, die Struktur der Milz ist jedoch von Fehlbildungen betroffen. FDC-Netzwerke sind reduziert, die Bildung von Keimzentren und der Marginal-Zone ist in B- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäusen stark eingeschränkt. Nachdem - wie oben erläutert - das Vorhandensein von vollständig ausgebildeten mLN und PP entscheidend ist, wird der Milzstruktur der B- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäuse hier keine entscheidende Bedeutung in der Gegenregulation der intestinalen Entzündung zugeschrieben. Die Rolle der $LT_{\beta}R$ -Aktivierung in der Migration der B-Lymphozyten, deren Produktion von IgA bzw. IgG und die sich dadurch ergebenden Folgen für die Entwicklung der Colitis wird im nächsten Punkt erläutert.

T- $LT_{\beta}^{-/-}$ Mäuse zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach DSS-induzierter Colitis eine erhöhte Entzündung im Dickdarm, daher scheinen LT_{β} -tragende T-Zellen als Suppressorzellen zu fungieren, die der Entzündung entgegen wirken. Regulatorische T-Zellen beispielsweise kontrollieren die Entwicklung einer intestinalen Entzündung über die Produktion von IL-10 und TGF- β (Powrie, 2004). Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der oralen Toleranz. Der Transfer von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen wurde bereits in verschiedenen experimentellen Colitis-Modellen untersucht und führte zu einer signifikanten Reduktion der Entzündung (Coombes, 2005). Interessant wäre somit die Untersuchung von LT_{β} -tragenden T-Lymphozyten auf die Expression von CD4, CD25 und Foxp3.

5.1.3 Die Rolle von LIGHT

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit **LIGHT^{-/-} Mäuse** in DSS-induzierter Colitis untersucht. LIGHT und LT $\alpha_1\beta_2$ sind bis jetzt die einzigen identifizierten Liganden des LT β R. Ganz offensichtlich führt ihre Expression zu völlig gegensätzlichen Wirkungen in der intestinalen Entzündung. Wie oben erläutert, wirkt LT $\alpha_1\beta_2$ einer Entzündung im Darm entgegen, LIGHT jedoch verstärkt diese ganz wesentlich. An den Ergebnissen mit den LIGHT^{-/-} Mäusen wird dieser Befund gezeigt. Nach der Induktion einer akuten DSS-Colitis hatten diese gendefizienten Mäuse fast keine Entzündung im Dickdarm entwickelt. In den untersuchten Parametern Gewichtsverlust, histologischer Score, Anzahl der Lymphfollikel, MPO-Aktivität und Dickdarmlänge war jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen LIGHT-defizienten Mäusen und WT-Kontrollmäusen zu sehen. Die *ex vivo*-Produktion von TNF, IL-6, IFN- γ und MIP-2 der Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten war in den LIGHT^{-/-} Tieren deutlich verringert. Unterstrichen wurden diese Ergebnisse noch mit quantitativer PCR am LightCycler, bei der reduzierte TNF und IL-6 mRNA-Expressionen im Dickdarm-Gewebe der LIGHT^{-/-} Mäuse gefunden wurden. Bei dieser quantitativen PCR ergaben sich jedoch sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen. Dies könnte daran liegen, dass für die RNA-Isolierung ein sehr kleines Dickdarm-Stück (ca. 3 mm lang) verwendet wurde. Auch wenn bei jeder Maus ein distales Ende des Darms für die RNA-Isolierung entnommen wurde, können sich regionale Unterschiede in der Entzündung und somit auch in der Expression der proinflammatorischen Zytokine ergeben.

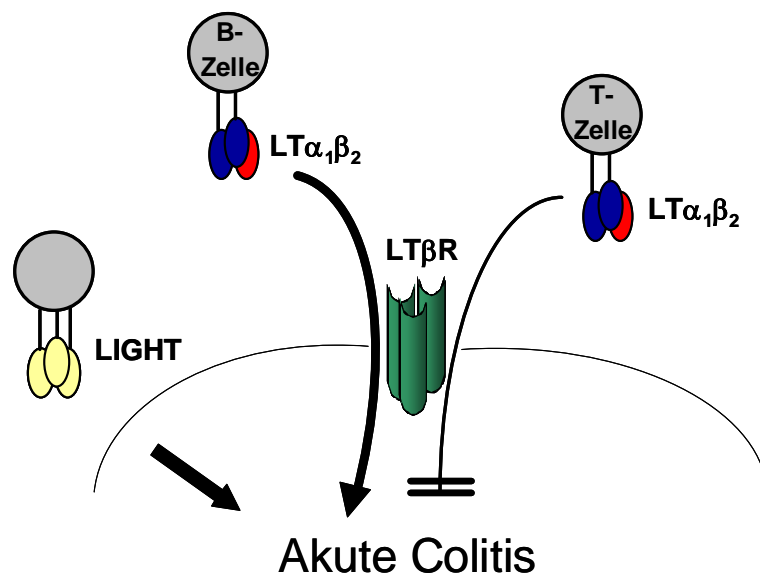


Abbildung 5-1:

Schematische Darstellung der erarbeiteten Ergebnisse in DSS-induzierter akuter Colitis.

LIGHT^{-/-} Mäuse bilden normale sekundäre lymphatische Organe aus (Scheu, 2002). Und dennoch scheint auch LIGHT bei der Entwicklung dieser lymphatischen Organe eine gewisse Rolle zu spielen. Denn LIGHT/LT β -doppeldefiziente Mäuse hatten im Vergleich zu LT β -defizienten Mäusen verminderte mLN. Daher wird vermutet, dass sich LIGHT und LT β in der Entwicklung von mLN gegenseitig ersetzen können. Die IgM- und IgG-Produktion von LIGHT^{-/-} Mäusen nach Infektion mit Vesikulären Stomatitis-Viren war mit den WT-Mäusen vergleichbar und nicht eingeschränkt. *In vitro*-Untersuchungen zeigten eine verminderte Proliferation von CD8⁺ T-Lymphozyten und eine verminderte IL-2 Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten aus LIGHT^{-/-} Mäusen. LIGHT induziert auch *in vitro* die Proliferation von T-Zellen, die Aktivierung von NF κ B und die Produktion von IFN- γ (Tamada, 2000b; Tamada, 2000a). Auf die Rolle von LIGHT in der Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten wird im nächsten Punkt eingegangen. Dies soll aber eine Beteiligung der LIGHT-induzierten Lymphozyten-Aktivierung in der akuten Colitis nicht ausschließen. Denn wie oben bereits erwähnt, sind Lymphozyten und NK-Zellen durchaus an der Manifestation der akuten Colitis mitbeteiligt.

Im folgenden wird die Rolle von LIGHT im angeborenen Immunsystem betrachtet. Vor kurzem wurde gezeigt, dass sowohl LIGHT als auch HVEM auf CD68⁺ Makrophagen im Synovium von RA-Patienten exprimiert werden (Kim, 2005). Als Kontrollgruppe dienten Osteoarthritis-Patienten, bei denen keine LIGHT-Expression im Synovial-Gewebe gefunden wurde. Die Synovial-Makrophagen aus RA-Patienten wurden isoliert und mit rekombinantem hLIGHT stimuliert, worauf sie große Mengen an TNF, IL-6 und IL-8 produzierten. Weiterhin wurde dadurch die Expression von MMP-9 induziert. Die Aktivierung von HVEM auf Makrophagen durch die Bindung von LIGHT wird daher als ganz entscheidend in der Entstehung und im Fortschreiten der RA beschrieben. Dabei scheinen sich Makrophagen autokrin zu aktivieren.

In einer kurz davor erschienenen Publikation führte die Stimulierung der Monozyten-Zelllinie THP-1 mit LIGHT zur schnellen Phosphorylierung von I κ B (innerhalb von 15 min nach Stimulierung) und zur anschließenden NF κ B-Translokation (Kim, 2005). NF κ B gilt als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für MMP-9, denn die spezifische NF κ B-Blockade resultierte in einer vollständigen Aufhebung der MMP-9-Induktion. Dies gibt Hinweis darauf, dass LIGHT direkt zur Aktivierung von NF κ B führt und im Folgenden zur Expression von MMP-9. Ebenso wurde in der Monozyten-Zelllinie THP-1 über LIGHT-Stimulierung die Produktion von MMP-1 und MMP-13 ausgelöst (Lee, 2001).

In der DSS-induzierten Colitis wurde mit zunehmender Entzündung im Darm eine erhöhte Expression von MMP-3, -7, -9, -10 und -13 beobachtet (Sivakumar, 2002). Die orale Verabreichung eines MMP-Inhibitors in der DSS-Colitis reduzierte die intestinale

Entzündung, gemessen an Histologie, Gewichtsverlust, Dickdarmlänge und MPO-Aktivität, signifikant (Naito, 2004).

Nicht nur im Modell der DSS-Colitis, sondern auch bei CED-Patienten spielen MMPs eine große Rolle. Organkulturen der Mucosa-Biopsien von CU- und MC-Patienten produzierten signifikant mehr MMP-3 als die Kontrollgruppe. Diese Überproduktion korrelierte mit dem histologischen Score und der Produktion von TNF, IL-6 und IL-1 β (Louis, 2000). MMPs werden bei CED-Patienten für die Zerstörung der mucosalen Gewebestruktur und für die Entstehung von Läsionen verantwortlich gemacht. Auch die Produktion von MMP-1, -2, -3 und -14 war auf mRNA- und Protein-Ebene im entzündeten Mucosa-Gewebe von CED-Patienten im Vergleich zu nicht-entzündetem Gewebe signifikant erhöht. Durch intrazelluläre Färbungen konnte die Produktion von MMP-1 und MMP-3 den in die Lamina propria eingewanderten Makrophagen zugeordnet werden (von Lampe, 2000).

Eine weitere Untersuchung mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten aus gesunden Probanden zeigt, dass auch diese Zellen in großen Mengen HVEM auf der Oberfläche tragen (Heo, 2006). Nachdem die Expression des LT β R auf diesen Monozyten und Neutrophilen ausgeschlossen wurde, führte die Stimulierung der Zellen mit hLIGHT, also die Stimulierung des HVEM-Rezeptors, zu einem Anstieg der Phagozytose-Aktivität und der Produktion von IL-8, TNF, NO („nitric oxide“) und ROS („reactive oxygen species“).

Somit könnte LIGHT auch im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis die Aktivierung von Makrophagen verstärken. Das über das Trinkwasser verabreichte DSS führt zur Schädigung der Darmepithelschicht, Makrophagen wandern in die Lamina propria ein und produzieren - eventuell über LIGHT stimuliert - proinflammatorische Zytokine, MMPs, NO und ROS. In der Folge nimmt die Schädigung der Mucosa bzw. Submucosa und die Anzahl der infiltrierenden Zellen stark zu. Diese Vorgänge finden in LIGHT $^{-/-}$ Mäusen, die keine intestinale Entzündung entwickeln, möglicherweise nicht statt. Die Aktivierung der Makrophagen, die nach der Literatur LIGHT exprimieren, könnte auch, wie bei RA-Patienten gezeigt, autokrin ablaufen.

Welcher Rezeptor dabei involviert ist, bleibt unklar, denn zwischen **HVEM $^{-/-}$ Mäusen** und der WT-Kontrollgruppe war in DSS-induzierter Colitis kein Unterschied im Gewichtsverlust, im histologischen Score und in der MPO-Aktivität feststellbar.

Wie oben bereits erwähnt, hatten **LT β R $^{-/-}$ Mäuse** nach der Induktion einer akuten DSS-Colitis eine signifikant erhöhte intestinale Entzündung im Vergleich zu den WT-Mäusen (Dissertation P. Stopfer). Nachdem den LT β R zwei Liganden, nämlich LIGHT und LT $\alpha_1\beta_2$ aktivieren können und deren Aktivierung in der DSS-Colitis unterschiedliche Folgen hat, kann der Interaktion zwischen LIGHT und dem LT β R keine eindeutige proinflammatorische Rolle in der akuten Colitis zugeordnet werden. Aus älteren Publikationen geht hervor, dass

der LT β R durchaus auf Maus-Makrophagen exprimiert wird (Force, 1995), daher kann dieser bei der Aktivierung der Makrophagen im Modell der DSS-induzierten Colitis nicht ganz ausgeschlossen werden.

5.2 LT $\alpha\beta$ und LIGHT in chronischer DSS-induzierter Colitis

Die chronische DSS-induzierte Colitis unterscheidet sich histologisch ganz wesentlich von der akuten DSS-Colitis. Das Infiltrat der Lamina propria besteht überwiegend aus T-Lymphozyten und nur aus sehr wenigen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Nach dem Absetzen des DSS kann sich die intestinale Epithelschicht wieder regenerieren. Daher spielen translozierte Bakterien hier kaum mehr eine Rolle, da sie das weitgehend regenerierte Epithel nicht mehr durchdringen können. Die chronische Entzündung wird durch eine permanente Aktivierung der T-Lymphozyten aufrecht gehalten. Dabei scheinen in der Mucosa sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine überexprimiert zu sein (Dieleman, 1998).

Den im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis untersuchten **LT $\alpha\beta$ -/- Mäusen** ging es dabei so schlecht, dass die DSS-Zyklen jeweils verkürzt werden mussten, um ein Sterben der Tiere zu vermeiden. Die histologische Untersuchung der Dickdarm-Schnitte zeigte anschließend nicht das typische Bild einer chronischen Colitis. Der Anteil der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im Infiltrat war noch extrem hoch. Außerdem hatte sich die Epithelschicht nur wenig regenerieren können. 75% der gendefizienten Mäuse bildeten Dysplasien im Colon aus. Während der DSS-freien Zeit war bei den LT $\alpha\beta$ -/- Mäusen stets starker Durchfall zu beobachten. Normalerweise verschwindet der Durchfall nach dem Absetzen des DSS wieder innerhalb von wenigen Tagen. Diese Befunde sprechen dafür, dass die LT $\alpha\beta$ -/- Mäuse keine chronische Entzündung entwickelten, sondern in der akuten Entzündung verblieben sind. Eventuell ist die Aufrechterhaltung der mucosalen Barriere durch das Fehlen der mLN und PP über einen längeren Zeitraum nicht möglich. Somit kann sich auch keine orale Toleranz entwickeln. Die akute Entzündung während der DSS-Verabreichung ist so stark ausgeprägt, dass die DSS-freien Intervalle für die Regeneration nicht mehr ausreichend sind.

Die LT β R-Ig-Behandlung von BALB/c-Mäusen führte im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis zu einer signifikanten Reduktion der intestinalen Entzündung (Stopfer, 2004b). Dieser Effekt war vergleichbar mit der parallel durchgeführten anti-TNF-Behandlung. Immunhistochemische Färbungen zeigten eine stark verminderte MAdCAM-1-Expression in der Mucosa der LT β R-Ig-behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontroll-Ig-behandelten Gruppe. Mit *in vivo*-Fluoreszenzmikroskopie wurde ein durch reduzierte MAdCAM-1-Expression signifikant geringeres Rollen und Anhaften von Lymphozyten am intestinalen

Endothel gesehen. Dies führte in der LT β R-Ig-behandelten Gruppe zu verminderter Extravasation von Lymphozyten in die entzündete Mucosa. Auch im Modell der TNBS-Colitis führte die Behandlung von „Sprague-Dawley“-Ratten mit LT β R-Ig zu einer signifikanten Reduktion der Entzündung (An, 2005). Weiterhin bewirkte die LT β R-Ig-Behandlung im Modell mit CD4⁺CD45RB^{high} Lymphozyten, die in SCID-Mäuse transferiert wurden, eine signifikante Verbesserung der klinischen und histologischen Parameter (Mackay, 1998). Das gleiche Ergebnis wurde nach Transfer von Knochenmark in T- und NK-Zell-defiziente tg ϵ 26-Mäuse gesehen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte durch die Untersuchung von LT $\alpha\beta$ - und LIGHT-defizienten Mäusen nun erstmals geklärt werden, welcher Ligand des LT β R für die intestinale Entzündung verantwortlich ist. Das in verschiedenen experimentellen Modellen verwendete LT β R-Ig neutralisiert sowohl die Wirkungen von LT $\alpha\beta$ als auch die Wirkungen von LIGHT. Der oben beschriebene protektive Effekt der LT β R-Ig-Behandlung in chronischen Colitis-Modellen ist auf die Neutralisierung des Liganden LIGHT zurückzuführen. Das geht aus den Ergebnissen mit **LIGHT-defizienten Mäusen** in der chronischen DSS-Colitis hervor. Selbst nach Verabreichung von vier 0,75%igen DSS-Zyklen wiesen LIGHT^{-/-} Mäuse so gut wie keine intestinale Entzündung auf. Ihr histologischer Score war kleiner als 1. Außerdem zeigten LIGHT-defiziente Mäuse eine signifikant verringerte Anzahl an tertiären Lymphfollikeln und einen signifikant längeren Dickdarm. Mit zunehmender Entzündung im Darm nehmen Ödeme zu, was zu einer Verkürzung des Darms führt. Somit ist auch die Dickdarmlänge ein weiterer Parameter für den Schweregrad der intestinalen Entzündung. Die Untersuchung der Zytokinsekretion mesenterialer Lymphozyten ergab deutlich verringerte Konzentrationen an TNF, IL-6, IFN- γ und RANTES in den Überständen der mLN aus LIGHT^{-/-} Mäusen.

5.2.1 Adenom- und Karzinombildung in DSS-induzierter Colitis

Gesteigerte DSS-Dosen führten in der WT-Kontrollgruppe zu Karzinomen und Adenomen. Die Ausbildung der Karzinome bzw. Adenome erfolgte in einem erstaunlich kurzen Zeitraum von nur 2,5 Monaten. Bisher existieren in der Literatur sehr unterschiedliche Daten zur Entwicklung von Dysplasien, Adenomen und Karzinomen nach DSS-induzierter Colitis. Es wurden – je nach Molekulargewicht – Unterschiede in der Karzinogenität des DSS festgestellt. DSS mit einem Molekulargewicht von 54.000 zeigte bei einer oralen Gabe von 2,5% eine sehr starke Karzinogenität, wohingegen DSS mit einem Molekulargewicht von 520.000 oder 9.500 nicht karzinogen war (Hirono, 1983). 25% der „Wistar“ Ratten, denen oral 2% DSS verabreicht wurde, entwickelten nach 3 Monaten Dysplasien bzw. Dysplasien mit Karzinombildung, nach 6 Monaten waren dies 90% der Tiere (Tamaru, 1993). Bei einer

anderen Veröffentlichung mit „ACI“ Ratten wurde 5% bzw. 10% DSS verabreicht (Hirono, 1981). Ratten, die 10% DSS bekamen, starben alle innerhalb von 2 Wochen. 15 der 23 Ratten, die 5% DSS verabreicht bekamen, entwickelten im Zeitraum von 134 bis 215 Tagen Adenome, Karzinome und Papillome. Eine experimentelle Untersuchung an Hamstern zeigt, dass 3 von 5 Hamstern nach 1%iger Gabe von DSS über 100 Tage Dysplasien entwickelten, dies konnte durch die Behandlung mit Metronidazol verhindert werden (Yamada, 1992). Nach 180 Tagen hatten sich in 7 von 8 Hamstern intestinale Dysplasien gebildet, ein Tier hatte Adenome und 4 von 8 Tieren hatten Karzinome.

Zum Auftreten von Neoplasien in Mäusen nach DSS-induzierter Colitis existieren nur wenig Publikationen. Auch fehlt eine systematische Untersuchung der Dysplasien bzw. Adenome, die sehr unterschiedlich ausgewertet werden („high-grade“ und „low-grade“ oder „dysplastic lesions“). Es gibt hier keine internationalen, standardisierten Klassifizierungen (Kullmann, 2001).

Die Tumorzinzidenz lag bei C57BL/6-Mäusen nach 15 DSS-Zyklen (1 Zyklus: 7 Tage DSS, 10 Tage Wasser) mit 0,7% DSS bei 19% (Seril, 2002). 20 BALB/c-Mäuse hatten nach einem 5%igen DSS-Zyklus und nach zwei 3%igen DSS-Zyklen 30 Dysplasien und ein Adenom entwickelt (Egger, 2001). Bei „Swiss Webster“-Mäusen wurden verschiedene 5%ige DSS-Zyklen untersucht: 4 Zyklen DSS (1 Zyklus: 7 Tage DSS, 14 Tage Wasser) (Gruppe A), 4 Zyklen DSS und am Ende 120 Tage Wasser (Gruppe B), 7 Tage DSS und 180 Tage Wasser (Gruppe C) bzw. 7 Tage DSS und 90 Tage Wasser (Gruppe D). Die Inzidenz für Dysplasien und/ oder Tumore war bei 15,8%, 37,5%, 18,1% und 0% in den Gruppen A bis D (Cooper, 2000).

Diese Daten zeigen, dass das Auftreten von Neoplasien nach DSS-induzierter Colitis sehr stark abhängig ist von der Tierspezies und vom Mausstamm, vom verwendeten DSS und von Länge und Art der DSS-Zyklen. Einheitliche Daten fehlen bisher in der Literatur.

5.2.2 Aktivierung des LT β R und HVEM durch LIGHT

Auch die Frage, welche Rezeptoren bei der durch die Expression von LIGHT verursachten intestinalen Entzündung involviert sind, konnte eindeutig geklärt werden. **HVEM-defiziente Mäuse** zeigten nach der Induktion einer chronischen DSS-Colitis, gemessen an den Parametern histologischer Score, Lymphfollikel-Anzahl, Dickdarmlänge und Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphozyten, eine signifikant verringerte Entzündung des Dickdarms im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben auch in LT β R-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion der intestinalen Entzündung in chronischer DSS-Colitis (Manuskript eingereicht). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass LIGHT sowohl über die Bindung an HVEM als auch über die

Bindung an den $LT\beta R$ die Entzündung im Modell der chronischen DSS-Colitis massiv verstärkt.

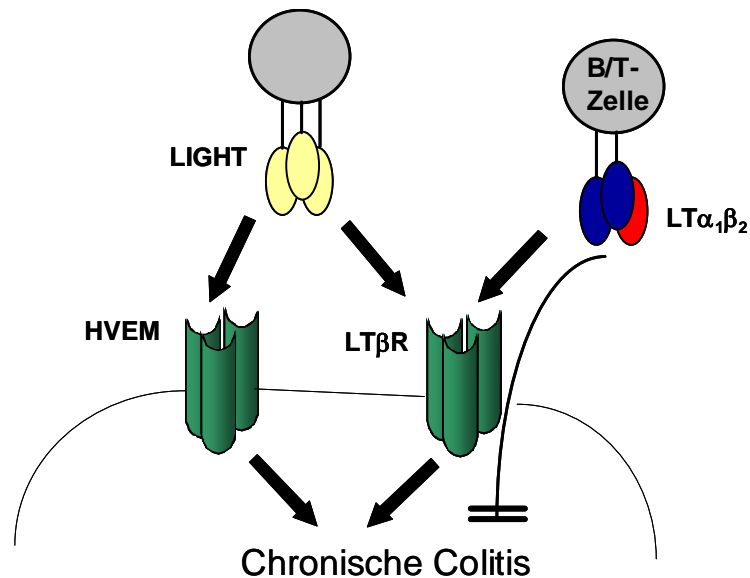


Abbildung 5-2:

Schematische Darstellung der erarbeiteten Ergebnisse in DSS-induzierter chronischer Colitis.

Diese Folgerung stimmt mit einer Publikation überein, die nach Abschluss der Colitis-Experimente der vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde. Darin wird ein neues adoptives Transfer-Modell beschrieben, bei dem LIGHT-transgene (tg) Lymphozyten in RAG-defiziente Mäuse transferiert wurden (Wang, 2005a). Die Empfänger-Mäuse entwickelten innerhalb von 4-5 Wochen eine zunehmende intestinale Entzündung, die hinsichtlich Histologie und Zytokinproduktion (Th1) dem MC sehr ähnlich war. Auch bei diesem Modell wurde die Aktivierung beider Rezeptoren des Liganden LIGHT, HVEM und $LT\beta R$, für die Entwicklung der intestinalen Entzündung verantwortlich gemacht, denn diese blieb aus, wenn LIGHT-tg Lymphozyten in $LT\beta R$ -defiziente Mäuse transferiert wurden bzw. wenn HVEM-defiziente, LIGHT-tg Lymphozyten in RAG-/- Mäuse transferiert wurden. HVEM-defiziente, LIGHT-tg Lymphozyten wurden durch Kreuzung von HVEM-defizienten mit LIGHT-tg Mäusen generiert.

In der Literatur sind zwei verschiedene Linien an LIGHT-tg Mäusen beschrieben. Beide Linien exprimieren LIGHT unter der Kontrolle eines T-Zell-spezifischen Promotors, daher wird LIGHT in diesen Mäusen nur auf T-Lymphozyten exprimiert. Bei einer Linie wurde ein Ick-Promotor verwendet (Wang, 2001), bei der zweiten Linie ein CD2-Promotor (Shaikh, 2001). Die Mäuse beider LIGHT-tg Linien entwickeln nach etwa 4 Monaten spontan schwere Autoimmunerkrankungen, vor allem intestinale Entzündungen, Lymphadenopathie und IgA-Nephropathie. Die Anzahl der B-Lymphozyten in der Lamina propria und Serum-IgA-Spiegel sind in LIGHT-tg Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht und epitheliale T-Lymphozyten produzieren vermehrt $IFN-\gamma$. Milz und LN sind in LIGHT-tg Mäusen stark

vergrößert. Alle diese Beobachtungen werden auf das Vorhandensein von autoreaktiven T-Lymphozyten zurückgeführt, die sich über die Interaktion von LIGHT mit HVEM autokrin stimulieren.

Auch MAdCAM-1 ist im Darm der LIGHT-tg Mäuse überexprimiert, genauso wie $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf deren Lymphozyten (Wang, 2005b). Ebenso konnte durch Stimulierung mit rLIGHT *in vitro* die verstärkte Expression von MAdCAM-1 ausgelöst werden. Eine weitere Veröffentlichung zeigt die LIGHT-induzierte Expression von ICAM-1 auf einer Tumor-Zelllinie (Zhang, 2003). Neutralisierung von MAdCAM-1 durch spezifische Antikörper konnte die chronische Entzündung im Modell der DSS-induzierten Colitis effektiv bekämpfen und die Extravasation von Lymphozyten in die Mucosa reduzieren (Farkas, 2006).

Drei kürzlich erschienene Veröffentlichungen untersuchen die Rolle von hLIGHT im menschlichen Gastrointestinaltrakt. LIGHT-Expression konnte durch Stimulierung von Lamina propria-T-Zellen innerhalb von 2 - 6 h induziert werden (Cohavy, 2004), wobei Lamina propria-T-Zellen aus dem Dünndarm oder Rektum von CED-Patienten nach Stimulierung signifikant höhere LIGHT-Spiegel aufwiesen als T-Zellen aus LN oder Blut dieser Patienten. Die Stimulierung von HVEM auf den Lamina propria-T-Zellen führte zur IFN- γ -Produktion dieser Zellen, die durch LIGHT-neutralisierende Antikörper wieder aufgehoben werden konnte. Somit ist LIGHT speziell im Darm verantwortlich für die Expression von MAdCAM-1 und die Produktion von IFN- γ .

Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt in einer darauffolgenden Veröffentlichung erstmals, dass LIGHT konstitutiv auf T- und NK-Zellen der humanen Mucosa exprimiert wird (Cohavy, 2005). Dabei wird eine neue nicht-enzymatische Methode der T-Zell-Isolierung aus der Lamina propria beschrieben, die die anschließende Untersuchung nativer Oberflächenproteine möglich macht. Weiterhin konnten die so isolierten T-Lymphozyten über anti-CD2 Antigen-unabhängig zur vermehrten LIGHT-Expression angeregt werden. Diese LIGHT-Induktion über CD2 war in T-Lymphozyten aus dem Blut nicht zu beobachten, daher scheint dieser Vorgang Darm-spezifisch zu sein. Die in dieser Publikation getroffenen Aussagen basieren allerdings auf Histogrammen aus durchflusszytometrischen Untersuchungen mit extrem kleinen Signalverschiebungen (Cohavy, 2005). So sind die im Text genannten Ergebnisse oft nur sehr schwer mit den Abbildungen in Einklang zu bringen. Auf diese Problematik wird im nächsten Punkt noch weiter eingegangen.

LIGHT mRNA-Untersuchungen mit Darmbiopsien von CED-Patienten ergaben signifikant höhere LIGHT mRNA-Level in entzündeten Abschnitten im Vergleich zu nicht-entzündeten Abschnitten und im Dünndarm im Vergleich zum Dickdarm (Cohavy, 2005). In der bereits zitierten Veröffentlichung von Wang et al. sind ebenfalls erhöhte LIGHT-Expressionen in der Mucosa von MC-Patienten (aktiv) und von CU-Patienten (aktiv und nicht-aktiv) gezeigt (Wang, 2005a).

Zusammenfassend induziert LIGHT also erstens die Produktion von Adhäsionsmolekülen, wie MAdCAM-1, was zu einem vermehrten Anhaften und Extravasieren von Lymphozyten in die entzündete Mucosa des Dickdarms führt. Dieser Effekt wird wohl in erster Linie über den LT β R ausgelöst, der auf dem Gefäßendothel exprimiert wird und dessen Aktivierung zur Produktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen führt. Zweitens hat die Bindung von LIGHT an den HVEM-Rezeptor zur Folge, dass T-Lymphozyten stimuliert werden und klonal expandieren. Die Aktivierung von HVEM führt weiterhin zur Produktion proinflammatorischer Zytokine über NF κ B-Aktivierung (Marsters, 1997). Da sowohl LIGHT als auch HVEM auf T-Lymphozyten exprimiert werden, kann diese Aktivierung der T-Lymphozyten autokrin oder aber auch parakrin erfolgen, denn LIGHT kann auch als löslicher Ligand detektiert werden (Wang, 2001). Als Folge werden im Darm autoreaktive T-Lymphozyten vermehrt, die wiederum über die Produktion proinflammatorischer Zytokine die Entzündung verstärken. In LIGHT-/- Mäusen bleiben diese Effekte aus, was die fehlende intestinale Entzündung im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis erklärt.

Im Folgenden werden die kürzlich veröffentlichten Daten zu HVEM näher betrachtet, die den soeben geschilderten Ablauf der Entzündungsereignisse erweitern und noch komplexer machen. Wie Untersuchungen an HVEM-defizienten Mäusen zeigten, ist HVEM nicht nur an der oben beschriebenen T-Zell-Stimulierung beteiligt. HVEM spielt auch in der Gegenregulation der T-Zell-Antwort eine Rolle. Denn T-Zellen aus HVEM-defizienten Mäusen proliferierten nach Concanavalin A (ConA)-Stimulierung *in vitro* signifikant stärker und produzierten mehr Zytokine als WT-Lymphozyten (Wang, 2005c). Auch *in vivo* zeigten HVEM-defiziente Mäuse erhöhte Mortalität im Modell der ConA-vermittelten Lebertoxizität und erhöhte Empfindlichkeit im EAE-Modell mit gesteigerter T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe. In diesen Modellen scheint die Aktivierung von HVEM auf T-Lymphozyten die T-Zell-Antwort zu bremsen und ein Überschiessen zu verhindern.

Die Erklärung hierfür findet sich in zwei weiteren Veröffentlichungen, die parallel zur zuletzt zitierten erschienen sind. HVEM wird darin als Ligand von BTLA („B and T lymphocyte attenuator“) beschrieben (Gonzalez, 2005; Sedy, 2005). BTLA ist ein Lymphozyten-spezifischer Rezeptor, dessen Aktivierung die B- und T-Lymphozyten-Antwort inhibiert. Somit kann HVEM auch einen negativen „Feedback-Mechanismus“ für die Regulation der T-Zell-Antwort initiieren - im Gegensatz zu der oben beschriebenen, mehrfach belegten Rolle in der durch LIGHT ausgelösten Kostimulation der T-Zellen -, je nachdem, ob HVEM als Rezeptor oder als Ligand fungiert. Darüber hinaus wird neben LT α_3 ein möglicher weiterer Ligand des HVEM-Rezeptors vermutet.

5.2.3 Aktivierung des LT β R durch LT $\alpha\beta$ -exprimierende Lymphozyten

Bei den **konditionellen LT β -defizienten Mäusen** ergab sich im Modell der chronischen DSS-induzierten Colitis das gleiche Bild wie im Modell der akuten Colitis. Den B-LT β ^{-/-}-Mäusen ging es nach den Parametern histologischer Score, Lymphfollikel-Anzahl und Dickdarmlänge signifikant besser als den T-LT β ^{-/-} Mäusen. Die Kontrollgruppe lag jeweils zwischen den beiden gendefizienten Linien. Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten der T-LT β ^{-/-} Mäuse produzierten innerhalb von 24 h deutlich höhere Spiegel an TNF, IL-6, IFN- γ und RANTES als die Lymphozyten der B-LT β ^{-/-} Mäuse und der Kontrollen. Die Produktion dieser Zytokine/ Chemokine war in der B-LT β ^{-/-} Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erheblich verringert.

Dieser Effekt ist durch die IgA- und IgG-Produktion der B-Lymphozyten erklärbar. Zunächst soll die Rolle der LT β R-Aktivierung in der intestinalen IgA-Produktion näher erläutert werden. Untersuchungen an gendefizienten Mäusen ergaben, dass LT α - und LT β R-defiziente Mäuse extrem niedrige, kaum nachweisbare Serum-IgA-Spiegel haben. Das Fehlen von LN und PP in diesen Mäusen wurde lange Zeit als Erklärung hierfür angenommen. Doch die Rekonstitution von LT α ^{-/-} Mäusen mit WT-Knochenmark führte zu einer Normalisierung der IgA-Spiegel, obwohl LN und PP in den Empfänger-Mäusen weiterhin fehlten (Kang, 2002). Auch die Transplantation eines kleinen Darmabschnittes aus RAG-defizienten Mäusen in LT α -defiziente Mäuse führte nach 8 Wochen zu einem deutlichen Anstieg des Serum-IgA- und des fäkalen IgA-Spiegels. Daraus wurde abgeleitet, dass die Aktivierung des LT β R über LT $\alpha_1\beta_2$ für eine normale IgA-Produktion ausreichend ist. Die vollständige Anwesenheit der GALT-Strukturen ist also hierfür nicht essentiell.

Das Chemokin CXCL13 und dessen Rezeptor CXCR5 spielen eine wichtige Rolle in der B-Zell-Migration. Ebenso das Adhäsionsmolekül MAdCAM-1 speziell im Darm. LT α ^{-/-} Mäuse besitzen sehr niedrige intestinale mRNA-Spiegel an CXCL13, CCL21 und MAdCAM-1. Auch die Anzahl der in die Lamina propria eingewanderten B-Lymphozyten ist in LT α ^{-/-} Mäusen sehr stark reduziert. Der Defekt in der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen im Darm von LT α ^{-/-} Mäusen wird somit für die fehlende Rekrutierung von B-Lymphozyten in die Lamina propria und für die Defekte in der IgA-Produktion dieser Mäuse verantwortlich gemacht (Kang, 2002). Die Aktivierung des LT β R auf Stromazellen des Darms durch LT $\alpha_1\beta_2$ auf B-Lymphozyten ist also für die Einwanderung von B-Lymphozyten in die Lamina propria und für deren Produktion von IgA absolut notwendig.

Auch die IgA-Produktion korreliert mit der Entwicklung und dem Fortschreiten einer intestinalen Entzündung. Wie oben bereits erwähnt, ist die Anzahl der B-Lymphozyten in der Lamina propria und Serum-IgA-Spiegel in LIGHT-tg Mäusen, die nach 4 Monaten spontan eine Colitis entwickeln, bereits in jungen Mäusen (7 Wochen alt) signifikant erhöht. Somit

entwickelt sich die Colitis in den LIGHT-tg Mäusen erst nach dem Auftreten der erhöhten Serum-IgA-Spiegel (Wang, 2005b). Außerdem wurde bei CED-Patienten ein verstärktes Infiltrat aus IgA- bzw. IgG-produzierenden B-Zellen in der Lamina propria und erhöhte Serum-IgA-Spiegel festgestellt (Wang, 2004).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten B-LT β ^{-/-} Mäusen fehlt die Interaktion von LT $\alpha_1\beta_2$ auf B-Lymphozyten mit dem LT β R auf Stromazellen des Darms. Somit ist die Migration dieser B-Lymphozyten in die Lamina propria blockiert und die IgA-Spiegel deshalb verringert, was den Schutz der B-LT β ^{-/-} Mäuse in der DSS-induzierten chronischen Colitis erklären könnte.

Auch eine indirekte Verstärkung der intestinalen Entzündung über das von B-Lymphozyten produzierte IgG ist denkbar. B-LT β ^{-/-} Mäuse weisen einen Defekt in der IgG-Produktion auf, ihr IgG-Titer ist nach Immunisierung im Vergleich zu T-LT β ^{-/-} Mäusen oder WT-Kontrollen deutlich reduziert (Tumanov, 2003). Eine Publikation beschreibt die Aktivierung von Makrophagen durch IgG. IgG-Aggregate und der Fc-Teil des IgGs aktivieren Makrophagen und deren Produktion von IL-6 (Ling, 1990). Auch *in vitro*-Tests mit T-Lymphozyten (aus Mäusen mit DSS-induzierter akuter Colitis) und DSS-beladenen Makrophagen zeigten einen signifikanten Anstieg der T-Zell-Proliferation, wenn die Makrophagen mit Maus-IgG vorinkubiert wurden (Shintani, 1998). Makrophagen werden also *in vitro* durch IgG aktiviert, was zu einer verstärkten T-Zell-Proliferation führt. Inwiefern die Beobachtung *in vivo* relevant ist, ist noch unklar. Diese Aktivierung von Makrophagen und anschließend verstärkte T-Zell-Proliferation könnte durch den Defekt in der IgG-Produktion in B-LT β ^{-/-} Mäusen ausbleiben. Die leicht erhöhte intestinale Entzündung der T-LT β ^{-/-} Mäuse ist auch hier, wie in Punkt 5.1 erläutert, durch eine mögliche fehlende Suppressorfunktion der LT β -tragenden T-Zellen zu erklären.

5.3 Monoklonale anti-LIGHT-Antikörper

Die oben diskutierten Ergebnisse der LIGHT^{-/-} Mäuse in akuter und chronischer DSS-induzierter Colitis beschreiben die herausragende Rolle von LIGHT in der Entwicklung und Manifestation einer intestinalen Entzündung. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob LIGHT auch in der Abwehr von bakteriellen Infektionen beteiligt ist.

Im in dieser Arbeit gezeigten Modell einer zu 50% letalen CLP war kein signifikanter Unterschied in der Mortalität zwischen LIGHT^{-/-} Mäusen und WT-Kontrollmäusen festzustellen. Die LIGHT^{-/-} Mäuse hatten somit keine Nachteile in der durch austretenden Darminhalt verursachten bakteriellen Infektion im Vergleich zu WT-Mäusen. LIGHT-defiziente Mäuse sind in der Literatur bisher kaum in Infektionsmodellen beschrieben, im Gegensatz zu den sehr umfassend untersuchten LT α ⁻, LT β ⁻ und LT β R-defizienten Mäusen.

Bisher ist publiziert, dass in der Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (Ehlers, 2003), sowie mit Vesikulären Stomatitis-Viren (Scheu, 2002) kein Unterschied zwischen LIGHT-defizienten Mäusen und WT-Kontrollen war. Weiterhin wurden die LIGHT^{-/-} Mäuse im Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* (Pfeffer K., nicht veröffentlicht) untersucht, wo ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden konnte. Somit gibt es bisher keine Hinweise für die absolute Notwendigkeit einer LIGHT-Expression für eine erfolgreiche Abwehr von Viren oder Bakterien.

LIGHT ist also nach bisherigen Erkenntnissen eine perfekte Zielstruktur für die Neutralisierung durch Antikörper zur Therapie der Colitis, da LIGHT erstens verantwortlich ist für die Entwicklung einer intestinalen Entzündung in DSS-induzierter Colitis und zweitens in der Abwehr von Infektionen nicht involviert zu sein scheint. Wie in der Einleitung erläutert, ist das Hauptproblem bei einer anti-TNF-Therapie das Auftreten von bakteriellen Infektionen und Pilzkrankungen, da TNF an einer großen Vielfalt immunologischer Vorgänge beteiligt ist. Die bereits in Punkt 5.2 erläuterten, kürzlich erschienenen Publikationen zu hLIGHT unterstreichen die besondere Rolle von LIGHT im Gastrointestinaltrakt. Bisher wurde nur dort eine konstitutive Expression von LIGHT auf T- und NK-Zellen in der humanen Mucosa beschrieben (Cohavy, 2005). Die Expression von LIGHT wird sonst nur auf aktivierten Zellen beschrieben. Auch konnte LIGHT durch Stimulierung viel schneller und in größeren Mengen auf Lamina propria-T-Zellen als auf T-Zellen aus LN oder Blut induziert werden (Cohavy, 2004). Vor allem durch die Stimulierung der MAdCAM-1-Expression, der Produktion von IFN- γ und der Kostimulation von T-Lymphozyten trägt LIGHT wesentlich zur immunologischen Dysregulation in der intestinalen Mucosa bei CED bei.

Nach den Ergebnissen mit LIGHT^{-/-} Mäusen in akuter und chronischer DSS-induzierter Colitis wurden in der vorliegenden Arbeit monoklonale Antikörper gegen mLIGHT hergestellt und charakterisiert. Da ein späterer Einsatz im DSS-Modell geplant war, wurden mit Hilfe der Immunisierung von LIGHT^{-/-} Mäusen „Maus anti-Maus“ Antikörper hergestellt. Das Risiko einer Komplementaktivierung aufgrund von Speziesunterschieden und Xeno-Antikörperproduktion wird somit umgangen. Nach der Durchführung von 2 Fusionen wurden 5 klonierte, stabil anti-mLIGHT-Antikörper produzierende Hybridome etabliert. Alle fünf Protein-G-gereinigten Antikörper - 1A9, 4B1, 5G8, 9D10 und 15B2 - sind zur Detektion von mLIGHT im ELISA und im Dot Blot geeignet. Für einen Einsatz im Western Blot sind 4B1, 9D10 und 15B2 geeignet, wobei 15B2 hier mit hLIGHT kreuzreagiert.

Bei der Detektion von endogenem mLIGHT mittels Durchflusszytometrie ergaben sich einige Probleme. Zunächst mussten Zellen gefunden werden, die LIGHT in ausreichender Menge auf ihrer Oberfläche exprimieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass LIGHT in erster Linie auf aktivierten T-Lymphozyten, unreifen Dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden ist (Kim, 2005; Mauri, 1998; Tamada, 2000a). Bisher wurden durchflusszytometrische

Untersuchungen nur mit humanen Zellen auf die Expression von hLIGHT durchgeführt. Humane CD8⁺ T-Zellen beispielsweise zeigten nach der Stimulierung mit PMA und Ionomycin oder anti-CD2 bzw. anti-CD2/ anti-CD28-Antikörpern eine Oberflächenexpression von hLIGHT (Cohavy, 2005). Bei einer speziellen Kinetik wurde nach PMA/ Ionomycin-Stimulierung ein Maximum der LIGHT-Expression nach Stimulierungszeiten von 2 bis 6 h beschrieben. Nach der Stimulierung zeigten T-Lymphozyten aus der Lamina propria bzw. aus LN größere LIGHT-Expressionen als aus Blut isolierten T-Lymphozyten. Die in dieser Veröffentlichung präsentierten Histogramme der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen aber nur extrem kleine Signalverschiebungen, so dass keine Aussage über den Anteil (in %) der tatsächlich hLIGHT-positiven Zellen gemacht werden kann. Die im Text getroffenen Aussagen sind oft nur schwer mit den Histogrammen in Einklang zu bringen.

Generell ist es daher nicht ganz einfach, Zellen so zu stimulieren, dass sie detektierbare Mengen an LIGHT auf der Oberfläche tragen. In Anlehnung an Cohavy et al. wurde zur Untersuchung der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper die CD8⁺ Tumor-T-Zelllinie PMMI gewählt und für 4 h mit PMA und Ionomycin stimuliert. RT-PCR-Untersuchungen zeigten eine deutliche mLIGHT-Expression in den stimulierten PMMI, wohingegen die unstimulierten PMMI kein LIGHT exprimierten. Daraus lässt sich aber nicht ableiten, wieviel LIGHT-Protein tatsächlich auf der Oberfläche der stimulierten PMMI vorhanden war, denn eine Publikation beschreibt bei einer humanen T-Zelllinie (IL-23) eine intrazelluläre Isoform (im Cytosol) von hLIGHT und bei einer humanen Nierenzelllinie (293T) abgespaltenes hLIGHT im Zellkulturüberstand (Granger, 2001). Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung waren 6,7% der stimulierten PMMI 5G8-positiv, die übrigen 4 monoklonalen Antikörper hatten nicht gebunden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass für die anderen Antikörper einfach nicht ausreichend Protein zur Bindung zur Verfügung stand.

Auch mit per MACS angereicherten CD8⁺ T-Lymphozyten aus Maus-Milzen konnte nach PMA/ Ionomycin bzw. nach anti-CD3/ anti-CD28-Stimulierung kein mLIGHT auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden. Zur Detektion wurde dabei LTβR-Fusionsprotein verwendet, das nicht an CD8⁺ T-Lymphozyten aus LTαβ^{-/-} Mäusen gebunden hatte. Eine Bindung des LTβR-Ig an die LTαβ^{-/-} Milzzellen hätte hier nur über LIGHT stattfinden können. Dies zeigt einmal mehr die Schwierigkeit, LIGHT-exprimierende Zellen zur durchflusszytometrischen Untersuchung zu generieren. Möglich wäre hier noch der Versuch anderer Stimuli, beispielsweise Concanavalin A, oder statt nativer Zellen transfizierte Zellen zu verwenden.

In vitro konnten drei der monoklonalen Antikörper mLIGHT neutralisieren, und so die Aktivierung des LTβR und den anschließenden Anstieg der IL-6 Produktion von L929-Zellen verhindern.

Das ursprüngliche Ziel der Herstellung der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper war deren Verwendung in der DSS-Colitis. Im *in vivo*-Test konnten 9D10 und 15B2 die intestinale Entzündung nach DSS-induzierter akuter Colitis effektiv bekämpfen und abschwächen. Somit wäre LIGHT durchaus - auch unter Betrachtung der bisherigen humanen Daten - eine mögliche Zielstruktur für eine Neutralisierung durch Antikörper zur Therapie von CED.

ELISA-Untersuchungen ergaben signifikant erhöhte Serum-Konzentrationen an hLIGHT in CU- und MC-Patienten im Vergleich zu „Darm-gesunden“ Probanden. Es wurde jeweils Serum von Patienten mit akutem Schub bzw. mit chronischer Entzündung untersucht. In allen vier Patienten-Gruppen waren die hLIGHT-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, wobei kein Unterschied zwischen CU- und MC-Patienten bzw. zwischen Patienten mit akutem Schub und mit chronischer Entzündung war. Somit wurde erstmals auf Proteinebene gezeigt, dass CED-Patienten signifikant erhöhte LIGHT-Spiegel im Serum aufweisen. Dies könnte in Zukunft eventuell für die Diagnostik interessant sein. Eine Unterscheidung von CU- und MC-Patienten wäre zwar nicht durchführbar, aber möglicherweise könnten diese Erkrankungen von anderen Darmerkrankungen abgegrenzt werden. Allerdings haben erste Untersuchungen gezeigt, dass auch Patienten mit einer unspezifischen Colitis erhöhte hLIGHT-Serumspiegel aufweisen. Daher bleibt abzuwarten, ob weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv näheren Aufschluss geben.

Kürzlich wurde eine Publikation veröffentlicht, die signifikant erhöhte LIGHT-Serumspiegel in RA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden zeigt (Edwards, 2006). Dies bestätigt die bereits in Punkt 5.1 erläuterte Rolle von LIGHT in der Entwicklung und im Voranschreiten der RA. Interessant wäre auch hier die Anwendung der monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper im Maus-Modell der „Kollagen-induzierten Arthritis“.

Auch die Menge an löslichem HVEM-Rezeptor war im Serum von RA-Patienten, sowie in Patienten mit allergischem Asthma bzw. atopischer Dermatitis erhöht (Jung, 2003).

Die Entwicklung eines ELISAs zur Detektion von mLIGHT mit zwei der fünf monoklonalen anti-mLIGHT-Antikörper war nicht möglich. Vergleichende Epitopbestimmungen mittels ELISA machten deutlich, dass sich die Antikörper gegenseitig verdrängen und um das gleiche Epitop konkurrieren. Somit ist ein gemeinsamer Einsatz im ELISA nicht möglich. Mit einem ELISA wie diesem könnte beispielsweise das Serum von Mäusen mit DSS-Colitis auf das Vorkommen von mLIGHT untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Im Modell der DSS-induzierten Colitis konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression der beiden Liganden des LT β R (LT $\alpha_1\beta_2$ und LIGHT) völlig unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung und Manifestation einer intestinalen Entzündung hat. Eine Aktivierung des LT β R durch LT $\alpha_1\beta_2$ scheint essentiell, um eine intestinale Entzündung zu hemmen. Den untersuchten LT $\alpha\beta$ -defizienten Mäusen ging es in beiden DSS-Modellen - akut und chronisch - signifikant schlechter als der WT-Kontrollgruppe. Die akute Entzündungsreaktion war so stark, dass sich in diesem Modell keine Chronifizierung darstellen ließ. Dagegen verstärkte LIGHT die Entzündungsreaktion im Dickdarm ganz wesentlich.

LIGHT-defiziente Mäuse entwickelten in akuter und chronischer DSS-induzierter Colitis so gut wie keine intestinale Entzündung. Die Schwere der Entzündung wurde jeweils anhand von verschiedenen Entzündungsparametern des Dickdarms wie Histologie mit histologischem Score, Anzahl der Lymphfollikel, Gewichtsverlust, Dickdarmlänge, MPO-Aktivität und *ex vivo*-Zytokinsekretion von Milzzellen bzw. Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten festgestellt.

Durch die Untersuchung von konditionellen LT β -defizienten Mäusen wurde deutlich, dass auch LT β -exprimierende B-Lymphozyten die Entzündungsreaktion verstärken. Dementsprechend Mäuse, die kein LT β und somit kein LT $\alpha_1\beta_2$ auf B-Lymphozyten exprimieren, waren vor intestinaler Entzündung in akuter und chronischer DSS-induzierter Colitis geschützt. LT β -tragende T-Lymphozyten scheinen allerdings als potente Suppressorzellen zu fungieren, die der Entzündung entgegen wirken. T-LT β -defiziente Mäuse zeigten im DSS-Colitis-Modell im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkte Entzündung.

In akuter DSS-induzierter Colitis bleibt die Frage, welche Rezeptoren bei der Manifestation der Entzündung involviert sind, offen. In diesem Modell war kein Unterschied zwischen HVEM-defizienten Mäusen und WT-Kontrollmäusen feststellbar. Hingegen konnte in chronischer Colitis die Frage der verantwortlichen Rezeptoren eindeutig geklärt werden. HVEM-defiziente Mäuse hatten eine signifikant verminderte chronische Entzündung im Dickdarm. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben auch in LT β R-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion der intestinalen Entzündung in chronischer DSS-Colitis (Dissertation P. Stopfer). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass LIGHT sowohl über die Aktivierung des HVEM-Rezeptors als auch über die Aktivierung des LT β R die Entzündung im Modell der chronischen DSS-Colitis massiv verstärkt.

Die sehr komplexen Interaktionen des LT/ LIGHT-Systems, das verschiedene Ligand- und Rezeptorfunktionen beinhaltet, wurde hinsichtlich der Entwicklung und Manifestation der

DSS-induzierten Colitis analysiert. Als Ergebnis zeigte sich, dass LIGHT und LT β -exprimierende B-Lymphozyten dabei ganz wesentliche proinflammatorische Komponenten darstellen.

Nach den Ergebnissen mit LIGHT-/- Mäusen in DSS-induzierter Colitis wurde zusätzlich untersucht, ob LIGHT an der Abwehr von bakteriellen Infektionen beteiligt ist. Im Modell der CLP war kein Unterschied in der Mortalität zwischen LIGHT-/- Mäusen und WT-Kontrollmäusen erkennbar. Bisher gibt es keine Hinweise auf eine Notwendigkeit der LIGHT-Expression für eine erfolgreiche Infektabwehr.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen mLIGHT hergestellt und charakterisiert. Da ein späterer Einsatz in der DSS-induzierten Colitis geplant war, wurden mit Hilfe der Immunisierung von LIGHT-/- Mäusen „Maus anti-Maus“ Antikörper hergestellt. Aus zwei Fusionen konnten 5 klonierte, stabil anti-mLIGHT-Antikörper produzierende Hybridome etabliert werden. Alle fünf Protein-G-gereinigten Antikörper (1A9, 4B1, 5G8, 9D10 und 15B2) sind zur Detektion von mLIGHT im ELISA und Dot Blot geeignet. Für einen Einsatz im Western Blot sind 4B1, 9D10 und 15B2 geeignet. Bei durchflusszytometrischen Untersuchungen mit stimulierten PMMI konnte eine Bindung von 5G8 an die Zellen gezeigt werden.

Im Modell der akuten DSS-induzierten Colitis waren 9D10 und 15B2 fähig, die intestinale Entzündung effektiv zu hemmen. Dies war am signifikant verringerten histologischen Score der 9D10- bzw. der 15B2-behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar.

Weiterhin ergaben ELISA-Untersuchungen signifikant erhöhte Serum-Konzentrationen an hLIGHT in CU- und MC-Patienten im Vergleich zu „Darm-gesunden“ Probanden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass LIGHT durchaus als mögliche Zielstruktur für die Neutralisierung durch Antikörper zur Therapie von CED in Frage käme.

7. Literaturverzeichnis

Abe, K., Yarovinsky, F. O., Murakami, T., Shakhov, A. N., Tumanov, A. V., Ito, D., Drutskaya, L. N., Pfeffer, K., Kuprash, D. V., Komschlies, K. L., and Nedospasov, S. A. (2003). Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. *Blood* **101**, 1477-1483.

ACHESON, E. D. and TRUE LOVE, S. C. (1961). Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls. *Br.Med.J.* **5257**, 929-933.

An, M. M., Fan, K. X., Zhang, J. D., Li, H. J., Song, S. C., Liu, B. G., Gao, P. H., Zhou, Q., and Jiang, Y. Y. (2005). Lymphotoxin beta receptor-Ig ameliorates TNBS-induced colitis via blocking LIGHT/HVEM signaling. *Pharmacol.Res.* **52**, 234-244.

Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* **406**, 309-314.

Ardizzone, S. and Bianchi, P. G. (2005). Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs* **65**, 2253-2286.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S., and Neurath, M. F. (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat.Med.* **6**, 583-588.

Autschbach, F., Braunstein, J., Helmke, B., Zuna, I., Schurmann, G., Niemir, Z. I., Wallich, R., Otto, H. F., and Meuer, S. C. (1998). In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am.J.Pathol.* **153**, 121-130.

Banks, T. A., Rouse, B. T., Kerley, M. K., Blair, P. J., Godfrey, V. L., Kuklin, N. A., Bouley, D. M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M. L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J.Immunol.* **155**, 1685-1693.

Barbara, G., Xing, Z., Hogaboam, C. M., Gauldie, J., and Collins, S. M. (2000). Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* **46**, 344-349.

Benedict, C. A., Banks, T. A., Senderowicz, L., Ko, M., Britt, W. J., Angulo, A., Ghazal, P., and Ware, C. F. (2001). Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity.* **15**, 617-626.

Berger, D. P., Nanche, D., Crowley, M. T., Koni, P. A., Flavell, R. A., and Oldstone, M. B. (1999). Lymphotoxin-beta-deficient mice show defective antiviral immunity. *Virology* **260**, 136-147.

Bernell, O., Lapidus, A., and Hellers, G. (2000). Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease. *Br.J.Surg.* **87**, 1697-1701.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 749-795.

Boirivant, M., Fuss, I. J., Chu, A., and Strober, W. (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J.Exp.Med.* **188**, 1929-1939.

Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., and Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J.Invest Dermatol.* **78**, 206-209.

- Browning, J. L., Sizing, I. D., Lawton, P., Bourdon, P. R., Rennert, P. D., Majeau, G. R., Ambrose, C. M., Hession, C., Miatkowski, K., Griffiths, D. A., Ngam-ek, A., Meier, W., Benjamin, C. D., and Hochman, P. S. (1997). Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J.Immunol.* **159**, 3288-3298.
- Calkins, B. M. (1989). A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci.* **34**, 1841-1854.
- Cario, E., Rosenberg, I. M., Brandwein, S. L., Beck, P. L., Reinecker, H. C., and Podolsky, D. K. (2000). Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J.Immunol.* **164**, 966-972.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787.
- Chey, W. Y., Hussain, A., Ryan, C., Potter, G. D., and Shah, A. (2001). Infliximab for refractory ulcerative colitis. *Am.J.Gastroenterol.* **96**, 2373-2381.
- Cohavy, O., Zhou, J., Granger, S. W., Ware, C. F., and Targan, S. R. (2004). LIGHT expression by mucosal T cells may regulate IFN-gamma expression in the intestine. *J.Immunol.* **173**, 251-258.
- Cohavy, O., Zhou, J., Ware, C. F., and Targan, S. R. (2005). LIGHT is constitutively expressed on T and NK cells in the human gut and can be induced by CD2-mediated signaling. *J.Immunol.* **174**, 646-653.
- Cole, M. S., Stellrecht, K. E., Shi, J. D., Homola, M., Hsu, D. H., Anasetti, C., Vasquez, M., and Tso, J. Y. (1999). HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, is immunosuppressive to T cells while exhibiting reduced mitogenicity in vitro. *Transplantation* **68**, 563-571.
- Colgan, S. P., Parkos, C. A., Delp, C., Arnaout, M. A., and Madara, J. L. (1993). Neutrophil migration across cultured intestinal epithelial monolayers is modulated by epithelial exposure to IFN-gamma in a highly polarized fashion. *J.Cell Biol.* **120**, 785-798.
- Coombes, J. L., Robinson, N. J., Maloy, K. J., Uhlig, H. H., and Powrie, F. (2005). Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol.Rev.* **204**, 184-194.
- Cooper, H. S., Murthy, S., Kido, K., Yoshitake, H., and Flanigan, A. (2000). Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* **21**, 757-768.
- Corrao, G., Tragnone, A., Caprilli, R., Trallori, G., Papi, C., Andreoli, A., Di Paolo, M., Riegler, G., Rigo, G. P., Ferrau, O., Mansi, C., Ingrosso, M., and Valpiani, D. (1998). Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int.J.Epidemiol.* **27**, 397-404.
- Creed, T. J., Norman, M. R., Probert, C. S., Harvey, R. F., Shaw, I. S., Smithson, J., Anderson, J., Moorghen, M., Gupta, J., Shepherd, N. A., Dayan, C. M., and Hearing, S. D. (2003). Basiliximab (anti-CD25) in combination with steroids may be an effective new treatment for steroid-resistant ulcerative colitis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **18**, 65-75.
- Crum, N. F., Lederman, E. R., and Wallace, M. R. (2005). Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Medicine (Baltimore)* **84**, 291-302.
- Cyster, J. G. (2003). Lymphoid organ development and cell migration. *Immunol.Rev.* **195**, 5-14.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., and Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* **17**, 525-535.

- Dieleman, L. A., Palmen, M. J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A. S., Meuwissen, S. G., and Van Rees, E. P. (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin.Exp.Immunol.* **114**, 385-391.
- Dieleman, L. A., Ridwan, B. U., Tennyson, G. S., Beagley, K. W., Bucy, R. P., and Elson, C. O. (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* **107**, 1643-1652.
- Dohi, T., Fujihashi, K., Rennert, P. D., Iwatani, K., Kiyono, H., and McGhee, J. R. (1999). Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. *J.Exp.Med.* **189**, 1169-1180.
- Dohi, T., Rennert, P. D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y. I., Browning, J. L., and McGhee, J. R. (2001). Elimination of colonic patches with lymphotoxin beta receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J.Immunol.* **167**, 2781-2790.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin.Exp.Immunol.* **102**, 448-455.
- Duggan, A. E., Usmani, I., Neal, K. R., and Logan, R. F. (1998). Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* **43**, 494-498.
- Echtenacher, B., Falk, W., Mannel, D. N., and Krammer, P. H. (1990). Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J.Immunol.* **145**, 3762-3766.
- Edwards, J. R., Sun, S. G., Locklin, R., Shipman, C. M., Adamopoulos, I. E., Athanasou, N. A., and Sabokbar, A. (2006). LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 1451-1462.
- Egger, B., Bajaj-Elliott, M., MacDonald, T. T., Inglin, R., Eysselein, V. E., and Buchler, M. W. (2000). Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* **62**, 240-248.
- Egger, B., Chai, N. N., Wang, L., French, S. W., Buchler, M. W., and Eysselein, V. E. (2001). Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) is not needed for malignant transformation in experimental colitis. *Scand.J.Gastroenterol.* **36**, 276-282.
- Ehlers, S., Holscher, C., Scheu, S., Tertilt, C., Hehlgans, T., Suwinski, J., Endres, R., and Pfeffer, K. (2003). The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Listeria monocytogenes. *J.Immunol.* **170**, 5210-5218.
- Ekstrom, G. M. (1998). Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid. *Scand.J.Gastroenterol.* **33**, 174-179.
- Elewaut, D., Shaikh, R. B., Hammond, K. J., De Winter, H., Leishman, A. J., Sidobre, S., Turovskaya, O., Prigozy, T. I., Ma, L., Banks, T. A., Lo, D., Ware, C. F., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2003). NIK-dependent RelB activation defines a unique signaling pathway for the development of V alpha 14i NKT cells. *J.Exp.Med.* **197**, 1623-1633.
- Enck, P. and Schafer, R. (1996). [Psychosocial factors in Crohn disease--an overview]. *Z.Gastroenterol.* **34**, 708-713.
- Ettinger, R., Munson, S. H., Chao, C. C., Vadeboncoeur, M., Toma, J., and McDevitt, H. O. (2001). A critical role for lymphotoxin-beta receptor in the development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* **193**, 1333-1340.
- Farkas, S., Hornung, M., Sattler, C., Edtinger, K., Steinbauer, M., Anthuber, M., Schlitt, H. J., Herfarth, H., and Geissler, E. K. (2006). Blocking MAdCAM-1 in vivo reduces leukocyte extravasation and reverses chronic inflammation in experimental colitis. *Int.J.Colorectal Dis.* **21**, 71-78.

- Farmer, R. G., Hawk, W. A., and Turnbull, R. B., Jr. (1975). Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* **68**, 627-635.
- Faubion, W. A., Jr., Loftus, E. V., Jr., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., and Sandborn, W. J. (2001). The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **121**, 255-260.
- Fava, R. A., Notidis, E., Hunt, J., Szanya, V., Ratcliffe, N., Ngam-ek, A., De Fougères, A. R., Sprague, A., and Browning, J. L. (2003). A role for the lymphotoxin/LIGHT axis in the pathogenesis of murine collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* **171**, 115-126.
- Fedorak, R. N., Gangl, A., Elson, C. O., Rutgeerts, P., Schreiber, S., Wild, G., Hanauer, S. B., Kilian, A., Cohard, M., LeBeaut, A., and Feagan, B. (2000). Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* **119**, 1473-1482.
- Finkelman, F. D., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, W. C., and Morris, S. C. (1996). Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J.Immunol.* **157**, 1406-1414.
- Force, W. R., Walter, B. N., Hession, C., Tizard, R., Kozak, C. A., Browning, J. L., and Ware, C. F. (1995). Mouse lymphotoxin-beta receptor. Molecular genetics, ligand binding, and expression. *J.Immunol.* **155**, 5280-5288.
- Foung, S. K., Sasaki, D. T., Grumet, F. C., and Engleman, E. G. (1982). Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **79**, 7484-7488.
- Freedman-Jeffrey, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E., and Murray, R. (1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J.Exp.Med.* **181**, 1519-1526.
- Fu, Y. X. and Chaplin, D. D. (1999). Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu.Rev.Immunol.* **17**, 399-433.
- Fuss, I. J., Marth, T., Neurath, M. F., Pearlstein, G. R., Jain, A., and Strober, W. (1999). Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **117**, 1078-1088.
- Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., de la, M. C., Strong, S. A., Fiocchi, C., and Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J.Immunol.* **157**, 1261-1270.
- Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M. H., and Pfeffer, K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity.* **9**, 59-70.
- Gent, A. E., Hellier, M. D., Grace, R. H., Swarbrick, E. T., and Coggon, D. (1994). Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* **343**, 766-767.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-S96.
- Gommerman, J. L., Giza, K., Perper, S., Sizing, I., Ngam-ek, A., Nickerson-Nutter, C., and Browning, J. L. (2003). A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT. *J.Clin.Invest* **112**, 755-767.
- Gonzalez, L. C., Loyet, K. M., Calémine-Fenaux, J., Chauhan, V., Wrangé, B., Ouyang, W., and Eaton, D. L. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 1116-1121.

- Gordon, F. H., Hamilton, M. I., Donoghue, S., Greenlees, C., Palmer, T., Rowley-Jones, D., Dhillon, A. P., Amlot, P. L., and Pounder, R. E. (2002). A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized monoclonal antibody to alpha-4 integrin. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **16**, 699-705.
- Gordon, M. S., McCaskill-Stevens, W. J., Battiato, L. A., Loewy, J., Loesch, D., Breeden, E., Hoffman, R., Beach, K. J., Kuca, B., Kaye, J., and Sledge, G. W., Jr. (1996). A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy. *Blood* **87**, 3615-3624.
- Granger, S. W., Butrovich, K. D., Houshmand, P., Edwards, W. R., and Ware, C. F. (2001). Genomic characterization of LIGHT reveals linkage to an immune response locus on chromosome 19p13.3 and distinct isoforms generated by alternate splicing or proteolysis. *J.Immunol.* **167**, 5122-5128.
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P. J., Mirza, M. M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J. E., Foelsch, U. R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., and Mathew, C. G. (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**, 1925-1928.
- Hampe, J., Grebe, J., Nikolaus, S., Solberg, C., Croucher, P. J., Mascheretti, S., Jahnsen, J., Moum, B., Klump, B., Krawczak, M., Mirza, M. M., Foelsch, U. R., Vatn, M., and Schreiber, S. (2002). Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* **359**, 1661-1665.
- Hampe, J., Shaw, S. H., Saiz, R., Leysens, N., Lantermann, A., Mascheretti, S., Lynch, N. J., MacPherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Stokkers, P., Morin, P., Mirza, M. M., Forbes, A., Lennard-Jones, J. E., Mathew, C. G., Curran, M. E., and Schreiber, S. (1999). Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am.J.Hum.Genet.* **65**, 1647-1655.
- Hanauer, S. B. (2006). Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm.Bowel.Dis.* **12 Suppl 1**, S3-S9.
- Hanauer, S. B., Feagan, B. G., Lichtenstein, G. R., Mayer, L. F., Schreiber, S., Colombel, J. F., Rachmilewitz, D., Wolf, D. C., Olson, A., Bao, W., and Rutgeerts, P. (2002). Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359**, 1541-1549.
- Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V., and Falk, W. (2000). The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **12**, 267-273.
- Hearing, S. D., Norman, M., Smyth, C., Foy, C., and Dayan, C. M. (1999). Wide variation in lymphocyte steroid sensitivity among healthy human volunteers. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 4149-4154.
- Hehlgans, T. and Mannel, D. N. (2001). Recombinant, soluble LIGHT (HVEM ligand) induces increased IL-8 secretion and growth arrest in A375 melanoma cells. *J.Interferon Cytokine Res.* **21**, 333-338.
- Hehlgans, T., Muller, P., Stopfer, P., and Mannel, D. N. (2003). Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NFkappaB-dependent interleukin-6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *Eur.Cytokine Netw.* **14**, 103-107.
- Hehlgans, T. and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1-20.
- Hehlgans, T., Stoelcker, B., Stopfer, P., Muller, P., Cernaianu, G., Guba, M., Steinbauer, M., Nedospasov, S. A., Pfeffer, K., and Mannel, D. N. (2002). Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer Res.* **62**, 4034-4040.

- Heo, S. K., Ju, S. A., Lee, S. C., Park, S. M., Choe, S. Y., Kwon, B., Kwon, B. S., and Kim, B. S. (2006). LIGHT enhances the bactericidal activity of human monocytes and neutrophils via HVEM. *J.Leukoc.Biol.* **79**, 330-338.
- Hirono, I., Kuhara, K., Hosaka, S., Tomizawa, S., and Golberg, L. (1981). Induction of intestinal tumors in rats by dextran sulfate sodium. *J.Natl.Cancer Inst.* **66**, 579-583.
- Hirono, I., Kuhara, K., Yamaji, T., Hosaka, S., and Golberg, L. (1983). Carcinogenicity of dextran sulfate sodium in relation to its molecular weight. *Cancer Lett.* **18**, 29-34.
- Holtmann, M. H., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2001). Immunotherapeutic approaches to inflammatory bowel diseases. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **1**, 455-466.
- Holtmann, M. H., Schutz, M., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2002). Functional relevance of soluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. *Z.Gastroenterol.* **40**, 587-600.
- Hommel, D. W., Mikhajlova, T. L., Stoinov, S., Stimac, D., Vucelic, B., Lonovics, J., Zakuciova, M., D'Haens, G., Van Assche, G., Ba, S., Lee, S., and Pearce, T. (2006). Fontolizumab, a humanised anti-interferon-gamma antibody, demonstrates safety and potential clinical activity in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gut*.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599-603.
- Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J. L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C. G., Lennard-Jones, J. E., Cortot, A., Colombel, J. F., and Thomas, G. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **379**, 821-823.
- Isaacs, K. L., Lewis, J. D., Sandborn, W. J., Sands, B. E., and Targan, S. R. (2005). State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD. *Inflamm.Bowel.Dis.* **11 Suppl 1**, S3-12.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg/ Berlin*.
- Jung, H. W., La, S. J., Kim, J. Y., Heo, S. K., Kim, J. Y., Wang, S., Kim, K. K., Lee, K. M., Cho, H. R., Lee, H. W., Kwon, B., Kim, B. S., and Kwon, B. S. (2003). High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases. *Exp.Mol.Med.* **35**, 501-508.
- Kang, H. S., Chin, R. K., Wang, Y., Yu, P., Wang, J., Newell, K. A., and Fu, Y. X. (2002). Signaling via LTbetaR on the lamina propria stromal cells of the gut is required for IgA production. *Nat.Immunol.* **3**, 576-582.
- Katz, S. (2005). Update in medical therapy of ulcerative colitis: newer concepts and therapies. *J.Clin.Gastroenterol.* **39**, 557-569.
- Keeley, K. A., Rivey, M. P., and Allington, D. R. (2005). Natalizumab for the treatment of multiple sclerosis and Crohn's disease. *Ann.Pharmacother.* **39**, 1833-1843.
- Kim, W. J., Kang, Y. J., Koh, E. M., Ahn, K. S., Cha, H. S., and Lee, W. H. (2005). LIGHT is involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9 in macrophages. *Immunology* **114**, 272-279.
- Kitani, A., Fuss, I. J., Nakamura, K., Schwartz, O. M., Usui, T., and Strober, W. (2000). Treatment of experimental (Trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGF-beta1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain downregulation. *J.Exp.Med.* **192**, 41-52.

- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- Koni, P. A., Sacca, R., Lawton, P., Browning, J. L., Ruddle, N. H., and Flavell, R. A. (1997). Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity*. **6**, 491-500.
- Koutroubakis, I. E. and Vlachonikolis, I. G. (2000). Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am.J.Gastroenterol.* **95**, 171-176.
- Kovac, D., Kotnik, V., and Kandus, A. (2005). Basiliximab and mycophenolate mofetil in combination with low-dose cyclosporine and methylprednisolone effectively prevent acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplant.Proc.* **37**, 4230-4234.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-274.
- Kullmann, F., Messmann, H., Alt, M., Gross, V., Bocker, T., Scholmerich, J., and Ruschoff, J. (2001). Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int.J.Colorectal Dis.* **16**, 238-246.
- Kumaraguru, U., Davis, I. A., Deshpande, S., Tevethia, S. S., and Rouse, B. T. (2001). Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J.Immunol.* **166**, 1066-1074.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lander, E. and Kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat.Genet.* **11**, 241-247.
- Langholz, E., Munkholm, P., Davidsen, M., and Binder, V. (1994). Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* **107**, 3-11.
- Lee, W. H., Kim, S. H., Lee, Y., Lee, B. B., Kwon, B., Song, H., Kwon, B. S., and Park, J. E. (2001). Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**, 2004-2010.
- Leijonmarck, C. E., Persson, P. G., and Hellers, G. (1990). Factors affecting colectomy rate in ulcerative colitis: an epidemiologic study. *Gut* **31**, 329-333.
- Ling, Z. D., Ziltener, H. J., Webb, B. T., and Matheson, D. S. (1990). Aggregated immunoglobulin and Fc fragment of IgG induce IL-6 release from human monocytes. *Cell Immunol.* **129**, 95-103.
- Louis, E., Ribbens, C., Godon, A., Franchimont, D., De Groote, D., Hardy, N., Boniver, J., Belaiche, J., and Malaise, M. (2000). Increased production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Clin.Exp.Immunol.* **120**, 241-246.
- Luther, S. A., Ansel, K. M., and Cyster, J. G. (2003). Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development. *J.Exp.Med.* **197**, 1191-1198.
- Luther, S. A., Bidgol, A., Hargreaves, D. C., Schmidt, A., Xu, Y., Paniyadi, J., Matloubian, M., and Cyster, J. G. (2002). Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J.Immunol.* **169**, 424-433.
- Mackay, F. and Browning, J. L. (1998a). Turning off follicular dendritic cells. *Nature* **395**, 26-27.

- Mackay, F., Browning, J. L., Lawton, P., Shah, S. A., Comiskey, M., Bhan, A. K., Mizoguchi, E., Terhorst, C., and Simpson, S. J. (1998b). Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* **115**, 1464-1475.
- Madsen, K. L., Doyle, J. S., Jewell, L. D., Tavernini, M. M., and Fedorak, R. N. (1999). Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* **116**, 1107-1114.
- Marsters, S. A., Ayres, T. M., Skubatch, M., Gray, C. L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J.Biol.Chem.* **272**, 14029-14032.
- Marth, T., Kelsall, B. L., Strober, W., and Zeitz, M. (1999). [Mechanisms and applications of oral tolerance]. *Z.Gastroenterol.* **37**, 165-185.
- Mascheretti, S., Hampe, J., Croucher, P. J., Nikolaus, S., Andus, T., Schubert, S., Olson, A., Bao, W., Folsch, U. R., and Schreiber, S. (2002). Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics* **12**, 509-515.
- Mauri, D. N., Ebner, R., Montgomery, R. I., Kochel, K. D., Cheung, T. C., Yu, G. L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Spear, P. G., and Ware, C. F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. **8**, 21-30.
- McKaig, B. C., Hughes, K., Tighe, P. J., and Mahida, Y. R. (2002). Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **282**, C172-C182.
- Mebius, R. E. (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 292-303.
- Mihara, M., Nishimoto, N., and Ohsugi, Y. (2005). The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert.Opin.Biol.Ther.* **5**, 683-690.
- Miller, A., Lider, O., and Weiner, H. L. (1991). Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J.Exp.Med.* **174**, 791-798.
- Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M. J., Glimcher, L. H., Bhan, A. K., and Tonegawa, S. (1993). Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* **75**, 274-282.
- Monteleone, G., Biancone, L., Marasco, R., Morrone, G., Marasco, O., Luzzza, F., and Pallone, F. (1997). Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* **112**, 1169-1178.
- Monteleone, G., Kumberova, A., Croft, N. M., McKenzie, C., Steer, H. W., and MacDonald, T. T. (2001). Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J.Clin.Invest* **108**, 601-609.
- Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., and Spear, P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., and Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **96**, 795-803.
- Munkholm, P., Langholz, E., Davidsen, M., and Binder, V. (1994). Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* **35**, 360-362.
- Munkholm, P., Langholz, E., Davidsen, M., and Binder, V. (1995). Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand.J.Gastroenterol.* **30**, 699-706.

- Naito, Y., Takagi, T., Kuroda, M., Katada, K., Ichikawa, H., Kokura, S., Yoshida, N., Okanou, T., and Yoshikawa, T. (2004). An orally active matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, reduces dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Inflamm.Res.* **53**, 462-468.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., and Strober, W. (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J.Exp.Med.* **182**, 1281-1290.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Haralambous, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Strober, W., and Kollias, G. (1997). Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur.J.Immunol.* **27**, 1743-1750.
- Newberry, R. D., McDonough, J. S., McDonald, K. G., and Lorenz, R. G. (2002). Postgestational lymphotoxin/lymphotoxin beta receptor interactions are essential for the presence of intestinal B lymphocytes. *J.Immunol.* **168**, 4988-4997.
- Niessner, M. and Volk, B. A. (1995). Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin.Exp.Immunol.* **101**, 428-435.
- Nikolaus, S., Raedler, A., Kuhbacker, T., Sfikas, N., Folsch, U. R., and Schreiber, S. (2000). Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. *Lancet* **356**, 1475-1479.
- Nishimoto, N. (2005). Clinical studies in patients with Castleman's disease, Crohn's disease, and rheumatoid arthritis in Japan. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* **28**, 221-230.
- Obermeier, F., Dunger, N., Deml, L., Herfarth, H., Scholmerich, J., and Falk, W. (2002). CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice. *Eur.J.Immunol.* **32**, 2084-2092.
- Obermeier, F., Strauch, U. G., Dunger, N., Grunwald, N., Rath, H. C., Herfarth, H. H., Scholmerich, J., and Falk, W. (2005). In vivo CpG DNA/TLR9 interaction induces regulatory properties in CD4+CD62L+-T-cells which prevent intestinal inflammation in the SCID-transfer model of colitis. *Gut*.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., and Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603-606.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702.
- Olavesen, M. G., Hampe, J., Mirza, M. M., Saiz, R., Lewis, C. M., Bridger, S., Teare, D., Easton, D. F., Herrmann, T., Scott, G., Hirst, J., Sanderson, J., Hodgson, S. V., Lee, J., MacPherson, A., Schreiber, S., Lennard-Jones, J. E., Curran, M. E., and Mathew, C. G. (2000). Analysis of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 receptor gene for association with inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* **51**, 1-7.
- Orazi, A., Du, X., Yang, Z., Kashai, M., and Williams, D. A. (1996). Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. *Lab Invest* **75**, 33-42.
- Orholm, M., Munkholm, P., Langholz, E., Nielsen, O. H., Sorensen, T. I., and Binder, V. (1991). Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med.* **324**, 84-88.
- Plevy, S. E., Landers, C. J., Prehn, J., Carramanzana, N. M., Deem, R. L., Shealy, D., and Targan, S. R. (1997). A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J.Immunol.* **159**, 6276-6282.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med.* **347**, 417-429.

Powrie, F. (2004). Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1029**, 132-141.

Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int.Immunol.* **5**, 1461-1471.

Rao, S. S., Holdsworth, C. D., and Read, N. W. (1988). Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* **29**, 342-345.

Reinisch, W., Hommes, D. W., Van Assche, G., Colombel, J. F., Gendre, J. P., Oldenburg, B., Teml, A., Geboes, K., Ding, H., Zhang, L., Tang, M., Cheng, M., van Deventer, S. J., Rutgeerts, P., and Pearce, T. (2006). A dose-escalating, placebo-controlled, double-blind, single-dose and multi-dose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon-gamma antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gut*.

Rennert, P. D., James, D., Mackay, F., Browning, J. L., and Hochman, P. S. (1998). Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity.* **9**, 71-79.

Rickert, R. C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1317-1318.

Rigas, A., Rigas, B., Glassman, M., Yen, Y. Y., Lan, S. J., Petridou, E., Hsieh, C. C., and Trichopoulos, D. (1993). Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood. *Ann.Epidemiol.* **3**, 387-392.

Rioux, J. D., Daly, M. J., Silverberg, M. S., Lindblad, K., Steinhart, H., Cohen, Z., Delmonte, T., Kocher, K., Miller, K., Guschwan, S., Kulbokas, E. J., O'Leary, S., Winchester, E., Dewar, K., Green, T., Stone, V., Chow, C., Cohen, A., Langelier, D., Lapointe, G., Gaudet, D., Faith, J., Branco, N., Bull, S. B., McLeod, R. S., Griffiths, A. M., Bitton, A., Greenberg, G. R., Lander, E. S., Siminovitch, K. A., and Hudson, T. J. (2001). Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat.Genet.* **29**, 223-228.

Ritchie, J. K., Wadsworth, J., Lennard-Jones, J. E., and Rogers, E. (1987). Controlled multicentre therapeutic trial of an unrefined carbohydrate, fibre rich diet in Crohn's disease. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* **295**, 517-520.

Roach, D. R., Briscoe, H., Saunders, B., France, M. P., Riminton, S., and Britton, W. J. (2001). Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J.Exp.Med.* **193**, 239-246.

Ropper, A. H. (2006). Selective treatment of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* **354**, 965-967.

Russel, M. G., Engels, L. G., Muris, J. W., Limonard, C. B., Volovics, A., Brummer, R. J., and Stockbrugger, R. W. (1998). Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **10**, 243-249.

Sandrini, S. (2005). Use of IL-2 receptor antagonists to reduce delayed graft function following renal transplantation: a review. *Clin.Transplant.* **19**, 705-710.

Sands, B. E., Bank, S., Sninsky, C. A., Robinson, M., Katz, S., Singleton, J. W., Miner, P. B., Safdi, M. A., Galandiuk, S., Hanauer, S. B., Varilek, G. W., Buchman, A. L., Rodgers, V. D., Salzberg, B., Cai, B., Loewy, J., DeBruin, M. F., Rogge, H., Shapiro, M., and Schwertschlag, U. S. (1999). Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology* **117**, 58-64.

Sands, B. E., Winston, B. D., Salzberg, B., Safdi, M., Barish, C., Wruble, L., Wilkins, R., Shapiro, M., and Schwertschlag, U. S. (2002). Randomized, controlled trial of recombinant human interleukin-11 in patients with active Crohn's disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **16**, 399-406.

- Sartor, R. B. (1997). Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **11 Suppl 3**, 17-22.
- Satsangi, J., Parkes, M., Louis, E., Hashimoto, L., Kato, N., Welsh, K., Terwilliger, J. D., Lathrop, G. M., Bell, J. I., and Jewell, D. P. (1996). Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat.Genet.* **14**, 199-202.
- Scallon, B. J., Moore, M. A., Trinh, H., Knight, D. M., and Ghayeb, J. (1995). Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* **7**, 251-259.
- Scheu, S., Alferink, J., Potzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., and Pfeffer, K. (2002). Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *J.Exp.Med.* **195**, 1613-1624.
- Schluter, D., Kwok, L. Y., Lutjen, S., Soltek, S., Hoffmann, S., Korner, H., and Deckert, M. (2003). Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J.Immunol.* **170**, 6172-6182.
- Schmid, R. M., Adler, G., and Liptay, S. (1998). Activation of NFkappaB in inflammatory bowel disease. *Gut* **43**, 587-588.
- Schreiber, S., Fedorak, R. N., Nielsen, O. H., Wild, G., Williams, C. N., Nikolaus, S., Jacyna, M., Lashner, B. A., Gangl, A., Rutgeerts, P., Isaacs, K., van Deventer, S. J., Koningsberger, J. C., Cohard, M., LeBeaut, A., and Hanauer, S. B. (2000). Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* **119**, 1461-1472.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Malchow, H., Kruis, W., Lochs, H., Raedler, A., Hahn, E. G., Krummenerl, T., and Steinmann, G. (2001). Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology* **120**, 1339-1346.
- Sedy, J. R., Gavrieli, M., Potter, K. G., Hurchla, M. A., Lindsley, R. C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C. F., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat.Immunol.* **6**, 90-98.
- Senftleben, U. and Karin, M. (2002). The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med.* **30**, S18-S26.
- Seril, D. N., Liao, J., Ho, K. L., Warsi, A., Yang, C. S., and Yang, G. Y. (2002). Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. *Dig.Dis.Sci.* **47**, 1266-1278.
- Shaikh, R. B., Santee, S., Granger, S. W., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H., and Ware, C. F. (2001). Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J.Immunol.* **167**, 6330-6337.
- Shen, E. H. and Das, K. M. (2004). Current therapeutic recommendations: infliximab for ulcerative colitis. *J.Clin.Gastroenterol.* **38**, 741-745.
- Shintani, N., Nakajima, T., Okamoto, T., Kondo, T., Nakamura, N., and Mayumi, T. (1998). Involvement of CD4+ T cells in the development of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis and suppressive effect of IgG on their action. *Gen.Pharmacol.* **31**, 477-481.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., and van Blankenstein, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39**, 690-697.
- Shulman, M., Wilde, C. D., and Kohler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* **276**, 269-270.

- Sivakumar, P. V., Westrich, G. M., Kanaly, S., Garka, K., Born, T. L., Derry, J. M., and Viney, J. L. (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* **50**, 812-820.
- Sonnenberg, A. (1988). Geographic and temporal variations of sugar and margarine consumption in relation to Crohn's disease. *Digestion* **41**, 161-171.
- Spahn, T. W., Herbst, H., Rennert, P. D., Luger, N., Maaser, C., Kraft, M., Fontana, A., Weiner, H. L., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2002). Induction of colitis in mice deficient of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes is associated with increased disease severity and formation of colonic lymphoid patches. *Am.J.Pathol.* **161**, 2273-2282.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neiryck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**, 1352-1355.
- Steinhardt, H. J., Loeschke, K., Kasper, H., Holtermuller, K. H., and Schafer, H. (1985). European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): clinical features and natural history. *Digestion* **31**, 97-108.
- Steinman, L. (1997). Some misconceptions about understanding autoimmunity through experiments with knockouts. *J.Exp.Med.* **185**, 2039-2041.
- Stopfer, P., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2004a). Lymphotoxin-beta receptor activation by activated T cells induces cytokine release from mouse bone marrow-derived mast cells. *J.Immunol.* **172**, 7459-7465.
- Stopfer, P., Obermeier, F., Dunger, N., Falk, W., Farkas, S., Janotta, M., Moller, A., Mannel, D. N., and Hehlhans, T. (2004b). Blocking lymphotoxin-beta receptor activation diminishes inflammation via reduced mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) expression and leucocyte margination in chronic DSS-induced colitis. *Clin.Exp.Immunol.* **136**, 21-29.
- Sturm, A., Schulte, C., Schatton, R., Becker, A., Cario, E., Goebell, H., and Dignass, A. U. (2000). Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **12**, 445-450.
- Suresh, M., Lanier, G., Large, M. K., Whitmire, J. K., Altman, J. D., Ruddle, N. H., and Ahmed, R. (2002). Role of lymphotoxin alpha in T-cell responses during an acute viral infection. *J.Virol.* **76**, 3943-3951.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., and Lochs, H. (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44-54.
- Tamada, K., Shimosaki, K., Chapoval, A. I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S. F., Hsieh, S. L., Nagata, S., Ni, J., and Chen, L. (2000a). LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J.Immunol.* **164**, 4105-4110.
- Tamada, K., Shimosaki, K., Chapoval, A. I., Zhu, G., Sica, G., Flies, D., Boone, T., Hsu, H., Fu, Y. X., Nagata, S., Ni, J., and Chen, L. (2000b). Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nat.Med.* **6**, 283-289.
- Tamaru, T., Kobayashi, H., Kishimoto, S., Kajiyama, G., Shimamoto, F., and Brown, W. R. (1993). Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis of rats. *Dig.Dis.Sci.* **38**, 529-537.
- ten Hove, T., Van Montfrans, C., Peppelenbosch, M. P., and van Deventer, S. J. (2002). Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* **50**, 206-211.
- Tepler, I., Elias, L., Smith, J. W., Hussein, M., Rosen, G., Chang, A. Y., Moore, J. O., Gordon, M. S., Kuca, B., Beach, K. J., Loewy, J. W., Garnick, M. B., and Kaye, J. A. (1996). A randomized placebo-

controlled trial of recombinant human interleukin-11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy. *Blood* **87**, 3607-3614.

Thomas, G. A., Millar-Jones, D., Rhodes, J., Roberts, G. M., Williams, G. T., and Mayberry, J. F. (1995). Incidence of Crohn's disease in Cardiff over 60 years: 1986-1990 an update. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **7**, 401-405.

Timmer, A., Breuer-Katschinski, B., and Goebell, H. (1999a). Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm.Bowel.Dis.* **5**, 79-84.

Timmer, A. and Goebell, H. (1999b). Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z.Gastroenterol.* **37**, 1079-1084.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354.

Trepicchio, W. L., Bozza, M., Pedneault, G., and Dorner, A. J. (1996). Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J.Immunol.* **157**, 3627-3634.

Tumanov, A. V., Grivennikov, S. I., Shakhov, A. N., Rybtsov, S. A., Koroleva, E. P., Takeda, J., Nedospasov, S. A., and Kuprash, D. V. (2003). Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol.Rev.* **195**, 106-116.

Van Montfrans, C., Rodriguez Pena, M. S., Pronk, I., Ten Kate, F. J., Te Velde, A. A., and van Deventer, S. J. (2002). Prevention of colitis by interleukin 10-transduced T lymphocytes in the SCID mice transfer model. *Gastroenterology* **123**, 1865-1876.

Vollmar, A., Dingermann, T. (2005). Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*.

von Lampe, B., Barthel, B., Coupland, S. E., Riecken, E. O., and Rosewicz, S. (2000). Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **47**, 63-73.

Walker, K. B., Potter, J. M., and House, A. K. (1987). Interleukin 2 synthesis in the presence of steroids: a model of steroid resistance. *Clin.Exp.Immunol.* **68**, 162-167.

Wang, J., Anders, R. A., Wang, Y., Turner, J. R., Abraham, C., Pfeffer, K., and Fu, Y. X. (2005a). The critical role of LIGHT in promoting intestinal inflammation and Crohn's disease. *J.Immunol.* **174**, 8173-8182.

Wang, J., Anders, R. A., Wu, Q., Peng, D., Cho, J. H., Sun, Y., Karaliukas, R., Kang, H. S., Turner, J. R., and Fu, Y. X. (2004). Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy. *J.Clin.Invest* **113**, 826-835.

Wang, J. and Fu, Y. X. (2005b). Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. *Immunol.Rev.* **204**, 144-155.

Wang, J., Lo, J. C., Foster, A., Yu, P., Chen, H. M., Wang, Y., Tamada, K., Chen, L., and Fu, Y. X. (2001). The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J.Clin.Invest* **108**, 1771-1780.

Wang, Y., Subudhi, S. K., Anders, R. A., Lo, J., Sun, Y., Blink, S., Wang, Y., Wang, J., Liu, X., Mink, K., Grandi, D., Pfeffer, K., and Fu, Y. X. (2005c). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J.Clin.Invest* **115**, 711-717.

Ware, C. F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 787-819.

- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Iwao, Y., Tsuchiya, M., Ishikawa, H., Aiso, S., Hibi, T., and Ishii, H. (1995). Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J.Clin.Invest* **95**, 2945-2953.
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., Nishimoto, H., Ishikawa, H., Hata, J., and Hibi, T. (1998). Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J.Exp.Med.* **187**, 389-402.
- Wilhelm, P., Riminton, D. S., Ritter, U., Lemckert, F. A., Scheidig, C., Hoek, R., Sedgwick, J. D., and Korner, H. (2002). Membrane lymphotoxin contributes to anti-leishmanial immunity by controlling structural integrity of lymphoid organs. *Eur.J.Immunol.* **32**, 1993-2003.
- Wirtz, S., Becker, C., Blumberg, R., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2002). Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J.Immunol.* **168**, 411-420.
- Wirtz, S. and Neurath, M. F. (2000). Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int.J.Colorectal Dis.* **15**, 144-160.
- Woo, P., Wilkinson, N., Prieur, A. M., Southwood, T., Leone, V., Livermore, P., Wythe, H., Thomson, D., and Kishimoto, T. (2005). Open label phase II trial of single, ascending doses of MRA in Caucasian children with severe systemic juvenile idiopathic arthritis: proof of principle of the efficacy of IL-6 receptor blockade in this type of arthritis and demonstration of prolonged clinical improvement. *Arthritis Res.Ther.* **7**, R1281-R1288.
- Wright, J. P., Froggatt, J., O'Keefe, E. A., Ackerman, S., Watermeyer, S., Louw, J., Adams, G., Girdwood, A. H., Burns, D. G., and Marks, I. N. (1986). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980-1984. *S.Afr.Med.J.* **70**, 10-15.
- Wu, Q., Salomon, B., Chen, M., Wang, Y., Hoffman, L. M., Bluestone, J. A., and Fu, Y. X. (2001). Reversal of spontaneous autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by soluble lymphotoxin receptor. *J.Exp.Med.* **193**, 1327-1332.
- Wu, Q., Wang, Y., Wang, J., Hedgeman, E. O., Browning, J. L., and Fu, Y. X. (1999). The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J.Exp.Med.* **190**, 629-638.
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hubl, W., Waldhoer, T., and Lochs, H. (1993). Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* **341**, 1437-1439.
- Yacyshyn, B. R., Chey, W. Y., Goff, J., Salzberg, B., Baerg, R., Buchman, A. L., Tami, J., Yu, R., Gibiansky, E., and Shanahan, W. R. (2002). Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* **51**, 30-36.
- Yamada, M., Ohkusa, T., and Okayasu, I. (1992a). Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. *Gut* **33**, 1521-1527.
- Yamada, Y., Marshall, S., Specian, R. D., and Grisham, M. B. (1992b). A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* **102**, 1524-1534.
- Yin, M. J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* **396**, 77-80.
- Yokota, S., Miyamae, T., Imagawa, T., Katakura, S., Kurosawa, R., and Mori, M. (2005). Clinical study of tocilizumab in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* **28**, 231-238.

Yoshida, H., Naito, A., Inoue, J., Satoh, M., Santee-Cooper, S. M., Ware, C. F., Togawa, A., Nishikawa, S., and Nishikawa, S. (2002). Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity*. **17**, 823-833.

Yoshihara, K., Yajima, T., Kubo, C., and Yoshikai, Y. (2006). Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. *Gut* **55**, 334-341.

Yousry, T. A., Major, E. O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E. W., Jager, H. R., and Clifford, D. B. (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N.Engl.J.Med.* **354**, 924-933.

Zhang, M., Guo, R., Zhai, Y., Fu, X. Y., and Yang, D. (2003). Light stimulates IFN-gamma-mediated intercellular adhesion molecule-1 upregulation of cancer cells. *Hum.Immunol.* **64**, 416-426.

8. Anhang

Publikationen, die im Rahmen der Promotion entstanden sind:

Distinct role of LIGHT and surface Lymphotoxin expressed by B lymphocytes in DSS-induced intestinal inflammation

Michaela Jungbeck, Frauke Bataille, Klaus Pfeffer, Sergei A. Nedospasov, Daniela N. Männel, and Thomas Hehlhans

(Manuskript eingereicht bei „Gut“)

Neutralisation of LIGHT (TNFSF14) ameliorates DSS-induced intestinal inflammation

Michaela Jungbeck, Daniela N. Männel, and Thomas Hehlhans

(Manuskript in Vorbereitung)

Poster:

Posterpräsentation bei der „10th International TNF Superfamily Conference“ 2004 in Lausanne: „LT β -receptor activation-dependent MAdCAM expression and leukocyte margination are critical for chronic colitis“

Posterpräsentation beim „36. Annual Meeting of the German Society of Immunology (DGFI) and 36. Annual Meeting of the Scandinavian Society for Immunology (SSI)“ 2005 in Kiel: „Lymphotoxin- β receptor activation is critically involved in the development of chronic DSS-induced colitis“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich danken. Mein besonderer Dank gilt:

- Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel, die mir das überaus interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und mir bei der Umsetzung stets zur Seite stand. Die zahlreichen Dienstagsbesprechungen und Mittwochsseminare haben mein wissenschaftliches Arbeiten sehr positiv geprägt.
- Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans für seine Diskussionsbereitschaft und die Begleitung meiner Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Ernst Wagner für die Aufnahme als externe Doktorandin und für die Vertretung der Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München.
- Herrn Dr. Peter Stopfer für die hervorragende Einführung in das Thema der Arbeit. Von seinem praktischen und theoretischen Fachwissen habe ich in den ersten Monaten meiner Promotionszeit in großem Umfang profitiert.
- Frau Dr. Frauke Bataille für die Beurteilung der Dickdarm-Schnitte und das Erstellen des "Histologischen Scores".
- Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhard Rogler für die Überlassung der Patienten-Seren.
- Veronika Hochleitner für die Hilfe bei den Genotypisierungen der gendefizienten Mäuse. Es hat sehr viel Freude gemacht, mit ihr zusammen in einem Labor zu arbeiten!
- Dorothea Weber-Steffens für die Einführung in die Geheimnisse der Zellfusion und der Antikörper-Reinigung und Karin Holz für die erfolgreiche Zusammenarbeit beim "Hochziehen der Klone" nach der zweiten Fusion.
- Monika Bäuml für die Unterstützung am Durchflusszytometer und den wöchentlichen sportlichen Ausgleich.
- Frau Dr. Michaela Windbichler für die sehr gewissenhafte, scharfsinnige und kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ein weiterer ganz großer Dank gilt meinem Freund Rainer, der immer ein offenes Ohr für meine Geschichten aus dem Laboralltag hatte.

Zu guter Letzt möchte ich besonders herzlich meinen Eltern danken, die mich während meiner Schulzeit, meines Studiums und meiner Promotion immer und bei allem bestens unterstützt haben. Ohne sie wäre diese erfolgreiche Ausbildung nicht möglich gewesen!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Michaela Jungbeck
Geburtsdatum, -ort	06.11.1977 in Bad Kötzing
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

Sept. 1984 - Juli 1988	Besuch der Volksschule Arnbruck
Sept. 1988 - Juni 1997	Besuch des Benedikt-Stattler-Gymnasiums in Bad Kötzing

Studium:

Mai 1998 - April 2002	Pharmaziestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juli 2003	Approbation als Apothekerin

Praktika / Famulatur:

01.08.1997 - 30.09.1997	Praktikum am Kreiskrankenhaus St. Josef in Bad Kötzing
05.10.1998 - 30.10.1998	Famulatur in der Antonius-Apotheke in Deggendorf
22.02.1999 - 19.03.1999	Famulatur in der Krankenhausapotheke des Klinikums Deggendorf
01.05.2002 - 31.10.2002	1. Teil des Pharmaziepraktikums bei der HEXAL AG in Holzkirchen
01.11.2002 - 30.04.2003	2. Teil des Pharmaziepraktikums in der Apotheke im Gewerbepark in Regensburg

Promotion:

Sept. 2003 - Mai 2006	Promotion im Fach Pharmazeutische Biologie an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
	Durchführung der Arbeit am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg

Fang nie an aufzuhören,
hör nie auf anzufangen.

-Cicero-