

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

**Die Rolle der bakteriellen Darmflora in der Kolitis der
Interleukin-2 defizienten Maus**

von

Marc Waidmann

aus

Limburg an der Lahn

2000

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29.01.1998 von Herrn Prof. Dr. I. Autenrieth betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 17.10.2000

(Marc Waidmann)

Dissertation eingereicht am 25.10.2000

1. Berichterstatter: Prof. Dr. I. Autenrieth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2000

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt	Seite
1. Einleitung	1
2. Methoden	10
2.1 Tiere und Zuchtbedingungen	10
2.1.1 Spezifisch-pathogenfreie Zucht (SPF)	10
2.1.2 Gnotobiotische und keimfreie (KF) Zucht	10
2.2 Analyse der Genexpression	11
2.2.1 Isolation von RNA aus Darmgewebe	11
2.2.2 Reverse Transkription (RT)	12
2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	12
2.2.4 Quantitative Analyse der PCR-Amplifikate	14
2.2.5 Semi-quantitative Analyse der Genexpression	14
2.3 Lymphoide Zellen	15
2.3.1 Isolation der Zellen zur Zellkultur	15
2.3.1.1 Aus Darmgewebe	15
2.3.1.2 Aus mesenterialen Lymphknoten	15
2.3.1.3 Aus der Milz	16
2.3.1.4 Antigenpräsentierende Zellen (APZ)	16
2.3.2 Zellzählung	16
2.3.3 Unspezifische Anreicherung von lymphoiden Zellen (Percoll-Dichtenzentrifugation)	16
2.3.4 Spezifische Depletion von CD4 ⁺ Zellen (Panning)	16
2.4 Kultivierung lymphoider Zellen	17
2.4.1 Zellkulturbedingungen	17
2.4.1.1 In-vitro Blockade von Interleukin-10	17
2.4.1.2 In-vitro Blockade von Lipopolysacchariden (LPS) durch Polymyxin B	17
2.4.2 Gewinnung von Zellkulturüberständen	17
2.5 Funktionelle Analysen der kultivierten Zellen	17
2.5.1 Bestimmung der Zellproliferation	17

2.5.2	Quantitative Bestimmung sekretierter Zytokine im Zellkulturüberstand	18
2.5.2.1	Bestimmung der Proteinmenge mit ELISA	18
2.5.2.2	Bestimmung der Bioaktivität mit Bioassays	18
2.6.	Durchflusszytometrische Zellanalyse mit FACS	19
2.6.1	Färbeprozedur	19
2.6.2	Monoklonale Antikörper (engl. <i>monoclonal antibodies</i> ; mAb)	19
2.6.3	Computergestützte Auswertung	20
2.7	Bakterielle Zellkultur	20
2.7.1	Bakterielle Spezies	20
2.7.2	Kulturbedingungen	20
2.7.3	Identitäts- und Reinheitskontrollen	21
2.7.4	Herstellung von antigenen Präparationen	22
2.7.4.1	CBA (engl. <i>colonic bacterial antigen</i>)	22
2.7.4.2	Hitze-getöteter <i>Bacteroides vulgatus</i>	22
2.7.5.	quantitative Bestimmung des Proteingehaltes	22
2.8	Histologische Untersuchungen	23
2.8.1	Konservierung des Gewebes	23
2.8.2	Gefrierschnitte (Kryotomie)	23
2.8.3	Histologische Färbung mit Haematoxylin & Eosin (HE-Färbung)	23
2.9	Untersuchung der Lokalisation von Bakterien im Darm mittels FISH-Technologie	23
2.9.1	Konservierung des Gewebes	23
2.9.2	Positivkontrollen	23
2.9.3	Färbeprozedur	24
2.9.4	Auswertung und Dokumentation	24
2.10	Untersuchung der in-vivo Migration adoptiv transferierter T-Zellen	25
2.10.1	Donortiere und -zellen	25
2.10.2	Zellapplikation und Verweilzeit	26
2.10.3	Auswertung	27
2.10.4	Blockade von Adressinen	27
2.10.4.1	monoklonale Antikörper	27
2.10.4.1.1	Herstellung	27
2.10.4.1.2	Spezifische Aufreinigung	28

2.10.4.1.3	Spaltung in Fab –Fragmente	28
2.10.4.1.4	Analyse mit SDS-Gelelektrophorese	28
2.10.4.1.4.1	Coomassiefärbung von SDS-Gelen	28
2.10.4.1.4.2	Silberfärbung von SDS-Gelen	28
2.11	Adoptiver Transfer von CBA-spezifischen Zelllinien	29
2.11.1	Zelllinien	29
2.11.1.1	Zellkulturbedingungen	29
2.11.1.2	Charakterisierung der Eigenschaften der Zelllinien	30
2.11.2	Adoptiver Transfer	30
2.11.2.1	Empfängertiere	32
2.11.2.2	Auswertungsparameter	31
2.12	Besiedlung von KF-Mäusen mit SPF-Flora	31
2.13	Quantitative und qualitative Analyse der Kolonflora	31
3.	Materialien, Reagenzien, Geräte, Statistik	34
3.1	Tierzucht	34
3.1.1.	SPF (engl. <i>specific pathogen free</i>)	34
3.1.2.	Gnotobiotische Zucht	34
3.2.	Semiquantitative RT-PCR	34
3.3	Zellisolation und –kultivierung	35
3.4	Durchflusszytometrie	36
3.5	Bakterielle Zellkultur	36
3.6	Herstellung antigener Präparationen	37
3.7	Histologische Untersuchungen	37
3.8	In-vivo Migration adoptiv transferierter T-Zellen	38
3.9	Herstellung und Fab-Spaltung monoklonaler Antikörper	39
3.10	Statistische Auswertung	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Histologie des Kolons von IL-2 ^{+/+} und IL-2 ^{-/-} Mäusen unter SPF- und KF-Zucht	40
4.2	Zytokin- <i>mRNA</i> Expression im Kolon von SPF- und KF-Mäusen	43
4.2.1	Untersuchung 20 Wochen alter Tiere	43

4.2.2	33 Wochen alte Tiere	45
4.3	Phänotypische Untersuchungen intestinaler T-Zellen	46
4.3.1	Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)	47
4.3.2	Lamina-Propria-Lymphozyten (LPL)	48
4.3.3	T-Zellen sekundärer Lymphorgane	49
4.4	Migrationsverhalten von T-Zellen in IL-2 ^{-/-} Mäusen	49
4.4.1	Untersuchungen ohne Blockade von Adhäsionsmolekülen	50
4.4.2	Untersuchungen mit Blockade von Adhäsionsmolekülen	52
4.5	Funktionelle Untersuchungen intestinaler T-Zellen von IL-2 ^{-/-} Mäusen	54
4.5.1	In-vitro Proliferationsverhalten in Gegenwart bakterieller Antigene	55
4.5.2.1	In-vitro Zytokinproduktion in Gegenwart bakterieller Antigene	57
4.5.2.2	Analyse der Rolle von IL-10 in den Zellkulturexperimenten	61
4.5.2.3	Aufklärung der zellulären Quelle von IL-10	62
4.6	Untersuchung der Übertragbarkeit der Kolitis durch adoptiven Transfer von T-Zelllinien	64
4.6.1	Charakterisierung der in-vitro Eigenschaften CBA-spezifischer Zelllinien	64
4.6.2	Adoptiver Transfer CBA-spezifischer Zellen	67
4.6.2.1	Beurteilung der klinischen Manifestationen der Kolitis mit einem Score	67
4.6.2.2	Verlauf des Kolitis-Scores adoptiver transferierter Mäuse	68
4.6.2.2.1	Adoptiver Transfer der Kolon _{LPL} -Zelllinie von IL-2 ^{-/-} Mäusen (LCK98)	68
4.6.2.2.2	Adoptiver Transfer der Milzzelllinie von IL-2 ^{-/-} Mäusen (SK98.2)	70
4.6.2.2.3	Adoptiver Transfer der Milzzelllinie von IL-2 ^{+/+} Mäusen (SW98.1)	72
4.7	Besiedlung adulter KF-Mäuse mit einer SPF-Flora	73
4.8	Analyse der murinen Darmflora	75
4.8.1	Untersuchungen an <i>Bacteroides vulgatus</i> -assoziierten Mäusen	78
4.8.1.1	Histologische Untersuchungen des Kolons	78
4.8.1.2	Bakterielle Lokalisation im Kolon	78
4.8.1.3	Zytokin-mRNA Expression im Kolon	82
4.8.2	Untersuchungen an <i>Escherichia coli</i> -monoassoziierten Mäusen	82
4.8.2.1	Histologische Untersuchungen des Kolons 33 Wochen alter Mäuse	82
4.8.2.2	Bakterielle Lokalisation im Kolon	83

4.8.2.3	Zytokin-mRNA Expression im Kolon	87
4.8.3	Untersuchungen an mit <i>Bacteroides vulgatus</i> und <i>Escherichia coli</i> besiedelten Mäusen	89
4.8.3.1	Histologische Untersuchungen des Kolons	89
4.8.3.2	Bakterielle Lokalisation im Kolon	89
4.8.3.3	Zytokin-mRNA Expression im Kolon	92
4.8.4	Untersuchungen an mit <i>Clostridium aff. innocuum</i> und <i>Cl. clostridiiformis</i> besiedelten Mäusen	94
4.8.4.1	Histologische Untersuchungen des Kolons	94
4.8.4.2	Bakterielle Lokalisation im Kolon	94
4.8.4.3	Zytokin- <i>mRNA</i> Expression im Kolon	95
5.	Diskussion	99
5.1	Der Einfluss der Darmflora auf die Entstehung der Kolitis der IL-2 ^{-/-} Maus	99
5.2	Rezirkulation von T-Zellen in IL-2 ^{-/-} Mäusen mit Kolitis	101
5.3	Untersuchungen intestinaler Lymphozyten	104
5.3.1	In-vitro Experimente zum funktionellen Phänotyp und der Antigenspezifität intestinaler T-Zellen	104
5.3.2	in-vivo Experimente zur Übertragbarkeit der Kolitis durch den adoptiven Transfer von T-Zellen	106
5.4	Kolitis-induzierende Eigenschaften repräsentativer Keime der Darmflora	111
6.	Zusammenfassung	117
7.	Literaturzitate	119

1. Einleitung

Unter dem Oberbegriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) fasst man progredient verlaufende, inflammatorische Veränderungen unbekannter Ätiologie im Gastrointestinaltrakt des Menschen zusammen. Dabei stellen der Morbus Crohn und die Kolitis ulcerosa die beiden klinisch-histologisch definierten Hauptformen dar. Der Morbus Crohn ist durch ein diskontinuierliches Befallsmuster gekennzeichnet und kann sich im gesamten Gastrointestinaltrakt manifestieren. Histologisch finden sich massive Infiltrate mononukleärer Zellen in allen Schichten der Darmwand. Im Gegensatz dazu befällt die Kolitis ulcerosa ausschließlich das Kolon, wobei sich die Entzündung kontinuierlich ausbreitet und die Schwere der Inflammation von distal nach proximal abnimmt. Histologische Hauptmerkmale sind Kryptenabszesse und Epitheldysplasien sowie ein progredienter Verlust an Becherzellen. Ferner beschränkt sich das Entzündungsgeschehen auf die Mukosa; die Submukosa ist nicht pathologisch verändert.

Durch die hohe Stuhlfrequenz und die abdominelle Schmerzsymptomatik ist die Lebensqualität der CED-Patienten deutlich eingeschränkt. Ausserdem sind beide Erkrankungen langfristig mit einem erhöhten Risiko für Neoplasien assoziiert. Die derzeitigen Therapiestrategien beinhalten primär eine unspezifische Immunsuppression und führen nicht bei allen Patienten zum gewünschten Ziel.

Neben der Resorption von Nährstoffen und Wasser erfüllt der Gastrointestinaltrakt des Menschen eine ganze Reihe von weiteren Funktionen. Hierbei kommt der physiologischen Darmflora eine zentrale Bedeutung zu. Eine schon länger bekannte Funktion derselben besteht beispielsweise in der Produktion von lebenswichtigem Vitamin K, das der menschliche Organismus alleine nicht in ausreichender Menge erzeugen kann [1]. Aber auch die Entstehung von kurzkettigen Fettsäuren als Endprodukt der anaeroben, bakteriellen Fermentation ist wichtig, da Darmepithelzellen diese Fettsäuren als energielieferndes Stoffwechselsubstrat verwenden [2].

Etliche pathogene Mikroorganismen gelangen über den Darm als Eintrittspforte in den Wirtsorganismus. Darum ist es nicht verwunderlich, daß sich im Laufe der Evolution ein sehr komplexes Geflecht von Mechanismen zur Abwehr von Darmpathogenen herausgebildet hat. Außer den mechanischen Barrieren wie der Auskleidung der Mukosa mit Schleim und der chemischen Barriere der Magensäure [3] ist in diesem Zusammenhang vor allem das **Darmimmunsystem** (GALT; engl. *gut-associated lymphoid tissue*) zu nennen. Neben der Milz als zentralem, sekundärem Lymphorgan umfasst das GALT mehr lymphoide Zellen als jedes andere sekundäre Lymphorgan des Organismus [4]. Das GALT setzt sich aus Peyer-Plaques, intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und den diffus verteilten, primären Immunzellen der Lamina propria (**Lamina-propria-Lymphozyten**, LPL) (Kapitel 19 [8]) zusammen. Aber auch Zellen wie Enterozyten, die nicht primär dem GALT zugerechnet werden [5], scheinen Aufgaben bei der Immunabwehr wahrzunehmen [6, 7]. Trotz intensiver Forschung wird das GALT noch nicht in allen Details verstanden.

Nirgendwo sonst im Organismus befinden sich solch hohe Konzentrationen an körperfremder, potentiell antigener Substanz und so hohe Zahlen an Immunzellen so nahe beieinander wie im Kolon. Eine der herausragendsten Leistungen des GALT ist es, apathogene Mikroorganismen der Darmflora zu tolerieren und gleichzeitig Darmpathogene an der Invasion des Organismus zu hindern. Dies kann nur gelingen, wenn gleichzeitig regulatorische Mechanismen eine überschießende Immunreaktion verhindern und dennoch die Bereitschaft zur schnellen, adäquaten Immunantwort aufrechterhalten wird. Darum liegt die Vermutung nahe, daß sich das GALT im gesunden Organismus in einem sehr streng geregelten Gleichgewichtszustand befindet („physiologische Entzündung“) [4], die zu einer immunologischen Toleranz gegenüber der Darmflora führt.

Die Ursachen und Mechanismen, die zu CED als proinflammatorische Entgleisungen des GALT führen, sind bislang noch nicht ausreichend verstanden [8]. Sehr früh nach der ersten Beschreibung der CED vermutete man, daß es sich hierbei um infektiöse Erkrankungen durch bislang unbekannte Darmpathogene handelte [9, 10]. Da es trotz intensiver Suche jedoch nicht gelang, ein solches Pathogen zu isolieren, gilt diese Hypothese mittlerweile als überholt und man geht statt dessen davon aus, daß die Anwesenheit der normalen Darmflora ausreichend für die Entstehung der CED ist [11].

Die oft als **physiologische Darmflora** bezeichnete mikrobielle Population des Magen-Darmtraktes ist ein äußerst heterogenes Gemisch aus mehr als 400 verschiedenen Spezies [3]. Die exakte Zusammensetzung ist mannigfaltigen Einflüssen unterworfen und daher

keineswegs konstant [12]. Zwischen den verschiedenen Wirtsspezies, aber auch zwischen den Individuen einer Spezies bestehen beträchtliche Unterschiede [3]. Auch für ein einzelnes Individuum kann sich die Florakomposition ändern, was zum Beispiel für Säuglinge zum Zeitpunkt des Abstillens gut belegt ist [13].

Mittlerweile mehren sich die Berichte, daß auch die apathogene, physiologische Darmflora in immunologische Wechselwirkung mit dem Wirtsorganismus tritt. So kann man tiefgreifende Veränderungen immunologischer Parameter beobachten, wenn man zuvor KF-Tiere (KF = keimfrei) neu mit einer apathogenen, physiologischen Flora besiedelt. Diese Veränderungen manifestieren sich sowohl im GALT selbst [14-18], als auch in anderen peripheren Organen [19]. Daraus kann man folgern, daß die Normalflora neben der Verhinderung der Darmbesiedlung mit pathogenen Keimen [3] auch eine eher aktive, immunmodulatorische Rolle zukommt.

Studien haben gezeigt, daß sich die oben erwähnten Veränderungen immunologischer Parameter als Folge der Besiedlung des Darmes in Abhängigkeit von dem besiedelnden Keim qualitativ und quantitativ deutlich von einander unterscheiden können. Während zum Beispiel SFB (engl. *segmented filamentous bacteria*) eine sehr deutliche Immunstimulation auslösen, [20] bleiben andere Vertreter der Normalflora ohne nachweisbaren Einfluss auf die untersuchten Immunparameter [21].

Aufgrund der postulierten Rolle der Normalflora bei der Entstehung von CED führt dies zu einer Reevaluation der Bedeutung der Florazusammensetzung für CED. So erscheint es vorstellbar, daß normalerweise apathogene Keime im genetisch prädisponierten Individuum zu Induktoren der Inflammation werden. Darum ist die Untersuchung der immunmodulatorischen Funktion der Darmflora von großer Bedeutung, um deren Rolle für die Entstehung von CED zu definieren.

Die **klinische Bild der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen** ist durch intestinale und extraintestinale Manifestationen gekennzeichnet. Die Erstmanifestation beider Erkrankungen kann prinzipiell in jedem Alter auftreten, am häufigsten ist sie jedoch zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr. Beide Formen der CED sind durch Diarrhoe und abdominelle Schmerzen gekennzeichnet, die zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen. Daneben kann es aufgrund der gestörten Darmfunktion zu Mangelzuständen insbesondere an Vitaminen, Spurenelementen, Eiweiß und Flüssigkeit kommen. Beide Krankheitsbilder bergen die Gefahr von vital bedrohlichen

Komplikationen in sich. So kann die Kolitis ulcerosa beispielsweise einen akutfulminanten Verlauf mit Kolonperforation nehmen, und das Risiko, ein Koloncarcinom zu entwickeln, ist erhöht [22, 23]. Neben der lokalen Pathologie im Gastrointestinaltrakt sind beide Formen der CED häufig mit extraintestinalen Manifestationen assoziiert. Hierbei treten insbesondere Uveitis und Arthritis auf. Von großer klinischer Relevanz ist die primär sklerosierende Cholangitis, die zu einer Leberzirrhose führen kann, so daß eine Lebertransplantation erforderlich werden kann [24].

Therapie der CED besteht in der unspezifisch antiinflammatorischen Behandlung. In erster Linie kommen das Sulfonamid Sulfasalazin, beziehungsweise dessen wirksame Komponente 5-Aminosalicylat (5-ASA) zum Einsatz. Als stärker antiinflammatorische Agenzien werden ferner Glucocorticoide eingesetzt und für Ausnahmefälle stehen Immunsuppressiva wie Azathioprin und Methotrexat zur Verfügung [25]. Diätetische Therapiekonzepte im Sinne von Vermeidungsdiäten wurden von Zeit zu Zeit in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert. Ihre Wirksamkeit konnte jedoch nie eindeutig belegt werden [26, 27]. Erfolgsversprechender scheinen hier Ansätze einer mit ω 3-Fettsäuren angereicherten Diät zu sein, doch für eine endgültige Beurteilung liegen derzeit keine ausreichenden Daten vor [28, 29]. In sehr schweren Fällen kann man durch vorübergehende parenterale Ernährung bei ca. 60% der Patienten eine Remission erreichen [30]. Ferner befinden sich neuere, spezifischere Wege der Immunsuppression in der klinischen Prüfung oder sind vor kurzem zugelassen worden. Hier sind primär der gegen den Tumornekrosefaktor (TNF-) α gerichtete Antikörper *Infliximab* und die Therapie mit Interleukin-10 zu nennen (Übersicht in [31]). Ferner werden Antibiotika wie Metronidazol und Ciprofloxacin in der Rezidivprophylaxe eingesetzt [32, 33].

Trotz dieser mannigfaltigen Therapiemöglichkeiten gelingt die endgültige Heilung der CED-Patienten nicht, da die erreichte Remission der Entzündung nach einem mehr oder weniger langen Intervall von einem Rezidiv gefolgt wird. Die chirurgische Entfernung der betroffenen Abschnitte des Magen-Darmtraktes führt lediglich bei der Kolitis ulcerosa zur kompletten Ausheilung [25]. Beim Morbus Crohn dagegen entstehen häufig neue Entzündungsherde in vormals nicht betroffenen Arealen [34, 35]. Außerdem erweist sich das etablierte Arsenal antiinflammatorischer Pharmaka nicht selten als unzureichend.

Lange Zeit gestaltete sich die Untersuchung der CED sehr schwierig, da man in Ermangelung geeigneter Tiermodelle auf humanes Untersuchungsmaterial angewiesen war.

Seit Beginn der Neunziger Jahre wurden jedoch viele neue **Tiermodelle der CED** beschrieben, so daß sowohl die Erforschung der CED als auch des GALT große Fortschritte machen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über einige der derzeit publizierten Modelle für CED (modifiziert nach [36]):

Tabelle 1. Tiermodelle der CED

	Tiermodell	Einfluss der Mikroflora	Einfluss des genetischen Hintergrundes
Ätiologie	Agens/Defekt		
genetisch verändert	IL-2 ^{-/-}	ja	ja
	IL-10 ^{-/-}	ja	ja
	TGF-β1 ^{-/-}	unbekannt	ja
	TCRα oder β ^{-/-}	unbekannt	ja
	tg CD3ε26	unbekannt	unbekannt
	RAG-2 ^{-/-} mit <i>H.hepaticus</i> -Besiedlung	unbekannt	unbekannt
	tg HLA-B27/β ₂ microglobulin	unbekannt	ja
	tg IL-7	unbekannt	?
Zelltransfer	CD4 ⁺ CD45RB ^{Hi} => SCID-Maus	ja	unbekannt
Irritantien	Natrium-Dodecylsulfat (DSS)	unbekannt	ja
	Tri-Nitro-Benzoe-SulfonsäureTNBS	ja	unbekannt

- Erklärungen: - RAG (engl. *rearrangement activating genes*)
 - HLA (engl. *human leukocyte antigen*)
 - SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*)
 - TCR (engl. *T cell receptor*)
 - tg (transgen)

In den zuerst beschriebenen Modellen wurde die Darmentzündung zumeist durch irritierende Chemikalien wie TNBS und DSS induziert. Die größte Gruppe der Tiermodelle umfasst dagegen genetisch veränderte Organismen, die entweder transgen (tg) oder gendefizient ($^{-/-}$; „knockout“) sind. Ferner gibt es noch Zelltransfermodelle.

Gerade diese Vielfalt an Tiermodellen und das relativ einheitliche Bild der induzierten Darmentzündung implizieren, daß den CED vermutlich eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde liegt. Ferner unterstreicht dies, daß im GALT eine sehr fein austarierte immunologische Balance herrscht, die sehr sensibel gegenüber Störungen ist [8, 37].

Ein gängiges immunologisches Dogma unterteilt Immunreaktionen mit Beteiligung von T-Zellen in $T_{\text{Helfer-1}}$ und -2 (T_{H1} , bzw. T_{H2}) Typen. Diese Unterteilung orientiert sich an dem Muster der jeweiligen, von T-Helfer-Zellen vorwiegend produzierten Zytokine. Während T_{H1} -Antworten durch $\text{IFN-}\gamma$ dominiert werden und zu einer Makrophagen-abhängigen, zytotoxischen Reaktion führen, sind T_{H2} -Antworten primär mit IL-4 und der Generierung einer humoralen Immunantwort assoziiert [38].

Unter den verschiedenen Tiermodellen der CED finden sich primär solche, an denen T-Zellen maßgeblich beteiligt sind. Hier dominiert zumeist eine T_{H1} polarisierte Immunantwort [39-43]. Allerdings sind auch T_{H2} -Modelle [44, 45] und sogar T-Zell unabhängige Tiermodelle beschrieben worden [46, 47]. Auch beim Menschen scheint T-Zellen eine zentrale Rolle bei der CED zuzukommen. Studien zu den beteiligten Zytokinen ergaben für den Morbus Crohn einen T_{H1} -Typ [48, 49]. Dagegen ist die Datenlage für die Kolitis ulcerosa nicht ganz eindeutig. Am ehesten scheint hier IL-5 zu dominieren [50, 51].

Das **CED-Modell der IL-2 defizienten Maus** ($\text{IL-2}^{-/-}$) wurde eher zufällig entdeckt. IL-2 ist als zentraler Wachstumsfaktor des Immunsystems bekannt, der seine Wirkung auf sehr viele verschiedene Immunzellen ausübt [52]. Für ein besseres Verständnis der in-vivo Rolle von IL-2 wurde 1991 eine für das IL-2 Gen defiziente Maus generiert. Diese Tiere zeigen eine gesteigerte Aktivierung des Immunsystems, die sich in einer starken Vergrößerung der sekundären Lymphorgane (Lymphknoten; Milz) manifestiert. Während man in der ersten Studie dieser Maus keine signifikanten Defekte in der Abwehr von Mikroorganismen feststellen konnte [53], sollten noch zwei weitere Jahre vergehen, bis man schließlich die Kolitis in diesen Mäusen entdeckte [54]. Weitere Arbeiten ergaben, daß auch in diesem Modell T-Zellen für die Entstehung der Kolitis unerlässlich sind [55]. Diese Aussage konnte durch Generierung von IL-2 x β_2 microglobulin doppeldefizienten Mäusen

weiter auf CD4⁺ T_H1-Helfer-Zellen eingengt werden [56]. Das Muster der beteiligten Zytokine ist vom T_H1-Typ und entspricht somit eher dem Morbus Crohn des Menschen [39]. Die Lokalisation und Histologie der Entzündung entspricht dagegen eher der Kolitis ulcerosa [54].

Am Modell der IL-2^{-/-} Maus wurden zwei grundlegende Beobachtungen gemacht, die Befunden am Menschen entsprechen. Zum einen variiert die Schwere der Erkrankung der IL-2^{-/-} Mäuse in Abhängigkeit von dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes [57] und zum anderen entwickeln IL-2^{-/-} KF-Mäuse keine oder nur eine sehr abgeschwächte Form der Kolitis [54, 58]. Dies deutet darauf hin, daß neben der Dysregulation des Immunsystems (IL-2 Defizienz) die Entstehung der Darmentzündung von zwei weiteren Faktoren maßgeblich beeinflusst wird:

- genetische Prädisposition
- Darmflora

Ganz ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen CED-Tiermodellen berichtet [8]. Ebenso finden sich entsprechende Indizien auch beim Menschen. So treten chronisch-entzündliche Darmerkrankungen familiär gehäuft auf [59]. Außerdem ist die Korrelation zwischen Allelen des HLA-Lokus und der Inzidenz von Morbus Crohn offensichtlich und zu einem gerne zitierten Schulbeispiel für die Erfolge der Genetik geworden [5, 60]. Desweiteren belegen die therapeutischen Erfolge bestimmter Antibiotika [32, 33], parenteraler Ernährung und transients Ableitung des Fäzestromes [61] eine Beteiligung der Flora. All diese Beobachtungen wurden zur folgenden, allgemein akzeptierten **Arbeitshypothese zur Entstehung von CED** zusammengefasst:

”Im Verlauf von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kommt es im genetisch prädisponierten Individuum zu einem Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber der physiologischen Darmflora [42, 43, 62-65]“.

Für die IL-2^{-/-} Maus wurde gezeigt, daß sowohl die Darmflora, als auch die Präsenz von T_H1-Helfer-Zellen für die Entstehung der Kolitis unerlässlich sind, liegt also die Vermutung nahe, daß die Toleranz von T-Zellen gegenüber den Floraantigenen in der Kolitis dieser Tiere verloren geht. Doch erst die exakte Kenntniss sowohl der Rolle der T-Zellen in der

Kolitis der IL-2^{-/-} Maus als auch der die Kolitis induzierenden Vertreter der physiologischen Darmflora ermöglichen die Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte, um die Behandlungsmöglichkeiten von CED zu verbessern. Darum wurde in der vorliegenden Arbeit den folgenden **Fragestellungen** nachgegangen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am CED-Modell der IL-2^{-/-} Maus die Rolle der intestinalen T-Zellen und der Darmflora in der Kolitis dieser Tiere zu untersuchen.

Um die Rolle der T-Zellen im untersuchten Tiermodell der CED besser zu verstehen, wurde die Genexpression der an der Entzündungsreaktion beteiligten Zytokine unter SPF- und KF-Zuchtbedingungen untersucht (SPF, *specific pathogen-free*; KF, keimfrei). Daraus sollten sich Rückschlüsse auf den Einfluss der Nahrung und der bakteriellen Darmflora auf die Kolitisentstehung ziehen lassen. Durchflusszytometrische Untersuchungen sollten Aufschluss über die an der Vermittlung der Inflammation beteiligten T-Zellen geben. Die Beteiligung der T-Zellen am Entzündungsgeschehen wurde durch die Analyse des Migrationsverhaltens dieser Zellen unter SPF- und KF-Bedingungen weiter charakterisiert. Die Erfolgsaussichten einer neuartigen therapeutischen Intervention im Prozess der Lymphozytenrekrutierung in das entzündete Kolon wurden durch die in-vivo Blockade von potentiell an der T-Zellmigration beteiligten Adhäsionsmoleküle ausgelotet.

Mit dem Ziel des tieferen Verständnisses der Wechselwirkungen von Darmflora und intestinalen T-Zellen wurde die Reaktivität dieser Zellen gegenüber Antigenen der physiologischen Flora in-vitro untersucht. In-vivo Studien zur Übertragbarkeit der Kolitis durch Flora-spezifische T-Zelllinien, die ausgehend von intestinalen T-Zellen etabliert wurden, sollten diese Daten vervollständigen. Die hieraus gewonnen Erkenntnisse zur Stellung von T-Zellen in der Pathogenese der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus sollten Aufschluss geben über die Initiierung der Kolitis.

Im zweiten Teil der Studie wurde die Frage untersucht, welcher Vertreter der bakteriellen Darmflora wie stark zur Kolitis-induzierenden Rolle der Darmflora beiträgt. Zu diesem Zweck wurde durch kontrollierte Besiedlung von IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen mit einem oder zwei Vertretern der physiologischen Darmflora („gnotobiotische Zucht“) die Beteiligung verschiedener Keime der physiologischen Darmflora an der Entstehung der Kolitis analysiert. Es wurden solche apathogene Keime aus der Darmflora SPF-gehaltener Mäuse isoliert und für die gnotobiotische Besiedlung verwendet, für die in der Literatur Kolitis-induzierende Eigenschaften beschrieben wurden (*Bacteroides vulgatus*) und solche,

die im Sinne einer probiotischen Therapie der CED eingesetzt werden (*Escherichia coli*). Die Ergebnisse sollten es erlauben, die kolitogene Potenz verschiedener Keime der Normalflora am CED-Modell der IL-2^{-/-} Maus zu beurteilen. Dies könnte der gezielten Beeinflussung der Darmflora als neuartiges Therapiekonzept den Weg ebnen.

2. Methoden

2.1 Tiere und Zuchtbedingungen

2.1.1 Spezifisch-pathogenfreie Zucht (SPF)

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrollierten SPF-Bedingungen. Die Mäuse waren in Plexiglaskäfigen in einem IVC-Gestell (engl. *individually ventilated cages*) untergebracht, die mit 50 mbar Überdruck ventiliert wurden. Der Käfigboden war mit autoklaviertem, handelsüblichen Einstreu bedeckt. Die Ernährung der Mäuse erfolgte mit unbegrenzt und frei zugänglichem, autoklaviertem Granulatfutter und autoklaviertem Wasser. Sowohl das Einstreu, als auch das Futter und das Trinkwasser wurde im wöchentlichen Rhythmus erneuert. Raumtemperatur (20-23°C) und relative Luftfeuchtigkeit (50-55% rL) wurden konstant gehalten.

Die Abwesenheit von Mauspathogenen wurde regelmäßig kontrolliert. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt.

Als Zuchttiere wurden heterozygote Erbträger der inaktivierenden Mutation des Interleukin-2 Gens verpaart. Die Nachkommen dieser Tiere wurden durch Nachweis der Mutation in genomischer DNA genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte wie beschrieben [⁵⁴].

2.1.2 Gnotobiotische und keimfreie (KF) Zucht

Die Aufzucht von KF-Mäusen erfolgte im Tierforschungszentrum der Universität Ulm. Die Ausgangstiere dieser Zucht wurden per Kaiserschnitt aseptisch entbunden und in sterilen flexiblen Isolatoren großgezogen. Die Zucht und Verpaarung der Nachkommen erfolgte ebenfalls in sterilen Isolatoren. Die Isolatoren wurden mit partikelfreier Luft (HEPA-Filter) ventiliert. Die Abwesenheit anzüchtbarer Mikroorganismen wurde alle zwei Wochen routinemäßig kontrolliert.

Das Einbringen und Herausholen von Material (Einstreu, Futter, Wasser, Geräte, etc.) in die Isolatoren geschah durch ein Schleusensystem, wobei das zuvor autoklavierte Material in der Schleuse mit Peressigsäure oberflächendesinfiziert wurde.

Der Genotyp der Tiere wurde auf dieselbe Weise bestimmt wie unter 2.1.1. beschrieben.

Zum Zweck der kontrollierten Besiedlung der Mäuse mit einer oder mehreren Bakterienspezies („gnotobiotische Zucht“) wurden die in München hergestellten (2.7.) Bakteriensuspensionen auf Trockeneis nach Ulm überführt, dort in den jeweiligen Isolator eingeschleust und den Zuchttieren oral verabreicht. Wie zu erwarten, übertrug sich die Flora auf die Nachkommen. Der Erfolg der Besiedlung wurde im Rahmen der regelmäßigen mikrobiologischen Kontrollen bestätigt. Bei den Versuchstieren wurde zusätzlich eine quantitative und qualitative Bestimmung der Stuhlflora der Tiere zum Todeszeitpunkt vorgenommen. Im Fall monoassoziierter Tiere wurde auch eine spezifische Amplifikation und Sequenzierung eubakterieller 16s-rRNA aus Fäzes durchgeführt (s. 2.13 und 3.5).

Für Experimente wurden ausschließlich die Nachkommen der oral inokkulierten Tiere verwendet, die von Geburt an im Kontakt zur jeweiligen Flora standen.

2.2 Analyse der Genexpression

2.2.1 Isolation von RNA aus Darmgewebe

Kolon (inklusive Caecum) und der komplette Dünndarm der Tiere wurden separat entnommen, von anhängendem Bindegewebe befreit, quer in 5 mm lange Stücke zerschnitten und in 3, bzw. 5 ml TRIZOL-Reagenz gegeben. Durch Zerreiben der Gewebstücke mit einem Spritzenstempel und jeweils zweimalige Passage durch Kanülen von 1,2 und 0,55 mm Durchmesser wurde das Gewebe in TRIZOL homogenisiert. Daraufhin wurde das Homogenisat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zum Zweck der RNA-Extraktion wurden 0,75 ml dieses Homogenisates pro Ansatz mit 0,15 ml Chloroform versetzt. Die weitere Vorgehensweise geht aus den Anweisungen des Herstellers von TRIZOL-Reagenz hervor. Das daraus resultierende RNA-Pellet wurde je nach Größe in 40 – 80 μl DEPC-Wasser durch Erhitzen auf $57,5^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten gelöst. Der Gehalt an Nukleinsäure wurde UV-photometrisch bei 260 und 280 nm ermittelt und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 [\mu\text{g/ml}] \times F \times V [\mu\text{l}] \div 1000[\mu\text{l}] = C [\mu\text{g/ml}]$$

OD optische Dichte (Extinktion) bei 260 nm

F Verdünnungsfaktor

V	Probenvolumen
C	Nukleinsäurekonzentration

2.2.2 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription wurde durchgeführt wie bereits beschrieben [39]. Dabei wurde durch die Verwendung eines Oligo-dT-Primers sichergestellt, daß ausschließlich *messenger*RNA (mRNA) revers transkribiert wurde. Das Reaktionsprodukt ist ein Hybrid aus RNA und DNA und wird als *copy*DNA (cDNA) bezeichnet.

2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR)

5 µl der cDNA-Lösung wurden mit folgender Lösung auf 50 µl Reaktionsvolumen eingestellt. Dieses Gemisch enthielt 1 U Taq DNA-Polymerase *Ampli*Taq, 200 mM dNTP (*desoxy*Nukleotid-Triphosphat), 20 pmol 5' and 3' Primer und Taq DNA-Polymerase Puffer. Die spezifische Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragmentes erfolgte in einem Thermocycler. Die für das jeweilige Primerpaar optimierten PCR-Bedingungen sowie die Primersequenzen gehen aus folgender Tabelle hervor:

Tabelle 2. Oligonukleotid-Primer für die PCR

CDNA-Fragment	Sequenz	Denaturation	Annealing	Extension
β -actin	sense TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C antisense TAA AAT GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	30s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
IL-1 α	sense CTC TAG AGC ACC ATG CTA CAG AC antisense TGG AAT CCA GGG GAA ACA CTG	30s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
IL-1 β	sense TCA TGG GAT GAT GAT AAC CTG CT antisense CCC ATA CTT TAG GAA GAC ACG GAT T	30s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
TNF- α	Sense AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A antisense ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T	30s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
IFN- γ	Sense TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG antisense TGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG	30s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
IL-12p35	sense GGC TAC TAG AGA GAC TTC TTC C antisense GTG AAG CAG GAT GCA GAG CTT C	60s / 94°C	60s / 60°C	90s / 72°C
IL-12p40	sense GTG AAG CAC CAA ATT ACT CCG G antisenseSGCT TCA TCA TCT GCA AGT TCT TGG G	60s / 94°C	60s / 55°C	90s / 72°C
IL-7	Sense GCC TGT CAC ATC ATC TGA GTG CC antisense CAG GAG GCA TCC AGG AAC TTC TG	45s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
IL-7R	sense CCC CAT AAC GAT TAC TTC AAA GGC TTC TGG antisense AGA GTT TGG CAG CAA GTC TTG ATA CAC AGG	45s / 94°C	45s / 60°C	60s / 72°C
IL-10	sense ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA antisense CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	45s / 94°C	60s / 64°C	90s / 72°C

Die Auswertung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung von je 20 μ l des Reaktionsproduktes der PCR auf einem 2 %igen Agarosegel, das 100 ng/ml des DNA-Farbstoffes Ethidiumbromid enthielt. Die Gele wurden daraufhin unter ultravioletter Beleuchtung fotografiert. Die Übereinstimmung der Molekülgröße des tatsächlich amplifizierten cDNA-Fragmentes mit dem für das jeweilige Primerpaar erwarteten Wert wurde mit einer DNA-Basenleiter als interner Standard kontrolliert. Die Zyklenzahl wurde für jeden Satz an gemeinsam amplifizierten Proben individuell

so gewählt, daß möglichst alle Proben auf dem Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel unter UV-Beleuchtung sichtbare Banden ergaben.

Alle Proben, die unmittelbar miteinander verglichen wurden, wurden gemeinsam amplifiziert und ausgewertet, um artifizielle Variationen in der Amplifikation zu minimieren.

2.2.4 Quantitative Analyse der PCR-Amplifikate

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde von den Gelen ein elektronisches Abbild erstellt. Dies geschah unter Verwendung der Geldokumentationsanlage *Fluoro-S-Multiimager*. Mit der integrierten Software *MultyAnalyst* wurden die sichtbaren Banden markiert und unter Subtraktion des lokalen, umgebenden Fluoreszenzsignales die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Bande ermittelt. Dieser Zahlenwert verhält sich innerhalb eines linearen Bereiches von Faktor 30 proportional zur Menge an Nukleinsäure der analysierten Bande.

2.2.5 Semi-quantitative Analyse der Genexpression

Die Vergleichbarkeit der PCR-Produkte verschiedener Proben ist daran geknüpft, daß die als Matrix für die PCR dienende cDNA ähnliche Mengen an intakter Nukleinsäure enthält. Da die photometrische Vermessung der RNA-Isolate nicht zwischen intakter und degradierter Nukleinsäure differenzieren kann und da trotz größter Sorgfalt bei der Reversen Transkription Variationen zwischen den zu vergleichenden Proben auftreten können, gelten PCR-Amplifikate von verschiedenen Proben erst dann als direkt vergleichbar, wenn gezeigt wurde, daß ein sogenanntes *housekeeping –gene* der zu vergleichenden Proben in der PCR gleiche Mengen an Amplifikat liefert. In dieser Arbeit fungierte β -Aktin als ein solcher interner Standard.

Zur Korrektur geringer Abweichungen der β -Aktin Amplifikate wurde der Quotient aus dem Fluoreszenzsignal (2.2.4.) des jeweiligen Zytokines und von β -Aktin gebildet. Dieser Wert wurde als Maß für die Genexpression des jeweiligen Gens herangezogen. Da allerdings die Linearität der PCR-Reaktion selbst in der vorliegenden Arbeit nicht kontrolliert wurde, werden die Resultate als semi-quantitativ betrachtet.

2.3 Lymphoide Zellen

2.3.1 Isolation der Zellen zur Zellkultur

2.3.1.1 Aus Darmgewebe

Um ausreichende Zellausbeuten zu erhalten, wurden pro Versuch drei bis fünf Mäuse zusammen verarbeitet. Dünn- und Dickdarm (inkl. Caecum) wurden entnommen und die Peyer-Plaques des Dünndarmes entfernt. Die Därme wurden längs geöffnet, vorsichtig von Fäzes befreit, in 5mm große Stücke zerteilt und in RPMI 1640/Click's Medium (wird fortan als „Click's“ bezeichnet) aufgenommen (4°C). Die Gewebstücke wurden mit HBSS (engl. *Hank's balanced salt solution*) gewaschen, mit HBSS 1mM DTT unter Rühren inkubiert und erneut gewaschen. Mit leichten Modifikationen wurde das Protokoll von Davies [⁶⁶] zum Verdau des Epithels und der Lamina propria angewendet. Die Auflösung des epithelialen Zellverbandes geschieht hierbei durch das Einwirken von EDTA, wogegen die Lamina propria durch Kollagenasen und Hyaluronidase verdaut wird. Die freigesetzten lymphoiden Zellen wurden durch Dichtenzentrifugation über einen diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten angereichert (s.2.3.3) und in Click's suspendiert (4°C). Fortan werden die so aus dem Epithel gewonnen Zellen als „intraepitheliale Lymphozyten“ (IEL) und die aus der Lamina propria isolierten Zellen als „Lamina-propria-Lymphozyten“ (LPL) bezeichnet.

2.3.1.2 Aus mesenterialen Lymphknoten

Die mesenterialen Lymphknoten von drei bis fünf Mäusen wurden präpariert und gemeinsam in Click's aufgenommen (4°C). Die Lymphknoten wurden durch Passage durch ein handelsübliches, sterilisiertes Teesieb homogenisiert und gewaschen. Verunreinigende Erythrozyten wurden durch osmotische Lyse entfernt (0,15M NH₄Cl, 2 Minuten; RT = Raumtemperatur), die Zellsuspension gewaschen und die Zellen in Click's aufgenommen. Die so gewonnen Zellen werden fortan als mLNC bezeichnet (engl. *mesenteric lymph node cells*)

2.3.1.3 Aus der Milz

Die Milzen wurden zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet wie für mesenteriale Lymphknoten beschrieben (2.3.1.2). Im Gegensatz zu den Lymphknoten wurden die Milzen verschiedener Tiere jedoch nicht zusammen, sondern individuell verarbeitet.

2.3.1.4 Antigenpräsentierende Zellen (APZ)

Als antigenpräsentierende Zellen wurden Milzzellen (2.3.1.3) von heterozygoten Trägern der Mutation des IL-2 Genes eingesetzt. Die Präparation erfolgte wie oben beschrieben. Die Zellen wurden durch γ -Bestrahlung (3500rad) teilungsunfähig gemacht.

2.3.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte durch Auszählen von 4 Feldern einer Neubauerschen Zählkammer. Zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen wurde Trypanblau hinzugesetzt. Für die Dauer der Zählung dringt dieser Farbstoff nicht in vitale Zellen ein. Es wurden gemäß ihrer morphologischen Merkmale lymphoide Zellen gezählt.

2.3.3 Unspezifische Anreicherung von lymphoiden Zellen (Percoll-Dichtenzentrifugation)

Die aufzureinigende Zellsuspension wurde in einer isotonischen Percoll-Lösung der Dichte 1,055 g/ml (Percoll_{1,055}) suspendiert und unter Vermeidung einer Phasenmischung auf Percoll_{1,085} geschichtet. Die Trennung der suspendierten Zellen gemäß ihrer Dichte erfolgte durch Zentrifugation (560g; 20 Minuten; RT). Lymphoide Zellen reicherteten sich hierbei zwischen den beiden Phasen an und wurden separat abgenommen.

2.3.4 Spezifische Depletion von CD4⁺ Zellen (Panning)

In einigen Experimenten wurden mittels Panning spezifisch CD4⁺ Zellen innerhalb der mLNC und LPL depletiert. Hierbei wurde der weiter unten bezeichnete anti-CD4 mAb YTL169 verwendet. Wahlweise wurde wie unten (2.10.1) beschrieben mit Primär- und Sekundärantikörper gearbeitet oder es wurden als feste Phase direkt mit diesem mAb beschichtete Petrischalen eingesetzt.

2.4 Kultivierung lymphoider Zellen

2.4.1 Zellkulturbedingungen

Lymphoide Zellen (IEL, LPL, mLNC, Milzzellen) wurden in einer Endkonzentration von 1×10^6 /ml zusammen mit 2×10^6 /ml APZ in Zellkulturmedium Click's kultiviert (37°C, 100% rel.Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂). Das Zellkulturvolumen betrug zur Proliferationsmessung (2.4.3) 200µl und zur Gewinnung von Zellkulturüberständen (2.4.2) 1 oder 2ml pro Ansatz.

2.4.1.1 In-vitro Blockade von Interleukin-10

Die biologische Aktivität von Interleukin-10 wurde in einigen Experimenten durch den Zusatz von 0,0125 µg/ml des anti-IL-10 mAb (R&D-Systems) neutralisiert. Gemäß Herstellerangaben reichen 0,005 – 0,015 µg/ml dieses monoklonalen Antikörpers aus, um die biologische Aktivität von 2.500 pg/ml IL-10 um 50% zu inhibieren. Diese IL-10 Menge wurde in den entsprechenden Restimulationsexperimenten nicht erreicht.

2.4.1.2 In-vitro Blockade von Lipopolysacchariden (LPS) durch Polymyxin B

Durch den Zusatz von Polymyxin B (10 µg/ml) wurden eventuell vorhandene Lipopolysaccharide (LPS) komplexiert und damit inaktiviert.

2.4.2 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Nach 44 und 70 Stunden Inkubation wurden unter Vermeidung von Partikelaspiration verschiedene Volumina der Zellkulturmediums steril abgenommen und aliquotiert bei –20°C gelagert.

2.5 Funktionelle Analysen der kultivierten Zellen

2.5.1 Bestimmung der Zellproliferation

Nach 48 Stunden (Positivkontrollen mit Concanavalin A oder anti-CD3 mAb), bzw. 72 Stunden (Antigene) wurden pro Zellkulturansatz 20µl tritierter (³H)-Thymidinlösung (50µCi/ml) hinzugegeben und die Inkubation für weitere 8 Stunden

fortgeführt. Die Zellen wurden mit einem Cell-Harvester auf Glasfasermatten überführt, Szintillationswachs aufgeschmolzen und die in die Zellen inkorporierte Radioaktivität als Szintillationssignal gemessen. Hierbei verhält sich der ³H-Thymidineinbau proportional zur Nukleinsäuresynthese und zur Zellproliferation. Alle Bestimmungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.5.2 Quantitative Bestimmung sekretierter Zytokine im Zellkulturüberstand

2.5.2.1 Bestimmung der Proteinmenge mit ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Die eingesetzten ELISA wurden mit einem plattengebundenem Primärantikörper und einem zweiten, biotinylierten Antikörper gemäß Standardverfahren durchgeführt (Sandwich-Technik). Die Detektion erfolgte mit Avidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase und dem Substrat pNPP (*p*-Nitro-Phenylphosphat). Das gelbe Reaktionsprodukt wurde photometrisch (490 nm) detektiert. Die Quantifizierung der nachgewiesenen Proteinmenge erfolgte anhand einer Eichgeraden. Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die verwendeten Paare monoklonaler Antikörper sind im folgenden aufgelistet:

Tabelle 3. ELISA zum quantitativen Zytokinnachweis

Zytokin	Antikörper (primär/sekundär)	Herkunft	Nachweisgrenze
Interferon-gamma (IFN γ)	AN18 / R46A2	Eigenproduktion	1 ng/ml
Interleukin-5 (IL-5)	Keine Angabe	Endogen, Eching, Deutschland	5 pg/ml
Interleukin-10 (IL-10)	Jess052A5 / polyklonal Ziege Ig G	R&D-systems	30 pg/ml
Transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1)	9016.2 / polyklonal Huhn Ig Y	R&D-systems	30 pg/ml

2.5.2.2 Bestimmung der Bioaktivität mit Bioassays

Die biologische Aktivität von Interleukin-4 wurde anhand der wachstumsfördernden Wirkung dieses Zytokins auf die Myelomzelllinie CT4S bestimmt [67]. Es wurden hierzu 5×10^3 Zellen pro Ansatz mit Zellkulturüberstand in einem Gesamtvolumen von 60 μ l ausgesät und nach zwei Tagen Inkubation mit 10 μ l Thymidinlösung (25 μ Ci/ml) versetzt und für weitere 8 Stunden kultiviert. Ansonsten entsprach die

Vorgehensweise der Bestimmung der Zellproliferation (2.5.1). Berechnung gemäß Eichgerade, Nachweisgrenze 0,5 U/ml

2.6. Durchflusszytometrische Zellanalyse mit FACS (engl.: *fluorescent-activated cell sorting*)

2.6.1 Färbeprozedur

Pro Färbung wurden 1×10^6 lymphoide Zellen eingesetzt. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen zur Blockade unspezifischer Antikörperbindung 10 Minuten mit einem anti-FcR mAb (anti-CD16/32) vorinkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper hinzugegeben, nach der Inkubationszeit (30 Minuten, 4°C) wurden die Zellen gewaschen und ggf. mit Streptavidin-CyChrome-Konjugat behandelt (30 Minuten, 4°C).

2.6.2 Monoklonale Antikörper (engl.: *monoclonal antibodies*; mAb)

Zur Analyse wurden die Zellen in 1ml PBS suspendiert und vermessen. Folgende Antikörper kamen zum Einsatz:

Tabelle 4. Monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie

Murines Epitop	Funktion	Hybridom	Herkunft
CD3	Kostimulation	145c211	Eigenproduktion; Pharmingen
CD4	Kostimulation	YTL191 GK1.5	Eigenproduktion, Pharmingen
CD8	Kostimulation	YTL169	Eigenproduktion
$\alpha\beta$ TCR	Primärstimulation	5759721	Eigenproduktion
$\gamma\delta$ TCR	Primärstimulation	GL.3	Eigenproduktion
CD 16/32	Fc-Rezeptor	2.4G2	Pharmingen
CD25	IL-2 Rezeptor	PC 61	Eigenproduktion
CD69	Unbekannt	H1.2F3	Pharmingen
$\alpha_4\beta_7$ -Integrin	Adhäsion	PS 2.3	Eigenproduktion
$\alpha_1\beta_7$ -Integrin	Adhäsion	FD 18.5	Eigenproduktion
Immunglobulin	B-Zellrezeptor	anti-MausIg, (polyklonal)	Becton & Dickinson
CD45R/B220	Signaltransduktion	RA3-6B2	Pharmingen
Mac-1	Adhäsion	M1.70	Eigenproduktion

Zur Detektion waren diese Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen *Phycoerythrin* (PE) oder *Flouresceinisothiocyanat* (FITC) konjugiert. Zusätzlich wurden biotinylierte Antikörper verwendet, welche mit dem Sekundärreagenz Streptavidin-CyChrome detektiert wurden.

2.6.3 Computergestützte Auswertung

Aufgrund der charakteristischen Lichtstreuung (engl. *forward / sideward scatter*) wurden die entsprechenden Lymphozytenpopulationen identifiziert und ihre Oberflächenexpression der jeweiligen Epitope analysiert. Zur Erkennung von toten Zellen wurde der interkalierende Farbstoff Propidiumiodid hinzugefügt und alle hierbei gefärbten Zellen (= tote Zellen) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zur selektiven Untersuchung von T-Zellen wurden ferner nur jene Zellen berücksichtigt, die durch den anti-CD3 mAb erkannt wurden.

2.7 Bakterielle Zellkultur

2.7.1 Bakterielle Spezies

Folgende bakterielle Spezies wurden aus Stuhl von SPF-Mäusen isoliert:

Escherichia coli (McConkeyII-Agar; 37°C; aerob)

Bacteroides vulgatus (SchädlerKV-Agar; 37°C; anaerob)

Clostridium innocuum, *Cl. aff. clostridiiformis*. und *Cl. viride* (*Cl.difficile*-Selektivagar; 37°C; anaerob)

Die Isolation erfolgte durch Suspension von aseptisch gewonnenen Mausstuhl in LB-Medium und Ausplattung der Suspension auf den angegebenen Agarplatten. Einzelne Kolonien entsprechender Morphologie wurden isoliert und mikroskopisch, biochemisch und anhand ihrer 16s-rRNA Sequenz identifiziert (s.2.7.3.)

2.7.2 Kulturbedingungen

E.coli: Zur quantitativen und qualitativen Analyse wurde *E.coli* auf Blutagar und McConkeyII-Agar bei 37°C aerob kultiviert.

Zur Gewinnung von Vorräten zur Lagerung und zur oralen Inokkulation von gnotobiotischen Mäusen wurde *E.coli* aerob bei 37°C in Flüssigkultur (LB-

Medium) unter horizontalem Schütteln (200 Rotationen / Minute) angezüchtet. Die Kultur wurde über Nacht inkubiert und am folgenden Tag 1:5 mit Medium verdünnt und für weitere drei Stunden inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation, Waschen mit PBS und Resuspendieren der Bakterien in LB-Medium mit 20%igen Zusatz von Glycerol. Diese Suspension wurde sofort aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Bacteroides vulgatus: Zur quantitativen und qualitativen Analyse wurde *B.vulgatus* auf Schädler- und SchädlerKV-Agar bei 37°C anaerob kultiviert.

Zur Gewinnung von Vorräten zur Lagerung und zur oralen Inokkulation von gnotobiotischen Mäusen wurde *B.vulgatus* anaerob bei 37°C in Flüssigkultur (Thioglykolat-Medium) unter horizontalem Schütteln (200 Rotationen / Minute) angezüchtet. Die Kultur wurde über Nacht inkubiert und am folgenden Tag 1:5 mit Medium verdünnt und für weitere drei Stunden inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation, Waschen mit PBS und Resuspendieren der Bakterien in Thioglykolat-Medium mit 20%igen Zusatz von Glycerol. Diese Suspension wurde sofort aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Clostridium spp.: Zur quantitativen und qualitativen Analyse wurden Clostridien auf Blutagar und Clostridium difficile-Selektivagar bei 37°C anaerob kultiviert.

Zur Gewinnung von Vorräten zur Lagerung und zur oralen Inokkulation von gnotobiotischen Mäusen wurden die Clostridien in Thioglykolat-Medium anaerob bei 37°C) unter horizontalem Schütteln (200 Rotationen / Minute) angezüchtet. Die Ernte und Konservierung der Bakterien wurde wie bei *B.vulgatus* beschrieben durchgeführt.

Vor der Gefrierkonservierung der angezüchteten Bakterien wurden Ausplattungen für die Identitäts- und Reinheitskontrolle angefertigt.

2.7.3 Identitäts- und Reinheitskontrollen

Die Identifizierung der Bakterien erfolgte nach folgenden Methoden:

- E.coli*: - gram-Färbung (gram negative, kurze Stäbchen)
- Biochemische Reaktionen ("kleine bunte Reihe"; API 20E)
- Sequenzierung eines hypervariablen Abschnittes der 16S-rRNA

- B.vulgatus*: - kein aerobes Wachstum, aber Wachstum auf Schädler- KV-Agar
- gram-Färbung (gram negative, dünne Stäbchen)
- Sequenzierung eines hypervariablen Abschnittes der 16s-rRNA

- Clostridium* spp: - kein aerobes Wachstum
- gram-Färbung (gram positive, dünne Stäbchen)
- Sequenzierung eines hypervariablen Abschnittes der 16s-rRNA

Die einzelnen Nachweismethoden werden in Abschnitt 2.15 erläutert.

2.7.4 Herstellung von antigenen Präparationen

2.7.4.1 CBA (engl. *colonic bacterial antigen*)

Der Dickdarminhalt (Kolon und Caecum) von 20 SPF-Mäusen wurde in 5 ml PBS (4°C) aufgenommen, mit 100 µg/ml DNase versetzt und 5 Minuten lang unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt. Nachfolgend wurden Partikel durch Zentrifugation abgetrennt und der klare Überstand durch Filtration sterilisiert (0,22 µm Porengröße). Die Lagerung erfolgte aliquotiert bei -20°C. Die Sterilität wurde durch Ausplattung von je 100 µl auf Blutagarplatten bestätigt (aerobe und anaerobe Bebrütung bei 37°C).

2.7.4.2 Hitze-getöteter *Bacteroides vulgatus* (engl. heat-killed; HK-*B.vulgatus*)

Aus Fäzes von SPF-Mäusen isolierter *B.vulgatus* wurde auf Blutagarplatten über 48 Stunden angezüchtet (37°C / anaerob), mit einem Glasspatel von den Platten gelöst, in PBS (engl. *phosphate buffered saline*) resuspendiert und durch ein Zellsieb (70 µm Porengröße) gegeben.

Diese Suspension wurde 2 Stunden auf 60°C erhitzt und danach bei -20°C gelagert. Die Sterilität und Reinheit dieser Präparation wurde durch Ausplattung auf Agarplatten vor und nach der Hitzeinaktivierung bestätigt.

2.7.5. quantitative Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wurde photometrisch (595 nm) nach der Methode von Bradford bestimmt. Diese Methode beruht auf der Proteinfärbung mit Coomassie-Blau und Vergleich der Meßwerte mit einer BSA-Standardgeraden (*bovine serum albumin*).

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 Konservierung des Gewebes

Ein 3-5 mm langer Darmabschnitt wurde präpariert, eventuell vorhandener Darminhalt vorsichtig herausgeschoben, das Gewebe in TissueTek eingebettet und in flüssigem Stickstoff ($N_2 \text{ liq}$) schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.8.2 Gefrierschnitte (Kryotomie)

An einem Kryotom wurden bei -25°C die gefrorenen $5 \mu\text{m}$ Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet, in Aceton (-20°C) fixiert (10 Minuten) und bei -20°C gelagert.

2.8.3 Histologische Färbung mit Haematoxylin & Eosin (HE-Färbung)

Die Gefrierschnitte wurden erneut in Aceton fixiert (s.o.), bei Raumtemperatur luftgetrocknet und daraufhin gemäß Standardprozedur gefärbt.

2.9 Untersuchung der Lokalisation von Bakterien im Darm mittels FISH-Technologie (fluorescence in-situ hybridization)

2.9.1 Konservierung des Gewebes

Die Darmstücke wurden präpariert wie oben beschrieben (2.8.1.), über Nacht in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert (PFA; 4°C), mit PBS gewaschen und in TissueTek eingebettet wie oben beschrieben (2.8.1.).

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte siehe (s.2.8.2.).

2.9.2 Positivkontrollen

Bakterien der nachzuweisenden Spezies wurden in Flüssigmedien wie oben beschrieben (2.7.2.) angezüchtet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit Aliquots der Kultur abgenommen und ihre $OD_{600\text{nm}}$ ($OD = \text{optische Dichte}$) bestimmt. Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 4% PFA fixiert (2.10.1.) und in Ethanol/Wasser 1:1 suspendiert bei -20°C gelagert

2.9.3 Färbeprozedur

10 µl der Bakteriensuspension (Kontrolle) wurden pro Färbung auf einem Objektträger bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet. Die Gefrierschnitte (2.10.1.) wurden in Aceton fixiert (-20°C; 10 Minuten) und luftgetrocknet (RT). Die Objektträger wurden je 3 Minuten in Ethanol steigender Konzentration inkubiert (50% - 80% - 100%; RT), und 15 Minuten luftgetrocknet. Danach wurde jede Färbung der Kontrolle (Bakteriensuspension) mit 10 µl, beziehungsweise jeder Objektträger mit Gefrierschnitten mit 40 µl der Hybridisierungspuffers mit Oligonukleotid-Sonde in optimaler Konzentration bedeckt und in einer feuchten Kammer bei 46°C inkubiert. In der feuchten Kammer war die Atmosphäre mit Hybridisierungspuffer gesättigt.

Nachfolgend wurden die Objektträger mit vortemperiertem Waschpuffer (48°C) gewaschen (15 Minuten), mit PBS abgespült und unter Lichtschutz luftgetrocknet.

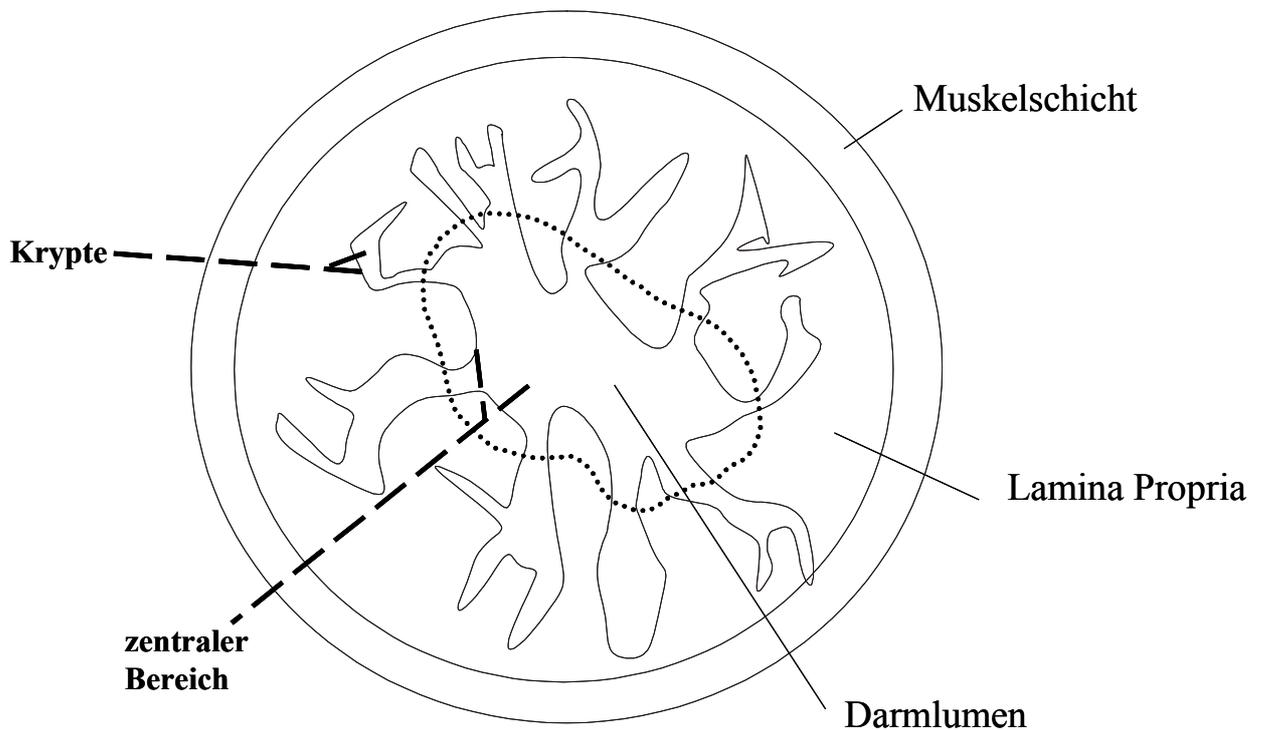
Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mit Di-Amino-Propidium-Iodid (DAPI; 1µg/ml) für 20 Minuten. Die Objektträger wurden gewaschen (PBS), luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

2.9.4 Auswertung und Dokumentation

Die Ansicht der Objektträger erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Hg-Bogenlampe bei verschiedenen Vergrößerungen. Durch manuellen Wechsel der Exzitationswellenlänge war eine selektive Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes möglich. Die DAPI-Färbung diente der histologischen Orientierung. Es wurden ausschließlich Färbungen ausgewertet, die in der Kontrolle (Bakteriensuspension) einen für den Betrachter deutlich wahrnehmbaren Unterschied des Fluoreszenzsignales der Bakterien zwischen gefärbter (Hybridisierungspuffer mit Oligonukleotidsonde; Positivkontrolle) und ungefärbter (nur Hybridisierungspuffer; Negativkontrolle) aufwiesen.

Durch repräsentative Aufnahmen wurde die Lokalisation der Darmbakterien mit Hilfe einer angeschlossenen Videodokumentationsanlage gespeichert. Die elektronische Nachbearbeitung der Bilder diente ausschließlich dazu, Qualitätsverluste aufgrund der Videodokumentation zu kompensieren, so daß das Resultat wieder dem Bild des Mikroskopierenden entsprach.

Ferner wurde durch mikroskopische Zählung der Bakterien an verschiedenen Orten im Darm (Lumen, Epithel-assoziiert, Gewebe) die Verteilung der Bakterien im Darm



quantifiziert. Dabei wurde bei der Zählung Epithelassoziierter Bakterien zwischen zentralen Epithelabschnitten und dem Epithel in den Krypten unterschieden. Die folgende Skizze verdeutlicht die Lage beider Bereiche.

Es wurden ausschließlich komplett intakte Schnitte zur Bakterienzählung verwendet und mindestens 15 komplette Kolonquerschnitte pro Maus ausgewertet.

2.10 Untersuchung der in-vivo Migration adoptiv transferierter T-Zellen

2.10.1 Donortiere und -zellen

Als Donortiere wurden heterozygote Träger der Mutation des Interleukin-2 Gens (IL-2^{+/-}) verwendet. Diesen Tieren wurden die submandibulären, axialen und inguinalen Lymphknoten entnommen. Diese Lymphknoten wurden sorgfältig von Fettgewebe befreit und gemeinsam durch Zerreiben in einem sterilen, handelsüblichen Teesieb in eine Einzelzellsuspension überführt.

Die weitere Aufreinigung erfolgte durch negative Selektion mittels der Panning-Methode. Zu diesem Zweck wurden die Lymphozyten mit monoklonalen

Antikörpern gegen CD8, CD25, MAC-1 in einer Endverdünnung von 1:160 in Click's inkubiert (15 Minuten / 4°C):

Tabelle5. mAb zur phänotypischen Aufreinigung von Zellen (Panning)

murines Epitop	Hybridom-Name	Proteinkonzentration [mg/ml] / Aufreinigungsmethode
CD8	YTL169	15,8 / NH ₄ Cl-Präzipitation
CD25	PC61	2,0 / Affinitätschromatographie
MAC-1	M1.70	3,0 / Affinitätschromatographie
CD4	YTL191	17,0 / NH ₄ Cl-Präzipitation

Nachfolgend wurden die Zellen gewaschen. Die negative Selektion erfolgte durch Inkubation (30 Minuten / RT) auf Petrischalen (feste Phase), die zuvor mit polyklonalem Hase-anti(Ratten-Ig) Immunglobulin (100ng/ml; über Nacht / 4°C) inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die nicht-adhärierenden Zellen durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und abgenommen. Zur Kontrolle der Depletion MAC-1⁺, CD8⁺ und CD25⁺ Zellen wurden Aliquots der Zellsuspension vor und nach der Panningprozedur separiert und durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Zellsuspension beinhaltete >95% T-Zellen, von denen wiederum >97% CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁻ waren.

Die radioaktive Markierung der zu transferierenden Zellen geschah durch unspezifischen Einbau des radioaktiven Chrom-Isotopes 51 (⁵¹Cr). Dazu wurden die zu markierenden Zellen in Click's mit 20% FCS und 60 µCi/ml ⁵¹Cr inkubiert (1 Stunde / 37°C). Überschüssige Radioaktivität wurde durch Waschen der Zellsuspension entfernt. Tote Zellen wurden durch Zentrifugation über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten (Percoll) separiert und die gereinigten Zellen unmittelbar vor der Applikation gezählt. Die Zellsuspension wurde mit Click's-Medium auf 3,33x10⁶ Zellen/ml eingestellt.

2.10.2 Zellapplikation und Verweilzeit

Unmittelbar vor der Applikation der Zellen wurden die Empfängertiere zur Dilatation der peripheren Gefäße mit infrarotem Licht bestrahlt. Die 300 µl (entspr. 1x10⁶ Zellen) der Zellsuspension wurden pro Tier über die Schwanzvene appliziert. Nach

exakt einer Stunde wurden die Tiere getötet und bis zur Präparation unter Eiskühlung gelagert.

2.10.3 Auswertung

Folgende Organe wurden präpariert:

Periphere Lymphknoten (siehe 2.11.1), mesenteriale Lymphknoten, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Leber, Lunge

Diese Organe wurden in 75% Ethanol aufgenommen und die enthaltene Radioaktivität (γ -Strahlung des Energiebereiches von ^{51}Cr) wurde ermittelt. Ferner wurden die Restkörper der Mäuse ohne Schwanz vermessen. Die Zellretention wurde nach der folgenden Formel als prozentualer Anteil der Gesamtradioaktivitätsdosis pro Maus errechnet:

$$\% \text{ retinierte Radioaktivität} = (D_{\text{Organ}}/D_{\text{gesamt}}) \times 100$$

D_{Organ} = Zerfälle von ^{51}Cr pro Minute* [CPM, *counts per minute*] des jeweiligen Organs

D_{gesamt} = Summe der Zerfälle von ^{51}Cr pro Minute* [CPM, *counts per minute*] aller Organe und des Restkörpers

* alle CPM-Werte wurden um die Hintergrundstrahlung reduziert

Die Messung der einzelnen Organe erfolgte entweder bis zum Registrieren von 300 Zerfällen oder für maximal 3000 Sekunden

2.10.4 Blockade von Adressinen

2.10.4.1 monoklonale Antikörper

Folgende monoklonale Antikörper wurden eingesetzt, um in-vivo die Funktion der erkannten vaskulären Addressine zu blockieren:

Tabelle 6. mAb zur in-vivo Blockade von endothelialen Addressinen

murines Epitop	Hybridom-Name	applizierte Proteinmenge pro Maus
MAdCAM-1	MECA-367	250 μg
VCAM-1	6c71 *	400 μg

* [68]

2.10.4.1.1 Herstellung

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgte durch Kultur der Hybridomazellen nach Standardverfahren.

2.10.4.1.2 Spezifische Aufreinigung

Die Aufreinigung der Antikörper enthaltenden Zellkulturüberstände erfolgte durch Affinitätschromatographie mit einer FPLC-Anlage. Als IgG-spezifische Matrix wurde ProteinG-gekoppelte Sepharose in Form einer kommerziell erhältlichen Säule eingesetzt.

Die Reinheit der Präparation wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Coomassie- und Silberfärbung kontrolliert. Der Proteingehalt wurde durch Coomassiefärbung und Vergleich mit einem BSA-Standard quantifiziert (Bradford). Die Antikörperlösung wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.10.4.1.3 Spaltung in Fab -Fragmente

Zur Reduktion unspezifischer, Fc-Teil abhängiger Blockade von Adressinen wurden die monoklonale Antikörper einer Papainspaltung unterworfen. Der Erfolg wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Coomassie- und Silberfärbung kontrolliert. Ferner bestätigte die HPLC-Analyse, daß $>90\%$ des eingesetzten intakten Immunglobulins in Fab und Fc-Teil gespalten wurden, ohne daß weitere Spaltprodukte in nennenswertem Umfang entstanden waren.

2.10.4.1.4 Analyse mit SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinanalyse erfolgte auf 12,5%igen SDS-Gelen gemäß Standardmethoden. Die Proteine wurden mit einer Spannung von 30mV aufgetrennt.

2.10.4.1.4.1 Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Die Färbung von Proteinen durch Coomassie-Blau beruht auf der Komplexierung von Kobalt-Ionen durch Tyrosin-Seitenketten. Die Färbung wurde gemäß Standardprotokoll durchgeführt.

2.10.4.1.4.2 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung durch Proteine beruht auf der Reduktion von Ag^+ zu elementarem Silber durch oxidierbare funktionelle Gruppen der Aminosäureseitenketten. Auch diese Färbung entsprach etablierten Labormethoden.

2.11 Adoptiver Transfer von CBA-spezifischen Zelllinien

2.11.1 Zelllinien

Ausgehend von folgende Zellisolaten wurden Zelllinien etabliert:

- Kolon LPL (IL-2^{-/-})
- Milzzellen (IL-2^{+/+})
- Milzzellen (IL-2^{-/-})

2.11.1.1 Zellkulturbedingungen

Die isolierten Zellen wurden Click's wie unter 2.4.1. beschrieben kultiviert. Die folgenden Zusätze wurden in den genannten Abständen hinzugefügt:

Tabelle 7. Kulturbedingungen zur Etablierung CBA-spezifischer Zelllinien

Zellkulturzusatz	Intervall der Erneuerung [Tage]	Endkonzentration
CBA (s 2.7.4.1.)	14	10 µg/ml
Feederzellen (2.4.1.)	7	2x10 ⁶ /ml
rh IL-2	3	20 Einheiten/ml

Die Zellen wurden in 5 ml Volumen kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden hiervon 3 ml abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

In regelmäßigen Abständen wurden die toten Zellen durch Dichtenzentrifugation abgetrennt. (s.2.3.3)

2.11.1.2 Charakterisierung der Eigenschaften der Zelllinien

Für funktionelle Untersuchungen (Zytokinsekretion in den Zellkulturüberstand, s. 2.5.2; Zellproliferation, s. 2.5.1) wurden Zellen zwei bzw. drei Tage nach der letzten Antigenzugabe verwendet. Phänotypische Untersuchungen mittels Durchflußzytometrie wurden dagegen 14 Tage nach der regulären Zugabe von frischen CBA durchgeführt.

2.11.2 Adoptiver Transfer

Für den adoptiven Transfer auf Empfängermause wurden Zellen neun Tage nach der letzten Zugabe von CBA-Antigen verwendet. Vor dem Transfer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Dichtenzentrifugation von toten Zellen befreit und gezählt. Zum adoptiven Transfer wurden sie in PBS resuspendiert (26,6x10⁶ /ml) und den Empfängertieren über die Schwanzvene verabreicht wie unter 2.11.2. beschrieben.

2.11.2.1 Empfängertiere

Als Empfängertiere wurden unter SPF-Bedingungen gehaltene IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Tiere im Alter von 6 – 10 Wochen verwendet. Hierbei wurden IL-2^{-/-} Tiere ausgewählt, die zum Zeitpunkt des Zelltransfers noch keine klinischen Anzeichen einer Kolitis aufwiesen.

2.11.2.2 Auswertungsparameter

Die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere erfolgte in regelmäßigen Intervallen durch Erhebung eines klinischen Kolitis-Scores. Dieser berücksichtigt die folgenden, Kolitis-assoziierten klinischen Symptome:

Tabelle 8. Parameter des klinischen Kolitis-Score

Symptom	Punkte des Kolitis-Scores
Körperhaltung	normal = 0 gekrümmte Schonhaltung = 1 Pkt
Agilität	normal = 0 Pkt. apathisch = 1 Pkt.
Fellzustand	normal = 0 Pkt. struppig = 1 Pkt.
Rektumprolaps	nein = 0 Pkt. ja = 4 Pkt
Stuhlkonsistenz	normal = 0 Pkt. flüssig = 2 Pkt. flüssig & blutig = 4 Pkt.
Körpergewichtsverlust (relativ zum individuellen Maximum)	< 10% = 0 10 - 20 % = 2 20 - 30 % = 4 > 30 % = 6.

Bei Auftreten einer eindeutigen schweren Kolitissymptomatik wurden die jeweiligen Tiere getötet und Kolonmaterial für die Histologie asserviert (2.8.1).

2.12 Besiedlung von KF-Mäusen mit SPF-Flora

Im Alter von 10 Wochen wurden zuvor unter KF-Bedingungen aufgezogene Mäuse in die SPF-Zucht überführt und mit Einstreu von Mäusen dieser Zucht in Kontakt gebracht. Die Ansiedlung einer konventionellen Darmflora wurde durch mikrobielle Floraanalyse untersucht (2.14). In regelmäßigen Abständen wurden die neu besiedelten Tiere auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht (2.11.2.2).

2.13 Quantitative und qualitative Analyse der Kolonflora

Frisch abgesetzter Kot wurde aseptisch gesammelt, in LB-Medium aufgenommen und durch Vortexen (30 Minuten) suspendiert. Diese Suspension wurde in 1:10er-

Schritten mit PBS verdünnt und á 100µl/Agarplatte ausgeplattet. Es wurden hierfür folgende Nährböden gewählt:

Tabelle 9. Agar-Nährböden

	Selektivität	Bebrütung
Blutagar	keine	37°C/aerob
McConkeyII-Agar	Enterobacteriaceen	37°C/aerob
Schaedler-Agar	keine	37°C/anaerob
Schaedler-Kanamycin-Vancomycin-Agar	Bacteroides-Prevotella-Gruppe	37°C/anaerob

In der geeigneten Verdünnungsstufe wurden Kolonien gleicher Morphologie gezählt, isoliert und typisiert. Zur Typisierung wurden die folgenden Verfahren herangezogen:

Tabelle 10. Methoden zur mikrobiellen Differenzierung

Unterscheidungsmerkmal	Methode	Angewendet für
Zellwandaufbau	Gram-Färbung	Alle Keime
Biochemische Reaktionen	Kleine bunte Reihe *	Laktose ⁺ gramnegative Stäbchen
	API Strep	Entero/Steptokokken
	API 20E	E.coli-forme
	API Rapid	Anaerobier
Sequenz des hypervariablen Bereiches der 16s-rRNA	Amplifikation (PCR) und Sequenzierreaktion **	Alle Keime

* in der „kleinen bunten Reihe“ werden folgende Eigenschaften untersucht:

β-, Galaktosidase, Ornithindecaboxylase, Citratverwertung, Indolbildung, H₂S-Bildung, Harnstoffspaltung Gasbildung, Mobilität

** 16S-rRNA-Sequenzierung: mittels PCR wurde ein Abschnitt aus dem hypervariablen Bereich der 16S-rRNA amplifiziert und nach der modifizierten Kettenabbruch-Methode nach Sanger semiautomatisch sequenziert. Folgende Primer wurden zur spezifischen Amplifikation eubakterieller 16S-rRNA verwendet:

5'-GAG TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'

5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

Die erhaltenen Nukleinsäuresequenzen wurden auf Homologien zu publizierten Sequenzen untersucht. Dazu wurden folgende Datenbanken verwendet:

- EMBL, Heidelberg, Deutschland
- NCBI, Bethesda, USA

Sequenzhomologien von >95% wurden zur Identifizierung des jeweiligen Keimes berücksichtigt.

Die Berechnung der Keimdichte pro Gramm Kot erfolgte nach folgender Formel:

$$X \text{ [/g]} = N \times 10 / V \times 1000/M \text{ [mg]}$$

X = Keimzahl pro Gramm Faeces

N = Anzahl der gezählten Kolonien gleicher Morphologie

V = Verdünnungsfaktor

M = Faeceseinwaage

3. Materialien, Reagenzien, Geräte, Statistik

3.1 Tierzucht

3.1.1. SPF (engl. *specific pathogen free*)

Käfige: *Polyester Carbonat Käfig APEC* und Gestelle: *IVC Typ II*

(individually ventilated cages rack), Rereg, Waldkraiburg; Deutschland

Einstreu: Typ „*bedding 3/4 Faser*“ und Futter: *extrudiertes Mäuse-Zuchtfutter*; Ssniff Spezialitäten; ; Deutschland

3.1.2. Gnotobiotische Zucht

Käfige: *Makrolonkäfig Typ II* und Isolatoren: *KF-Isolatoren*; Fa Metall und Plastik

Einstreu: *standardisiertes Wechholzgranulat* und Futter: *Ratten-und Mäusefutter fortified Nr 1314*; Fa. Altromin; Lage/Lippe; Deutschland

Die gnotobiotische Zucht wurde in der Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm durchgeführt.

3.2. Semiquantitative RT-PCR

Geräte: - Photometer *Ultraspec 300* (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Thermostat-Heizblock *TR-L 288* (Liebisch, Nielefeld, Deutschland)
- Thermocycler *Gene Amp 2400* (Perkin Elmer; Branchburg, NJ; USA)
- Geldokumentationsanlage *Fluoro-S-Multiimager* und Software *MultiAnalyst* zur densitometrischen Analyse (BioRad, Hercules, CA, USA)

Reagenzien: - TRIZOL (Gibco BRL Life Technologies, Berlin, Deutschland)
- Reverse Transkriptase *Superscript II RT RNase H* (Gibco)
- RT-Puffer *5x reverse transcriptase-buffer* (Gibco)
- RNase-Inhibitor *RNasin* (Promega Biotec; Madison, WI, USA),
- Oligonukleotide *deoxynucleoside triphosphate* (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- DEPC Di-Ethyl-Pyrocbonat (Sigma, St-Louis, LO, USA)

- TAQ-Polymerase *AmpliTAQ und AmpliTAQ gold* (Perkin Elmer)
- 5' and 3' Primer (Metabion, München, Deutschland), Sequenzen s 2.2.3
- Reaktionspuffer *Taq DNA-polymerase buffer* (Perkin-Elmer)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- Agarose (Sigma)

3.3 Zellisolation und –kultivierung

- Geräte:
- Brutschrank *BBD 6220* (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
 - Durchlichtmikroskop *Axiovert 225* (Carl Zeiss GmbH, Wetzlar, Deutschland)
 - Neubauer'sche Zählkammer (GLW, Würzburg, Deutschland)
 - Zellernter *Harvester 96* (Tomtec, Orange, Connecticut, USA)
 - Szintillations-Counter *1450 Microplate* (Wallac, Turku, Finnland)
 - ELISA-Plattenleser *ELX 808* (BioTek Instruments, Winooski, USA))
- Materialien:
- Zentrifugationsröhrchen *Falcon* (Becton&Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
 - 24-well-Zellkulturplatten (Nunc, Dänemark)
 - Zellsieb *cell strainer Falcon* (Becton&Dickinson)
 - Glasfaser-Filtermatten *printed filtermat* (Wallac)
 - Szintillationswachs *melt-on-szintillator sheets* (Wallac)
 - ELISA-Platten *Microlon* (Greiner, Solingen, Deutschland)
- Reagenzien:
- Di-Thio-Threitol (Sigma)
 - Ethylenamin-Tetraacetat *EDTA* (Sigma)
 - Enzyme *collagenase II, collagenase VIII* und *hyaluronidase* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
 - Zellkulturmedium *Click's / RPMI 1640 medium* (Biochrom, Berlin, Deutschland) routinemäßig supplementiert mit 2 mM L-Glutamin (Biochrom), 10 mM HEPES (Biochrom), 5×10^{-5} 2-ME (Biochrom), 10 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 100 U/ml Penicillin G (Biochrom), 10% Hitze

inaktiviertes fötales Kälberserum FCS (Biochrom) 30 µg/ml Gentamicin (Sigma)

- rekombinantes, humanes IL-2 ()
- anti-IL-10 mAb *MAB-417* (R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- Polymyxin B (Sigma)
- Concanavalin A (Sigma)
- Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- alkalische Phosphatase und Streptavidin (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- ELISA-Substrat *pNPP* (Sigma)
- ³H-Thymidin (ICN- Biochemicals, Eschwege, Deutschland)

3.4 Durchflusszytometrie

Geräte: - Durchflusszytometer *Coulter Epics XL* mit Software (CoulterImmunotech, Krefeld, Deutschland).

Materialien: - Messgefäße *Falcon-2053* (Becton&Dickinson)

Reagenzien: - FACS-Puffer bestand aus PBS (phosphate buffered saline) mit 1% fötalem Kälberserum und 0,1% NaN₃
- Streptavidin-CyChrome-Konjugat (Pharmingen, Hamburg, Deutschland)

3.5 Bakterielle Zellkultur

Geräte: - Horizontalschüttler zur Flüssigkultur *Certomat BS-1*, (B.Braun Biotech international, Melsungen, Deutschland)
- Anaerobiertöpfe *Anaerocult* (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Sequenzierautomat *377 DNA Sequencer* (ABI Prism)

Materialien: - Generatoren einer anaeroben Atmosphäre *GENbox anaer* (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

- Nährböden (alle von Becton&Dickinson): Blutagar *ColumbiaAgar*, *McConkeyII-Agar*, *Schaedler-* und *Schaedler-Kanamycin-Vancomycin(KV)-Agar*
- Flüssigmedien *LB-Medium* (Eigenproduktion), *Thioglykolat-Medium*
- biochemische Kits zur Keimidentifizierung *ApiSTREP*, *API 20E*; *API RapidID* (alle von bioMérieux)

Reagenzien: - Primer zur Amplifikation eubakterieller 16s-rRNA (Metabion, München, Deutschland)

3.6 Herstellung antigener Präparationen

Geräte: - Sonifikator *Cell disruptor B15* (Branson; Schwäbisch Gemünd, Germany)

Materialien: - Sterilfilter 22µm *disposable Filter* (Josef Peske OHG, Aindling-Pichl, Deutschland)

- Kunststoffküvetten *Plastibrand* (Brand)

Reagenzien: - *DNase I* (Roche Diagnostics)

- Proteinbestimmung *BioRad Protein Assay* (BioRad)

3.7 Histologische Untersuchungen

Geräte: - Kryotom *CM 3050* (Leica, Heidelberg, Deutschland)

- Hybridisierungssofen *Shinla MCS* (Backhofer, Reutlingen, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop *DM RBE* (Leica, Heidelberg, Deutschland) mit Video-Dokumentationsanlage *Spot* (Visitron-Systems, Puchheim, Deutschland)

Materialien: - gelatinierte Objektträger *Superfrost Plus* (GLW, Würzburg, Deutschland)

- Reagenzien:
- Einbettmedium *TissueTek* (GLW, Würzburg, Deutschland)
 - Haematoxylin, Eosin und *Entellan*-Einbettmedium (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - Paraformaldehyd (Sigma)
 - Fluochrom-markierte Oligonukleotid-Sonde *EUB₃₃₈* (Metabion, München, Deutschland); Sequenz 5' -GCT GCC TCC CGT AGG GT -3' [Amann-RI; JBAC 172:762]
 - Einbettmedium für Fluoreszenzmikroskopie *Fluoprep* (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
 - DAPI Di-Amidino-Phenylindol (Sigma)
 - folgende Lösungen kamen in der FISH-Technologie zur Anwendung:

Tabelle 11. verwendete Lösungen zur FISH-Methode

	Hybridisierungspuffer	Waschpuffer
5M NaCl	0,9 [mol/l]	0,225 [mol/l]
1M TRIS-HCl	0,02 [mol/l]	0,02 [mol/l]
Formamid	20 Gew.-%	-
Na-Dodecyl-Sulfat (<i>SDS</i>)	0,01 Gew.-%	0,01 Gew.-%

3.8 In-vivo Migration adoptiv transferierter T-Zellen

Geräte: - γ -Zähler *1480 Wizard* (Wallac)

Materialien: - Petrischalen (Greiner, Solingen, Deutschland)

Reagenzien: - Na₂⁵¹CrO₄-Stammlösung (ICN-Biochemicals)

- polyklonaler Hase-anti-RatteIg Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland)

3.9 Herstellung und Fab-Spaltung monoklonaler Antikörper

- Geräte:
- FPLC Chromatographie-Anlage *GradiFrac* mit ProteinG-Affinitätssäule *HiTrap 5ml* (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
 - HPLC-Chromatographie-Anlage *Smart* mit Säule *Superdex75PC* (Pharmacia)
 - Spannungsversorgung für Elektrophorese *Powerpac 300* (BioRad)

- Materialien:
- Zellkultur-Rollerflaschen
 - Dialyseschlauch *Visking* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
 - Gelelektrophoresekammern (BioRad)

- Reagenzien:
- Papain (Roche Diagnostics)
 - Iodacetamid (Sigma)

3.10 Statistische Auswertung

Die Analyse der Signifikanz wurde wenn nichts anderes angegeben mit dem zweiseitigen Student T-Test für ungepaarte Proben durchgeführt.

Abweichend hiervon wurden die Überlebenszeiten in den adoptiven Transferexperimenten durch das Statistische Beratungslabor der Universität München mit dem *Cox*-Test und dem *Rank Log*-Test auf Signifikanz untersucht.

In beiden Fällen wurden eine mindestens 95 %ige Aussagewahrscheinlichkeit ($p < 0,05$) als statistisch signifikant und eine mindestens 99 %ige Aussagewahrscheinlichkeit ($p < 0,01$) als statistisch hochsignifikant betrachtet.

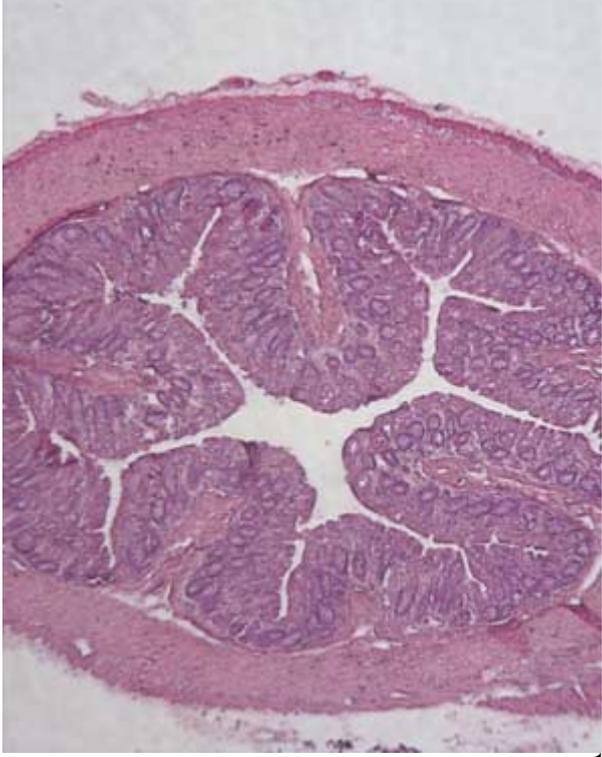
4. Ergebnisse

4.1 Histologie des Kolons von IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen unter SPF- und KF-Zucht

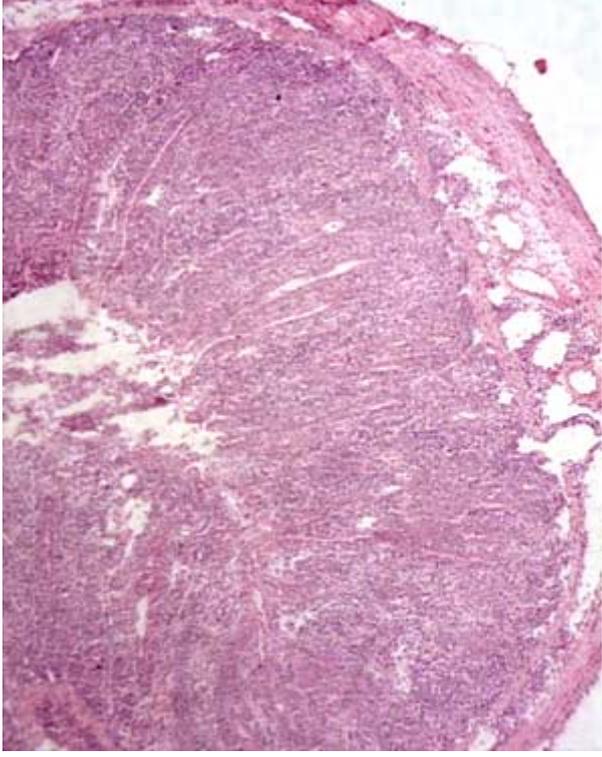
Vorarbeiten anderer Gruppen haben gezeigt, daß die Anwesenheit der physiologischen Darmflora für die Entstehung der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus unentbehrlich ist [54]. Da jedoch große Abweichungen in der Zusammensetzung der physiologischen Darmflora zwischen verschiedenen Tierkolonien auftreten können, wurden zunächst von 20 Wochen alten IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} SPF-Mäusen des für die vorliegende Arbeit verwendeten Inzuchtstammes Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbte Gefrierschnitte des Kolons angefertigt und histologisch untersucht. Wie *Abbildung 1A* verdeutlicht, zeigten IL-2^{+/+}-Tiere unter SPF-Bedingungen keine histopathologischen Veränderungen. Die Wand des Kolons ist nicht verdickt und das Epithel ist intakt. Im Vergleich dazu wiesen IL-2^{-/-} Tiere eine massive Entzündungsreaktion der Mukosa auf. Diese war durch eine starke Infiltration der Lamina propria mit mononukleären Zellen und eine deutliche Zunahme der Darmwanddicke gekennzeichnet (*Abbildung 1B*). Ferner fanden sich eine Zerstörung des Epithels, Verlust an Becherzellen sowie Kryptenabszesse und Ulzera – diese histopathologischen Charakteristika finden sich auch bei der Kolitis ulcerosa des Menschen.

Dagegen fanden sich in KF-Mäusen unabhängig von ihrem IL-2 Genotyp keine Anzeichen einer Inflammation (*Abbildungen 1C* und *1D*). Die verminderte Dicke der Lamina Propria deutet hier vielmehr auf eine Mukosaatrophie hin.

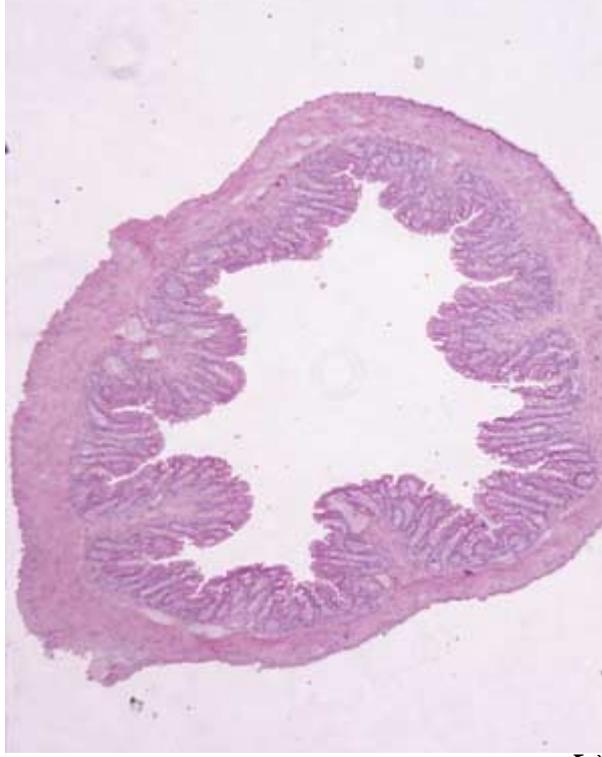
Um zu überprüfen, ob IL-2^{-/-} KF-Mäuse eine verzögerte Kolitis entwickeln, wurden auch histologische Kolonpräparate von Mäusen im Alter von 33 Wochen angefertigt. Wie in *Abbildung 2A* erkennbar, zeigten IL-2^{+/+} KF-Mäuse eine normale Mukosaarchitektur mit intaktem Epithel. Die in 20 Wochen alten KF-Tieren vorhandene Mukosaatrophie trat im Alter von 33 nicht mehr auf. Auch bei IL-2^{-/-} KF-Mäusen waren keine eindeutigen Anzeichen einer Entzündung zu erkennen (*Abbildung 2B*). In einigen dieser Mäuse war eine leichte, fokale Zellinfiltration erkennbar (nicht gezeigt).



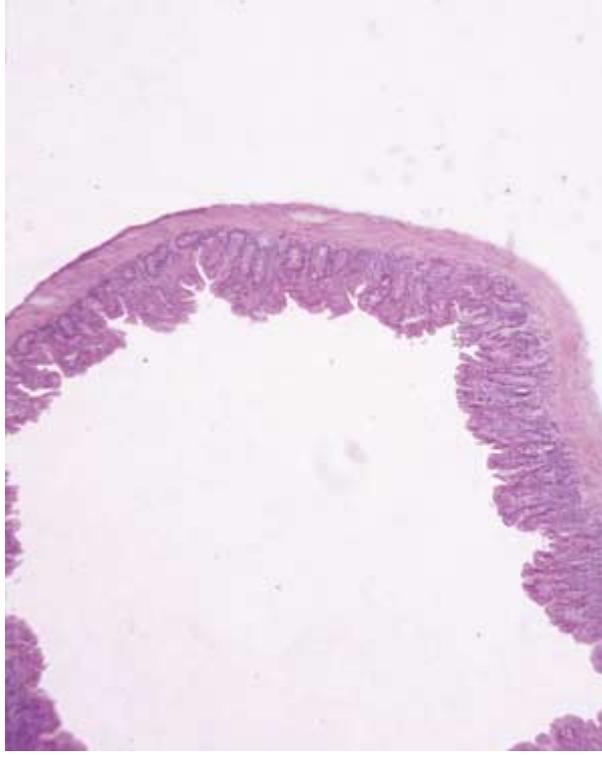
A



B



C



D

Abbildung 1 Kolon von 20 Wochen alten SPF- und KF-Mäusen

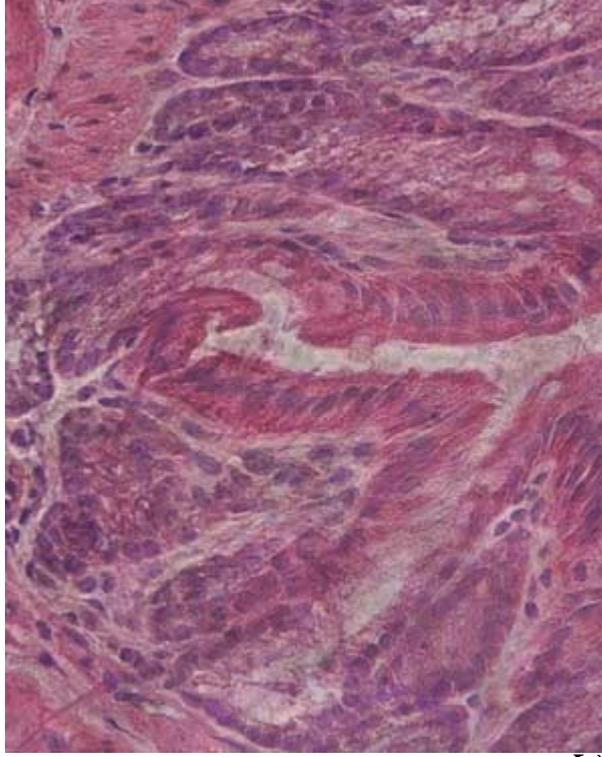
Die Abbildung repräsentative H&E-gefärbte Gefrierschnitteschnitte (5 µm) des Kolons von von 20 Wochen alten, unter SPF-Bedingungen (oben) oder keimfrei (unten) gehaltenen IL-2^{+/+} - (links) und IL-2^{-/-} -Mäusen (rechts) in 50-facher Vergrößerung.



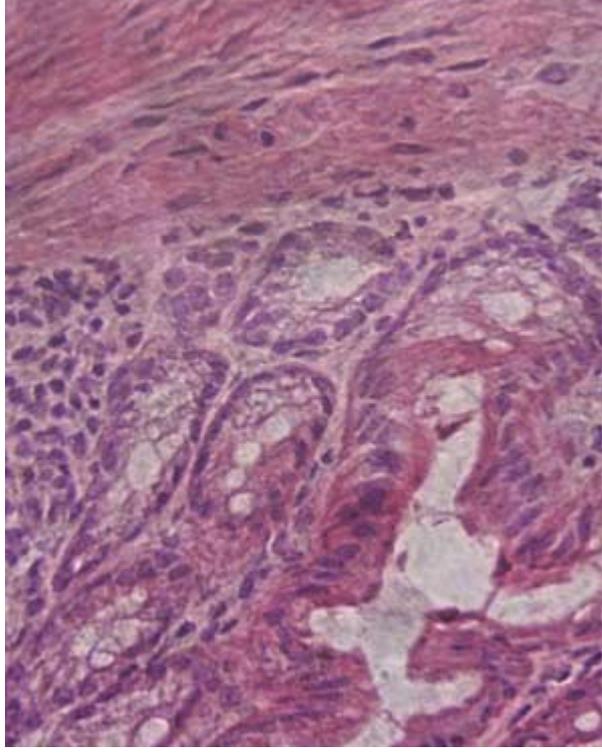
A



B



C



D

Abbildung 2 Kolon von 33 Woche n alten, KF-Mäusen

Die Abbildung repräsentative H&E-gefärbte Gefrierschnitteschnitte (5 µm) des Kolons von 33 Wochen alten, unter keimfreien Bedingungen gehaltenen IL-2^{+/+}- (links) und IL-2^{-/-}-Mäusen (rechts) und 50-fächer (oben) und 400-fächer (unten) Vergrößerung.

4.2 Zytokin-*mRNA* Expression im Kolon von SPF- und KF-Mäusen

4.2.1 Untersuchung 20 Wochen alter Tiere

Wie Vorarbeiten im eigenen Labor [³⁹] und von anderen Gruppen [⁶⁹] belegt haben, findet sich schon lange vor dem Auftreten histologischer Veränderungen eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumor Nekrosefaktor-alpha (TNF- α) im Kolon von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen. Derartige Veränderungen der Genexpression sind bereits im Alter von 10 Tagen nachweisbar, wogegen histologische Anzeichen der Kolitis erst mit rund 7 Wochen erfassbar werden [⁵⁴]. Deshalb kann man davon ausgehen, daß die der Nachweis von mRNA dieser Zytokine durch die RT-PCR Methode sehr gut geeignet ist, früheste pathologische Veränderungen in diesem Tiermodell zu untersuchen. Darum wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine im Kolon von IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen analysiert. *Abbildung 3* gibt eine Übersicht über die untersuchten Zytokine.

Die Tatsache, daß die Bandenintensitäten von β -Aktin als interner Standard zwischen den untersuchten Tieren weitgehend identisch waren, gewährleistete, daß die einzelnen Mausgruppen unmittelbar miteinander verglichen werden konnten. Hierbei war eine vermehrte Expression von IFN- γ , TNF- α , IL-1 α und IL-1 β in IL-2^{-/-} Mäusen unter SPF-Bedingungen deutlich erkennbar. Auch IL-10 trat vermehrt auf – wenngleich der Unterschied zu SPF- IL-2^{+/+} -Mäusen geringer war.

Im Gegensatz dazu wurden die oben genannten Zytokine im Kolon von IL-2^{-/-} KF-Mäusen nicht vermehrt exprimiert. Vielmehr schien hier zumindest für einige der untersuchten Zytokine eine Reduktion der mRNA-Expression im Vergleich zu gesunden SPF- IL-2^{+/+} Mäusen aufzutreten.

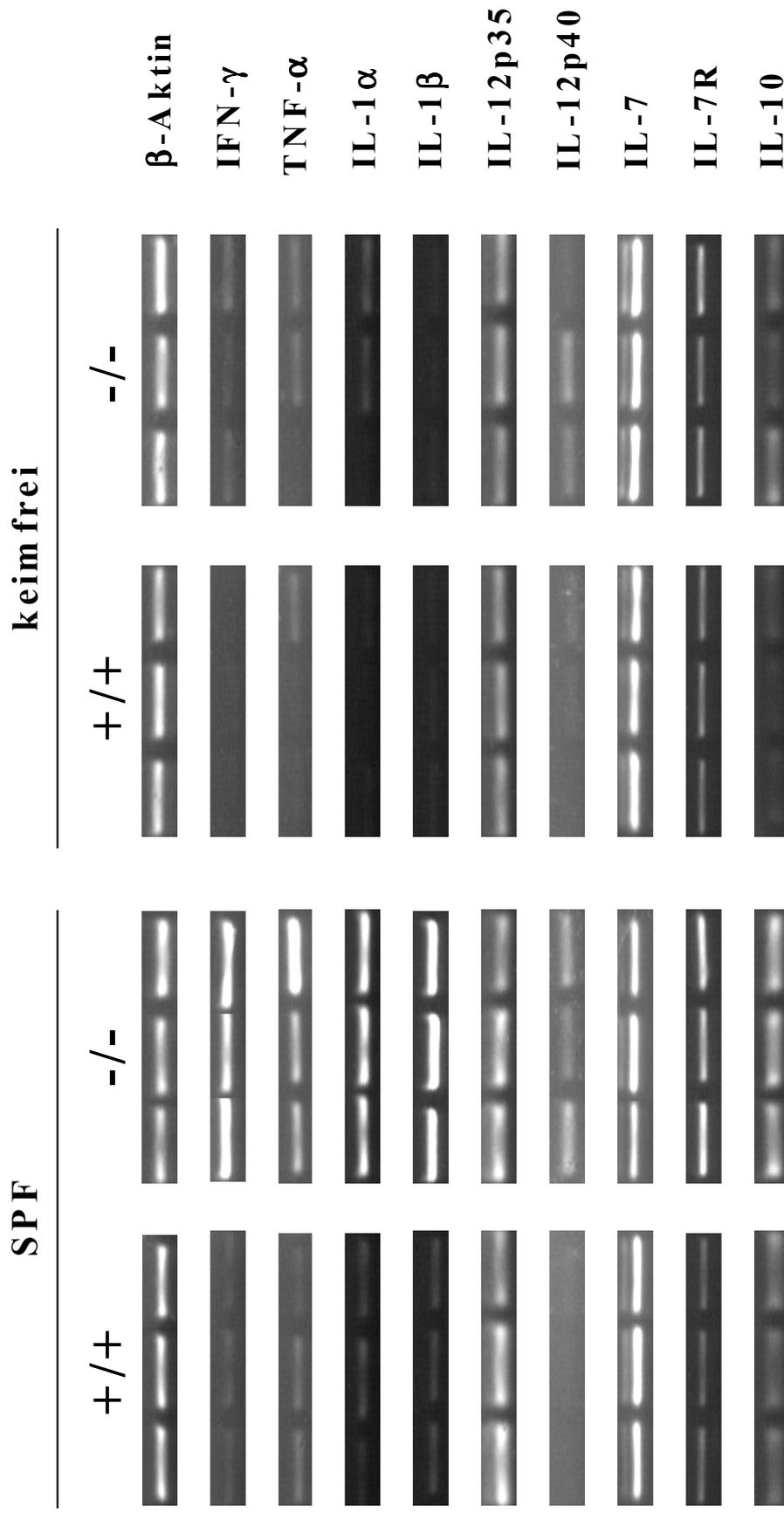


Abbildung 3. Zytokin-*m*RNA im Kolon 20 Wochen alter Mäuse

RNA aus Kolongewebe 20 Wochen alter, unter SPF und KF-Bedingungen gehaltener IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäuse wurde isoliert und revers transkribiert. Für die entsprechenden Genprodukte spezifische Fragmente wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Pro Mausgruppe wurde 4-5 Tiere untersucht. 3 repräsentative Banden sind abgebildet.

Um die Sensitivität der angewendeten Methode noch zu steigern, wurden die Fluoreszenzsignale der PCR-Amplifikate densitometrisch quantifiziert und auf das Signal des internen Standards β -Aktin normalisiert. Dadurch war es möglich, Variationen in der Ausbeute intakter cDNA zwischen verschiedenen Proben zu kompensieren. Die Resultate sind in *Abbildung 4* exemplarisch für IFN- γ und TNF- α als Quotient Zytokin / β -Aktin dargestellt:

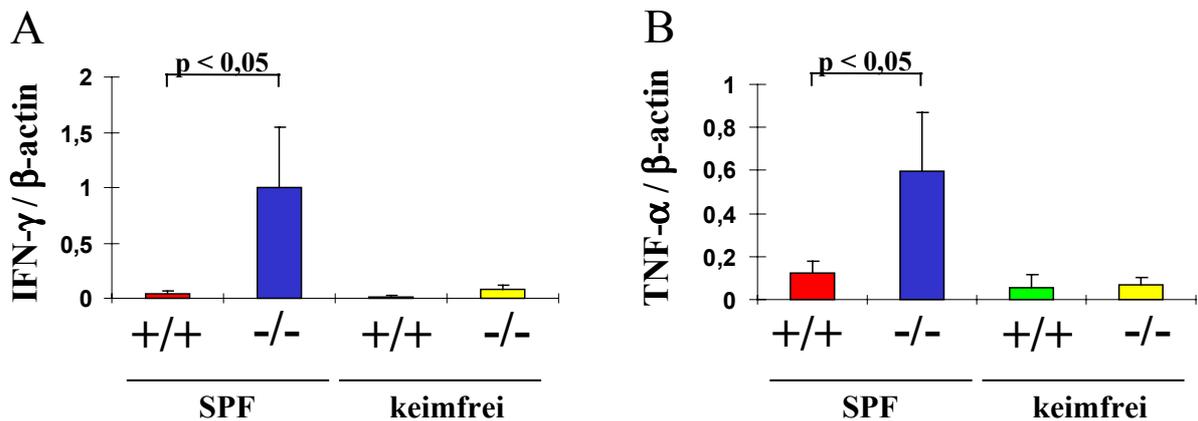


Abbildung 4. Relative mRNA-Expression im Kolon 20 Wochen alter Mäuse

mRNA aus Kolongewebe von 4 – 5 Mäusen pro Gruppe wurde revers transkribiert, mittels PCR amplifiziert und densitometrisch quantifiziert. Die Resultate sind als Quotient von IFN- γ bzw. TNF- α und β -Aktin dargestellt. P-Werte gemäß zweiseitigem Student 's T-Test.

Die relative Expression von IFN- γ und TNF- α war in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen signifikant erhöht (IFN- γ 22,9-fach und TNF- α 4,8-fach). Auch IL-1 α und IL-1 β wurden in IL-2^{-/-} Mäusen unter SPF-Bedingungen statistisch signifikant vermehrt exprimiert (nicht gezeigt). Die relative mRNA-Expression der anderen untersuchten Zytokine (s. *Abbildung 3*) war zwischen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} SPF-Mäusen nicht signifikant verändert. Im Einklang mit dem histologischen Befund der Mukosaatrophie (s. *Abbildung 1*) wurden die Zytokine IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α und IL-1 β in IL-2^{+/+} KF-Mäusen weniger exprimiert als in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen.

4.2.2 33 Wochen alte Tiere

Neben vitalen Mikroorganismen können auch Nahrungsbestandteile und tote Mikroorganismen zu einer Aktivierung des GALT führen [70, 71]. Um zu prüfen, ob ältere IL-2^{-/-} KF-Mäuse eine Kolitis entwickeln, wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine im Kolon 33 Wochen alter Mäuse untersucht. *Abbildung 5* zeigt exemplarisch die Resultate der semiquantitativen RT-PCR Analyse von TNF- α und IFN- γ . Aufgrund des progredienten

und fulminanten Verlaufes der Kolitis von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen erreichten diese Tiere das Alter von 33 Wochen nicht und konnten daher nicht untersucht werden.

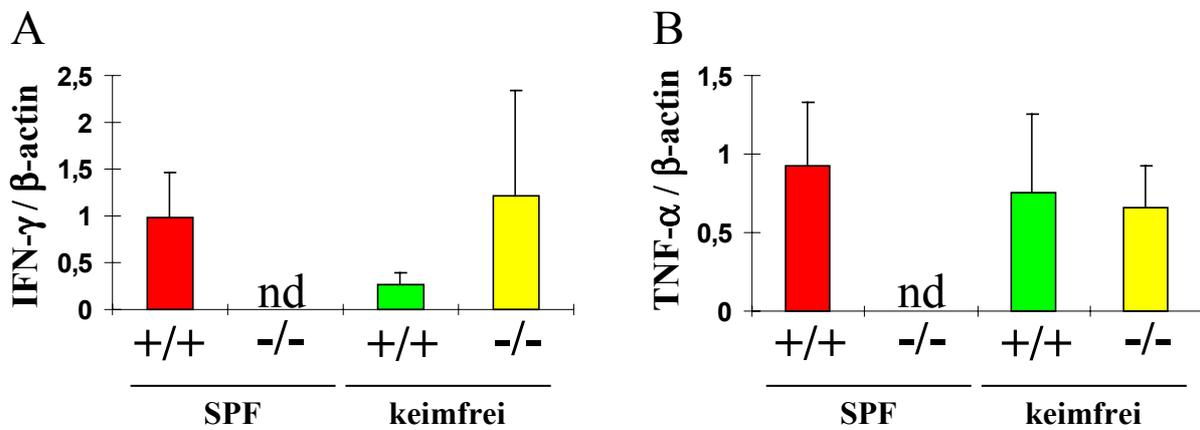


Abbildung 5. Relative mRNA-Expression im Kolon 33 Wochen alter Mäuse

mRNA aus Kolongewebe von 4 – 5 Mäusen pro Gruppe wurde revers transkribiert, mittels PCR amplifiziert und densitometrisch quantifiziert. Die Resultate sind als Quotient von IFN- γ bzw. TNF- α und β -Aktin dargestellt. P-Werte gemäß zweiseitigem Student's T-Test. nd = engl. *not determined*

Für TNF- α und IFN- γ zeigte sich keine signifikant erhöhte Expression in IL-2^{-/-} KF-Mäusen. Ebenso fand sich für keines der anderen untersuchten, aber nicht gezeigten Zytokine ein signifikanter Expressionsunterschied. Lediglich für IFN- γ fand sich eine gewisse Steigerung des mRNA-Niveaus im Kolongewebe (4,4-fach), die jedoch statistisch nicht signifikant war. Dies stimmt mit dem Befund der leichten, fokalen Zellinfiltration im Kolon einiger dieser Tiere überein [72].

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Kolitis der IL-2^{-/-} SPF-Maus mit einer vermehrten Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-1 α und IL-1 β verbunden ist und daß die Darmflora essentiell für die Entstehung der Kolitis ist.

4.3 Phänotypische Untersuchungen intestinaler T-Zellen

Durch beta2-Mikroglobulin (β_2m) und IL-2 doppeldefiziente Mäuse und IL-2^{-/-} Mäuse ohne reife B-Zellen (JH^{-/-} x IL-2^{-/-}) konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein von CD4⁺ T-Zellen für die Entstehung der Kolitis unabdingbar ist [73, 74]. Um zu untersuchen, ob im Verlauf der Kolitis entsprechende Verschiebungen der T-Zell Subpopulationen des Darmes auftreten, wurden diese Zellen durchflusszytometrisch mit der FACS-Technik (engl.

fluorescence activated cell-sorter) charakterisiert. Die *Abbildungen 6* und *7* fassen die wichtigsten Daten für intraepitheliale (IEL) und Lamina-propria-Lymphozyten (LPL) des Kolons von SPF- und KF-Mäusen zusammen:

4.3.1 Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)

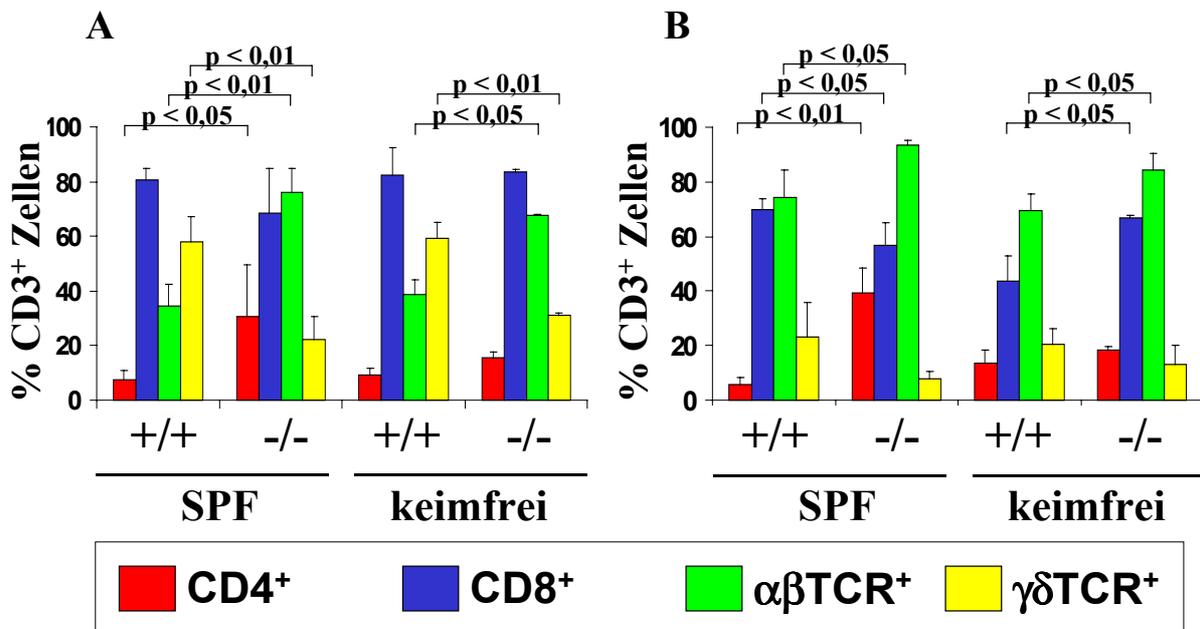


Abbildung 6. Phänotypische Analyse intraepithelialer T-Zellen

Intraepitheliale Lymphozyten des Dünndarmes (A) und des Kolons (B) von 20 Wochen alten Mäusen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Ausgewertet wurden vitale CD3⁺ Zellen. p-Werte gemäß zweiseitigem Student's T-Test

Im Epithel des Kolons von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen fanden sich relativ mehr CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (Anstieg von rund 5% auf 40%) und weniger CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (Rückgang von rund 70% auf 56%) als in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen. Ebenso waren hier die prozentualen Anteile von αβTCR⁺ T-Zellen vermehrt (Anstieg von 74% auf 94%) und von γδTCR⁺ T-Zellen verringert (Rückgang von rund 23% auf 8%). Beim Vergleich von KF-Mäusen zeigten sich ähnliche, doch geringer ausgeprägte Veränderungen der Zusammensetzung der T-Zellpopulationen. Anders als unter SPF-Bedingungen stieg hier der relative Anteil von CD3⁺CD8⁺ T-Zellen in IL-2^{-/-} Mäusen allerdings an (Zunahme von 44% in IL-2^{+/+} Mäusen auf 67%). Im Dünndarm fanden sich ähnliche Veränderungen der Zusammensetzung der T-Zellpopulationen wie im Kolon.

Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, daß im Verlauf der Kolitis eine Annäherung der Zusammensetzung der Population intraepithelialer T-Zellen an jene von peripheren T-Zellen stattfindet.

4.3.2 Lamina-Propria-Lymphozyten (LPL)

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der LPL fasst *Abbildung 7* zusammen:

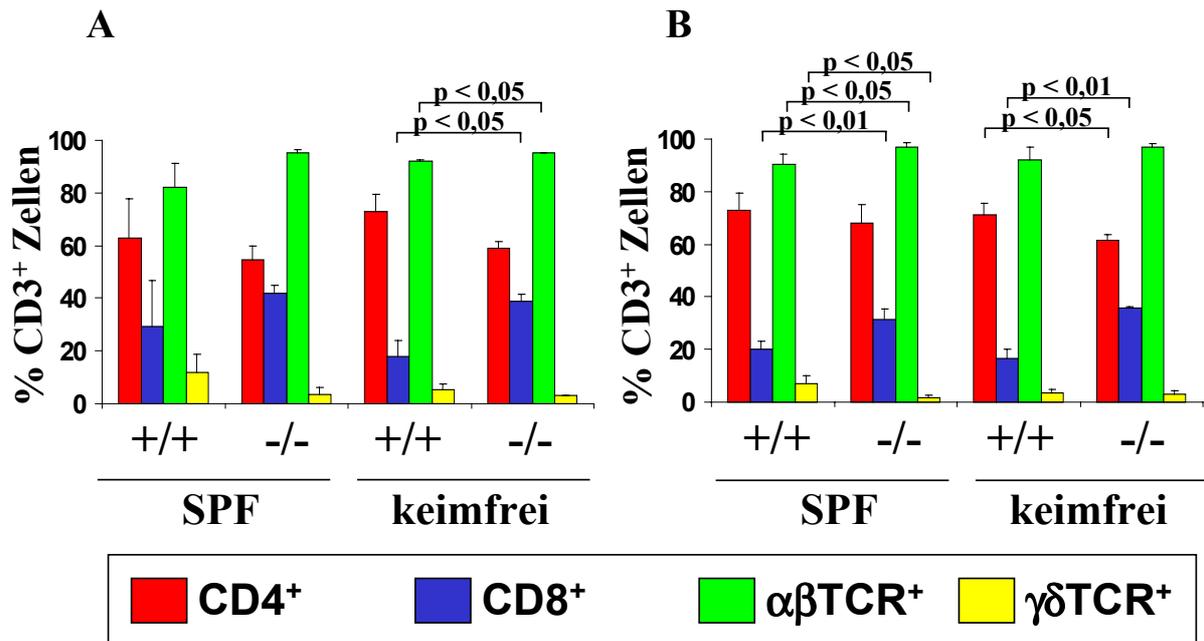


Abbildung 7. Phänotypische Analyse von Lamina Propria T-Zellen

Lamina-propria-Lymphozyten des Dünndarms (A) und des Kolons (B) von 20 Wochen alten Mäusen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Ausgewertet wurden vitale CD3⁺ Zellen. p-Werte gemäß zweiseitigem Student's T-Test

Ausgehend von einer Dominanz CD3⁺CD4⁺ T-Zellen in der Lamina Propria gesunder IL-2^{+/+} SPF-Mäuse (73%) fanden sich in IL-2^{-/-} Tieren unter SPF-Bedingungen vermehrt CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (Anstieg von 20% auf 31%). Ebenso traten αβTCR⁺ T-Zellen vermehrt (Anstieg von 90% auf 97%) und dementsprechend γδTCR⁺ T-Zellen vermindert (Rückgang von 7% auf 1,5%) auf. Der Vergleich von KF-Mäusen zeigte wiederum gleichartige Verschiebungen des Subpopulationen der T-Zellen der Lamina Propria.

Ebenso wie bei den IEL fanden sich auch bei den LPL im Dünndarm ähnliche Veränderungen der Zusammensetzung der T-Zell Population, ohne daß hier histologische und RT-PCR Untersuchungen Hinweise auf eine Inflammation gegeben hätten.

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß sich die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen der IEL und LPL an die Zusammensetzung peripherer T-Zellen annähert. Dies könnte sowohl durch in-situ Proliferation der T-Zellen des entsprechenden Phänotypes, aber auch durch eine vermehrte Rekrutierung von T-Zellen aus der Zirkulation erklärt werden.

4.3.3 T-Zellen sekundärer Lymphorgane

Zum Vergleich zu obigen Befunden wurden die T-Zellpopulationen der sekundären Lymphorgane Milz und mesenteriale Lymphknoten untersucht. *Abbildung 8* fasst die Resultate zusammen.

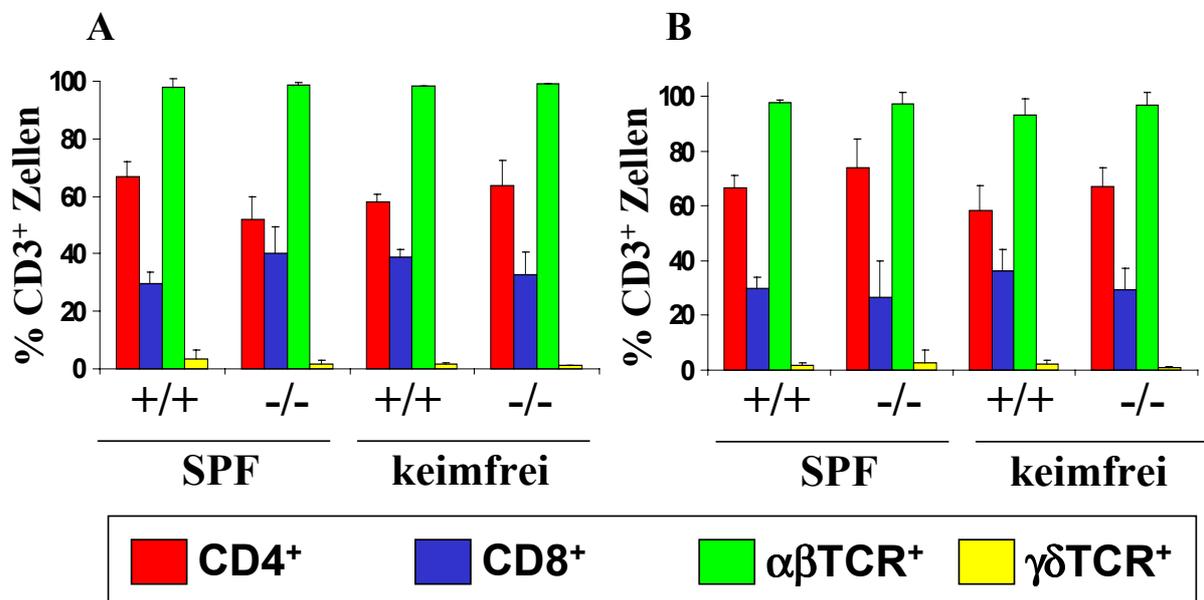


Abbildung 8. Phänotypische Analyse der T-Zellen sekundärer Lymphorgane

Zellen der mesenterialen Lymphknoten (A) und der Milz (B) von 20 Wochen alten Mäusen wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Ausgewertet wurden vitale CD3⁺ Zellen. p-Werte gemäß zweiseitigem Student's T-Test

In den peripheren, sekundären Lymphorganen traten keine Veränderungen des T-Zellpopulationen zwischen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen auf.

4.4 Migrationsverhalten von T-Zellen in IL-2^{-/-} Mäusen

4.4.1 Untersuchungen ohne Blockade von Adhäsionsmolekülen

Um die durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen aufgeworfene Frage nach der Herkunft der vermehrt im Kolon von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen anzutreffenden $\alpha\beta$ TCR⁺CD4⁺ T-Zellen direkt zu klären, wurden in-vivo Migrationsstudien durchgeführt. Hierbei wurden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen radioaktiv markiert und auf Empfängermäuse transferiert. Nach einer Stunde Verweilzeit wurde die pro Organ retinierte Radioaktivität gemessen und das Ergebnis als Prozentsatz der applizierten Gesamtdosis berechnet. Aus diesen Werten kann auf die Verteilung der radioaktiv markierten Zellen und somit auf das in-vivo Migrationsverhalten dieser Zellen rückgeschlossen werden. *Abbildung 9* fasst die Daten der Untersuchungen an SPF- und KF-Mäusen zusammen.

Man erkennt, daß bereits im Alter von 10-13 Wochen eine signifikant vermehrte Rekrutierung von T-Zellen in das entzündete Kolon von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen auftrat (Anstieg von 0,56% in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen auf 1,58%). Im Alter von 15-20 Wochen war die vermehrte Einwanderung von T-Zellen noch deutlicher ausgeprägt (Anstieg von 0,50% in IL-2^{-/-} KF-Mäusen auf 3,28%) und bereits im Alter von 5-8 Wochen zeigte sich ein leichter, wenngleich noch nicht signifikanter Anstieg der Einwanderung peripherer T-Zellen in das Kolon von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen im Vergleich zu IL-2^{+/+} SPF- und IL-2^{-/-} KF-Mäusen. Damit korrelierte das Ausmaß der T-Zellrekrutierung eng mit dem progredienten Verlauf der Kolitis.

Neben dem Kolon zeigten auch periphere und mesenteriale Lymphknoten sowie die Milz von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen vermehrte Einwanderung von T-Zellen, welches die beschriebene Erkrankung dieser Tiere widerspiegelt. Die Einwanderung in den Dünndarm war in den kolitischen Tieren nicht erhöht. Vielmehr wandern hier weniger Zellen ein als im gesunden SPF- IL-2^{+/+} oder bei IL-2^{-/-} KF-Mäusen.

% applizierte Radioaktivität

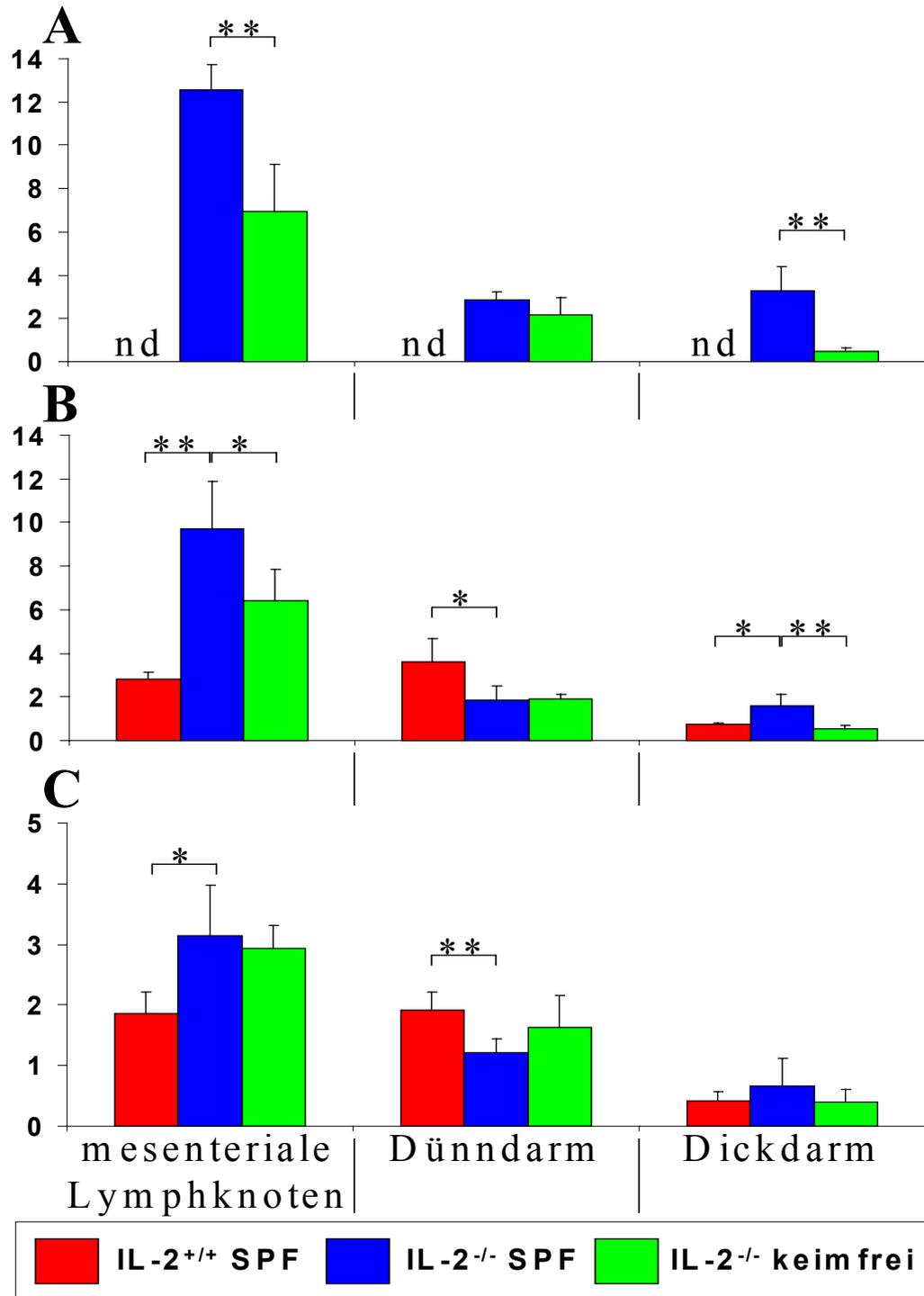


Abbildung 9. In-vivo Migration von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen

Lymphknotenzellen von IL-2^{+/-} Mäusen wurden durch negative Selektion gereinigt, mit ⁵¹Cr radioaktiv markiert und i.V. auf 15-20 (A), 10-13 (B) und 5-8 (C) Wochen alte Empfängermäuse transferiert. Nach einer Stunde Verweilzeit wurde für die jeweiligen Organe die retinierte Radioaktivität relativ zur Gesamtdosis ermittelt. Pro Gruppe wurden 3-7 Tiere untersucht. P < 0,05 (*) und p < 0,01 (**) gemäß Student's T-Test. (nd engl. *not determined*)

4.4.2 Untersuchungen mit Blockade von Adhäsionsmolekülen

In einer zweiten Serie von Experimenten wurde untersucht, welche endothelialen Adhäsionsmoleküle (Addressine) an der Vermittlung der vermehrten T-Zellrekrutierung beteiligt sind. Dies geschah durch die in-vivo Blockade der entsprechenden Addressine durch monoklonale Antikörper. Analysiert wurde die Funktionalität des zentralen physiologischen Addressines des Darmes, MAdCAM-1 (engl. *mucosal addressin cellular adhesion molecule*) [75] [76] und des besonders in entzündlichen Prozessen wichtigen Addressins VCAM-1 (engl. *vascular cellular adhesion molecule*) [77]. Die Abbildungen 10 und 11 fassen die Ergebnisse zusammen.

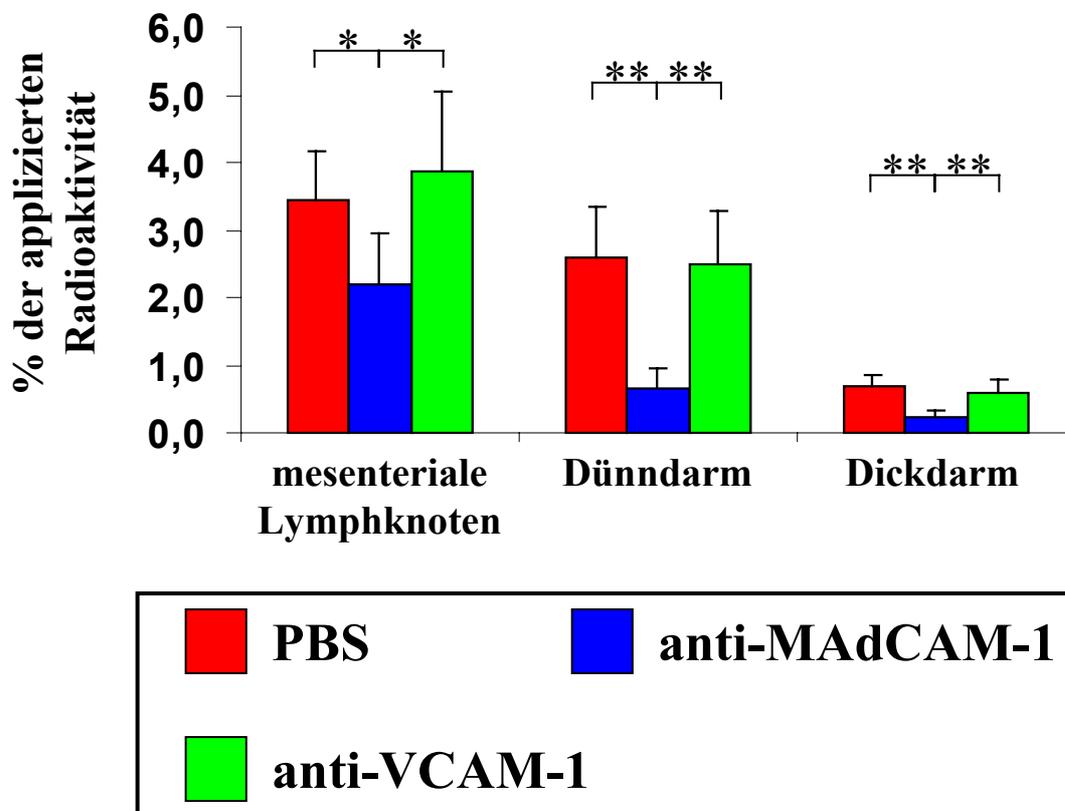


Abbildung 10. Beteiligung von Adressinen an der T-Zell Rekrutierung in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen

IL-2^{+/+} SPF-Mäuse wurden intraperitoneal mit 250 µg anti-MadCAM-1 F_{ab}-Fragment respektive 400 µg anti-VCAM-1 IgG pro Maus oder PBS (Kontrolltiere) behandelt. Zwei Stunden später wurden pro Tier 1x10⁶ gereinigte, ⁵¹Cr radioaktiv markierte CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Zellen i.v. verabreicht. Nach einer Stunde Verweilzeit wurde die Radioaktivität der jeweiligen Organe und der gesamten Maus gemessen. Die Ergebnisse sind als %-Satz der individuell eingesetzten Gesamtdosis ausgedrückt. Jede Mausgruppe umfasste 5 Tiere. P < 0,05 (*) und p < 0,01 (**) gemäß zweiseitigem Student's T-Test

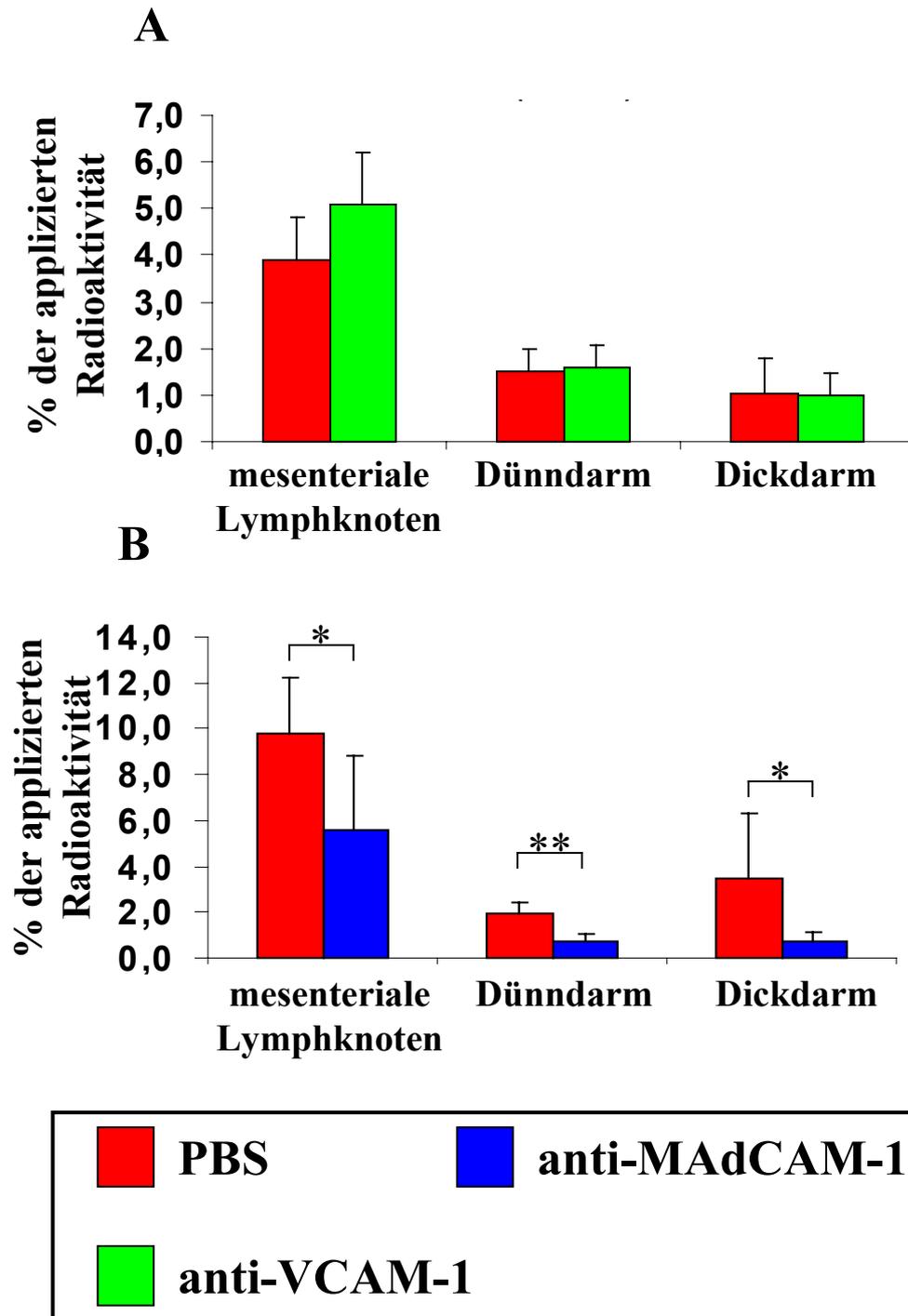


Abbildung 11. Beteiligung von Adressinen an T-Zell Rekrutierung in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen

IL-2^{-/-} SPF-Mäuse wurden intraperitoneal mit 250 µg anti-MadCAM-1 F_{ab}-Fragment (A) respektive 400 µg anti-VCAM-1 IgG (B) pro Maus oder PBS (Kontrolltiere) behandelt. Zwei Stunden später wurden pro Tier 1x10⁶ gereinigte, ⁵¹Cr radioaktiv markierte CD3⁺CD4⁺CD25⁻ Zellen i.v. verabreicht. Nach einer Stunde Verweilzeit wurde die Radioaktivität der jeweiligen Organe und der gesamten Maus gemessen. Die Ergebnisse sind als %-Satz der individuell eingesetzten Gesamtdosis ausgedrückt. Jede Mausgruppe umfasste 6 Tiere. P < 0,05 (*) und p < 0,01 (**) gemäß zweiseitigem Student's T-Test

Die Einwanderung von T-Zellen in Dick- bzw. Dünndarm von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen (*Abbildung 10*) wurde durch die Applikation von anti-MAdCAM-1 mAb um 70%, bzw. 80% reduziert. Somit war MAdCAM-1 für die T-Zell Rekrutierung in diese Organe von entscheidender Bedeutung. Auch in den mesenterialen Lymphknoten spielte dieses Adressin eine Rolle, wenngleich seine Funktion hier nicht so dominant ist. Durch anti-VCAM-1 mAb wurde im gesunden Darm von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen keine Blockade der Einwanderung von T-Zellen erreicht.

In IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis bewirkte die funktionelle Blockade des Adressins MAdCAM-1 eine signifikante Reduktion der Einwanderung von CD4⁺ T-Zellen in das Kolon (Rückgang um 80%; *Abbildung 11B*), die mit dem Wert von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen übereinstimmt. Die Blockade von VCAM-1 blieb dagegen auch in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen ohne Effekt (*Abbildung 11A*).

Zusammenfassend bedeutet dies, daß die Beteiligung der Adressine MAdCAM-1 und VCAM-1 an der T-Zellrekrutierung in das Kolon in IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} SPF-Mäusen weitgehend identisch ist.

4.5 Funktionelle Untersuchungen intestinaler T-Zellen von IL-2^{-/-} Mäusen

Die bis hierhin gewonnen Erkenntnisse belegen die Bedeutung von T-Zellen für die Entstehung der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus. Darauf aufbauend wurde die Hypothese einer pathologisch gesteigerten, proinflammatorischen T-Zellreaktivität gegenüber Antigenen der Darmflora aufgestellt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden von IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} SPF-Mäusen T-Zellen aus dem Darm isoliert und ihr Verhalten in Gegenwart von bakteriellen Antigenen analysiert. Als repräsentativ für die Vielfalt der luminalen Antigene des Kolons wurden **CBA** (engl. *colonic bacterial antigen* [⁷⁸]) und hitze-inaktivierter *Bacteroides vulgatus* (engl. *heat-killed B.vulgatus*; HK-*B.vulgatus*) verwendet. Für *B.vulgatus* wurde in verschiedenen CED-Modellen eine deutliche kolitogene Wirkung beschrieben [^{43, 79}]. CBA dagegen sollte als Sonifikat des gesamten Koloninhaltes viele der dort präsenten Antigene beinhalten. Die funktionellen Untersuchungen umfassten die Proliferation der Zellen sowie die sezernierten Zytokine.

4.5.1 In-vitro Proliferationsverhalten in Gegenwart bakterieller Antigene

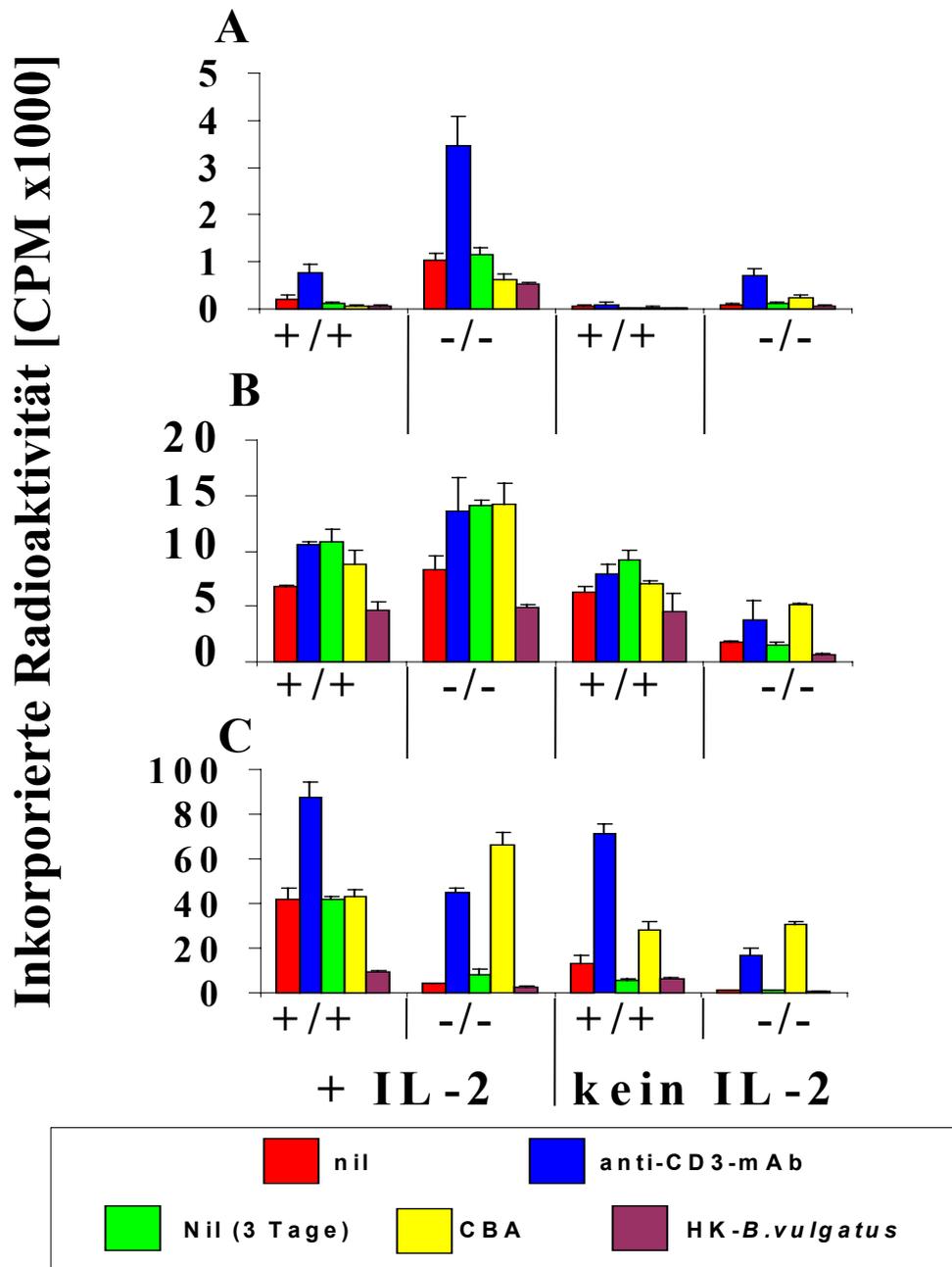


Abbildung 12. Proliferation von Lymphozyten in Gegenwart bakterieller Antigene

Kolon_{IEL} (A), Kolon_{LPL} (B) und mesenteriale Lymphknotenzelle (C) wurden von 20 Wochen alten SPF-Mäusen isoliert und mit den genannten Antigenen kultiviert. Die Zellkultur wurde ohne exogenen Zusatz von IL-2 (kein IL-2) oder unter Zugabe von 20 U/ml rek.IL-2 durchgeführt. Nach 2 Tagen (nil und anti-CD3-mAb) und nach 3 Tagen (nil 3 Tage, CBA, HK-*B.vulgatus*) wurde radioaktiv markiertes ³H-Thymidin zugesetzt. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Menge an inkorporierter Radioaktivität als Szintillationsignal gemessen (CPM = counts per minute). Die Abbildung zeigt je ein repräsentatives Experiment pro Mausgruppe. Jeder Proliferationsansatz wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, deren Standardabweichung die Fehlerbalken anzeigen.

Die Proliferation von Kolon_{IEL} (*Abbildung 12A*) aus IL-2^{-/-} SPF-Mäusen war unabhängig vom verwendeten Primärstimulus besonders bei Zugabe von IL-2 wesentlich größer als die entsprechender Zellen aus IL-2^{+/+} Mäusen (Anstieg von 780 CPM auf 3470 CPM). Auch bei Kolon_{LPL} (*Abbildung 12B*) wurde die vermehrte Proliferation von IL-2^{-/-} Zellen unter Zusatz von exogenem IL-2 gefunden (Anstieg von 10600 CPM auf 13600 CPM). Bei den mLNC (*Abbildung 12 C*) fand sich bei IL-2^{+/+} Zellen unabhängig von den Zellkulturbedingungen ein stärkeres Wachstum als bei den Zellen von IL-2^{-/-} Mäusen.

Die Stimulation mit *HK-B.vulgatus* führte in allen Fällen zu einem Rückgang der Zellproliferation unter das Niveau der unstimulierten Zellen. So sank die Proliferation von Kolon_{IEL} in der Gegenwart von *HK-B.vulgatus* von 1040 CPM auf 540 CPM. CBA übte auf Kolon_{IEL} einen ähnlichen Effekt aus, wogegen es in Kolon_{LPL} und in mLNC zu einer Zunahme der Proliferation führte (Kolon_{LPL}: Anstieg von 8300 CPM auf 14200 CPM).

Da Kolon_{IEL}, Kolon_{LPL} und mLNC heterogene Gemische verschiedener Zelltypen darstellen, könnten die unterschiedlichen Proliferationsdaten sowohl auf quantitativ verschiedenen Eigenschaften eines Zelltypes, als auch auf einer verschiedenen Zusammensetzung der Populationen beruhen. Um zu untersuchen, ob es zu relativen Verschiebungen der Lymphozytenpopulationen innerhalb der Kolon_{LPL} und Milzzellen kommt, wurden vor und nach der dreitägigen Kultivierung mit CBA durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. *Abbildung 13* zeigt ein repräsentatives Experiment mit Kolon_{LPL} von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen.

Wie *Abbildung 13* verdeutlicht, nahm der relative Anteil von B-Zellen innerhalb der lymphoiden Zellen nach dreitägiger Zellkultur mit beiden eingesetzten Antigenpräparationen circa um den Faktor 2 zu. Ähnliche phänotypische Veränderungen traten auch während der Kultivierung von Milzzellen unter identischen Kulturbedingungen auf (Daten nicht gezeigt). Ferner ergab die durchflusszytometrische Analyse nach dreitägiger Zellkultur ohne Primärstimulus und mit *HK-B.vulgatus* ähnliche Ausbeuten vitaler Lymphozyten, wogegen die Ausbeute nach Kultur mit CBA rund dreifach höher ist (Daten nicht gezeigt).

Diese Befunde belegen, daß die eingesetzten antigenen Präparationen keine unspezifischen zytotoxischen Wirkungen auf Lymphozyten haben. Vielmehr stimuliert CBA-Antigen vermutlich vorwiegend B-Zellen zur Proliferation.

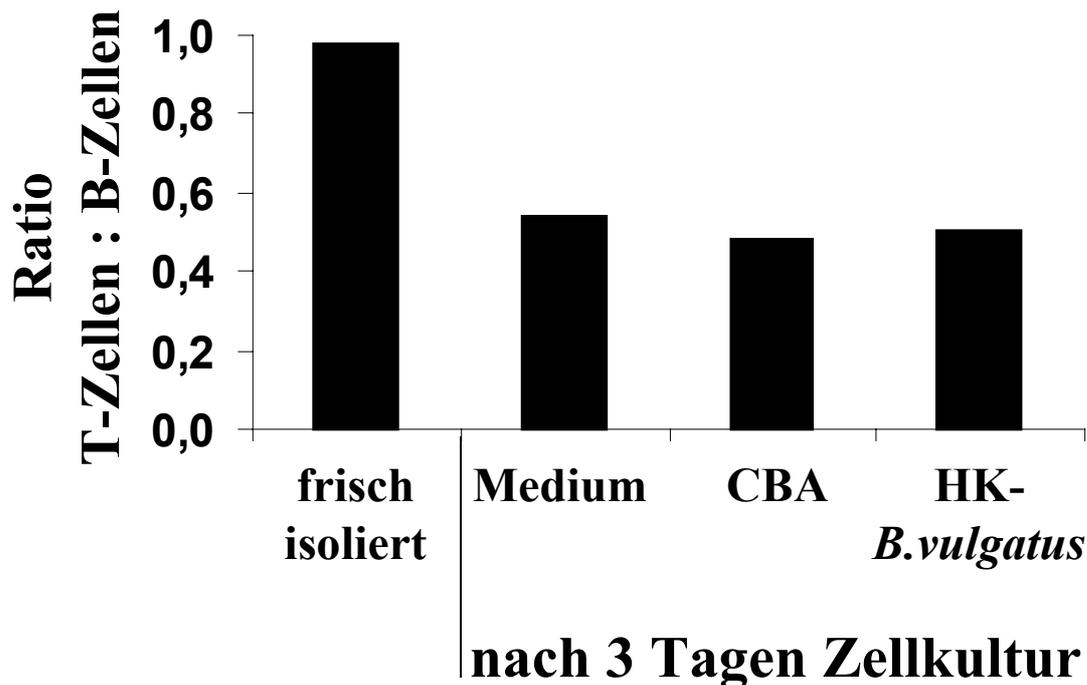


Abbildung 13. Veränderungen von Kolon_{LPL} Subpopulationen während der Zellkultur

Kolon_{LPL} wurden von 20 Wochen alten IL-2^{+/+} SPF-Mäusen isoliert und über drei Tage mit den genannten Stimuli kultiviert. Vor und nach Zellkultur wurden vitale lymphoide Zellen durchflusszytometrisch analysiert. T-Zellen wurden durch die Expression von CD3 und B-Zellen durch die Expression von Immunglobulin identifiziert. Nur vitale Zellen wurden ausgewertet.

4.5.2.1 In-vitro Zytokinproduktion in Gegenwart bakterieller Antigene

Die Genexpression von IFN- γ korreliert sehr eng mit dem Verlauf der Kolitis im untersuchten Tiermodell [80]. Ferner ist IFN- γ das charakteristische Zytokin von T_H1-Zellen [81], die in der Kolitis eine entscheidende Rolle spielen [73, 74, 80]. Um zu prüfen, ob im Kontext der Kolitis Antigene der Darmflora T-Zellen des Kolons unmittelbar zur pathologischen Produktion dieses Zytokines anregen, wurden von SPF-Mäusen isolierte Kolon_{IEL}, Kolon_{LPL} und Milzzellen in Gegenwart repräsentativer bakterieller Antigene kultiviert und ihre Produktion von IFN- γ gemessen. Die Resultate sind in der folgenden *Abbildung 14* zusammengefasst.

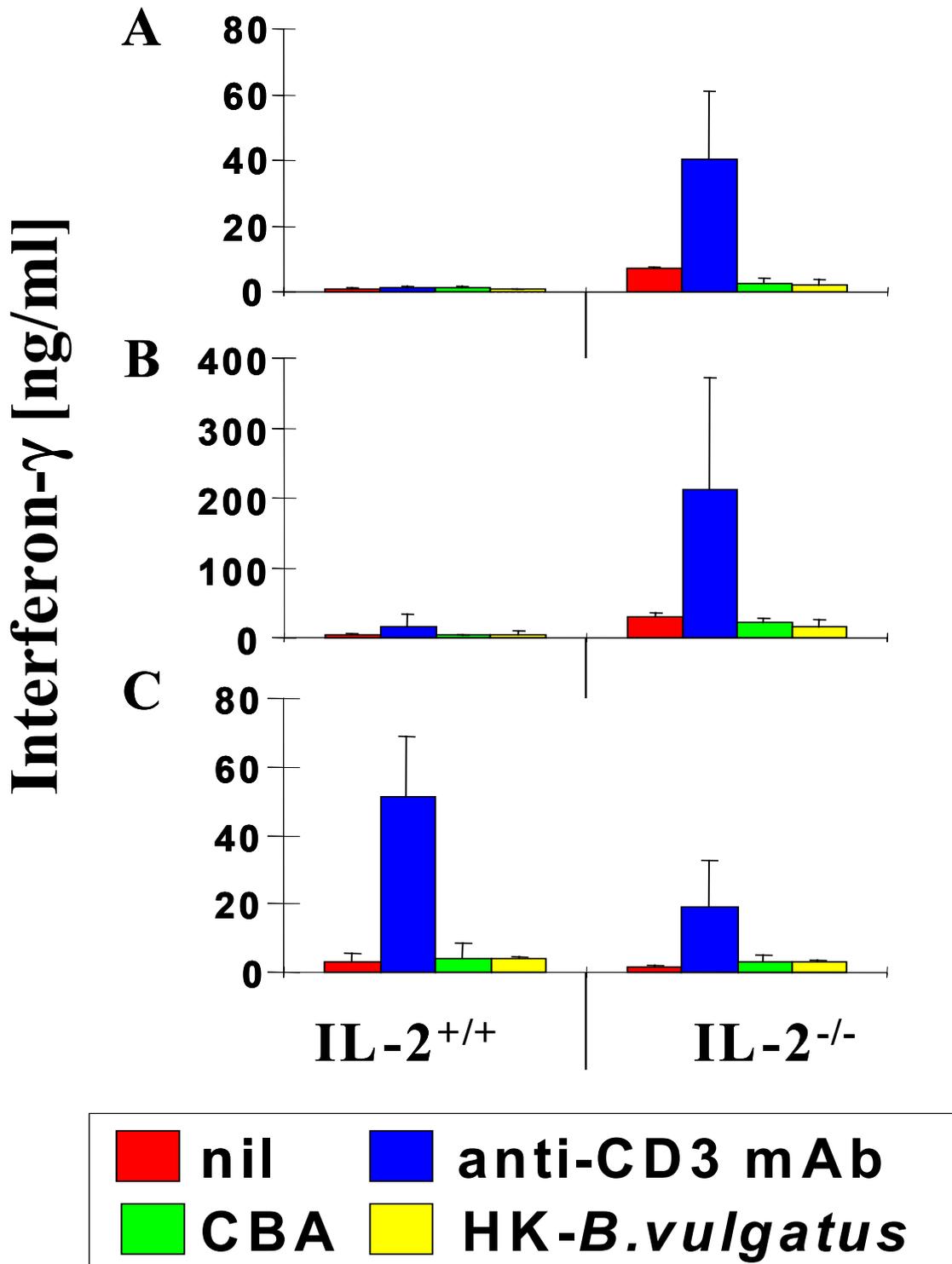


Abbildung 14. IFN- γ Produktion in Gegenwart bakterieller Antigene

Von 20 Wochen alten, SPF-gehaltenen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen wurden Kolon_{IEL} (A), Kolon_{LPL} (B) und Milzzellen (C) isoliert und in Gegenwart der genannten Stimuli kultiviert. Die Zellkultur erfolgte unter Zusatz von 20 U/ml rekombinantem IL-2. Nach 44 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mittels ELISA auf den Gehalt an IFN- γ bestimmt. Die Nachweisgrenze des ELISA lag bei 1 ng/ml. Die Balken entsprechen dem Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichungen.

Frisch isolierte Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} aus IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis zeigten in Gegenwart von IL-2 als Kostimulus eine starke Produktion von IFN- γ (7,1 und 33,2 ng/ml). Dies spiegelt den hohen Aktivierungszustand dieser Zellen wieder. Ferner sezernierten die selben Zellen nach unspezifischer Stimulation durch anti-CD3 mAb wesentlich mehr IFN- γ als die entsprechenden Zellen aus gesunden IL-2^{+/+} Mäusen. So produzierten beispielsweise Kolon_{LPL} von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen unter den genannten Bedingungen 211,7 ng/ml IFN- γ , wogegen die entsprechenden Zellen von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen nur 15,3 ng/ml IFN- γ sezernierten. Dies belegt deutlich, daß die mukosale Immunantwort von IL-2^{-/-} Mäusen mit Kolitis in Richtung einer T_{H1}-Antwort polarisiert ist. Allerdings produzierten weder Kolon_{IEL} noch Kolon_{LPL} dieser Tiere vermehrt IFN- γ in Gegenwart von bakteriellen Antigenen. Dies bedeutet, daß trotz der starken T-Zellaktivierung im Verlauf der Kolitis keine Reaktivität der T-Zellen gegenüber der Darmflora entsteht. Vielmehr führte die Anwesenheit der Floraantigene in einigen Experimenten sogar zu einer Abnahme der Produktion von IFN- γ (für Kolon_{LPL} von 30 ng/ml ohne Stimulation auf 22,1 ng/ml mit CBA und 16,6 ng/ml mit HK-*B.vulgatus*). Dies deutet auf das Vorhandensein von regulatorischen Mechanismen trotz der massiven Entzündungsreaktion im Kolon hin. Diese regulatorischen Mechanismen führen in „normalen“ Mäusen zu einer „oralen Toleranz“.

Die nachfolgenden Untersuchungen dienten dazu, den regulatorischen Mediator sowie seinen Produzenten zu identifizieren. Jüngere Forschungsergebnisse belegen eine zentrale Rolle von Interleukin-10 und Tr1-Zellen (engl. *T regulatory*) für die Immunregulation des GALT [62, 82-84]. Darum lag es nahe zu untersuchen, ob dieses Zytokin für die Abnahme der IFN- γ Produktion in der Gegenwart von Floraantigenen verantwortlich ist.

Abbildung 15 zeigt die Produktion von IL-10 durch Kolon_{IEL}, Kolon_{LPL} und Milzzellen von SPF-Mäusen nach dreitägiger Zellkultur.

Interleukin-10 [ng/ml]

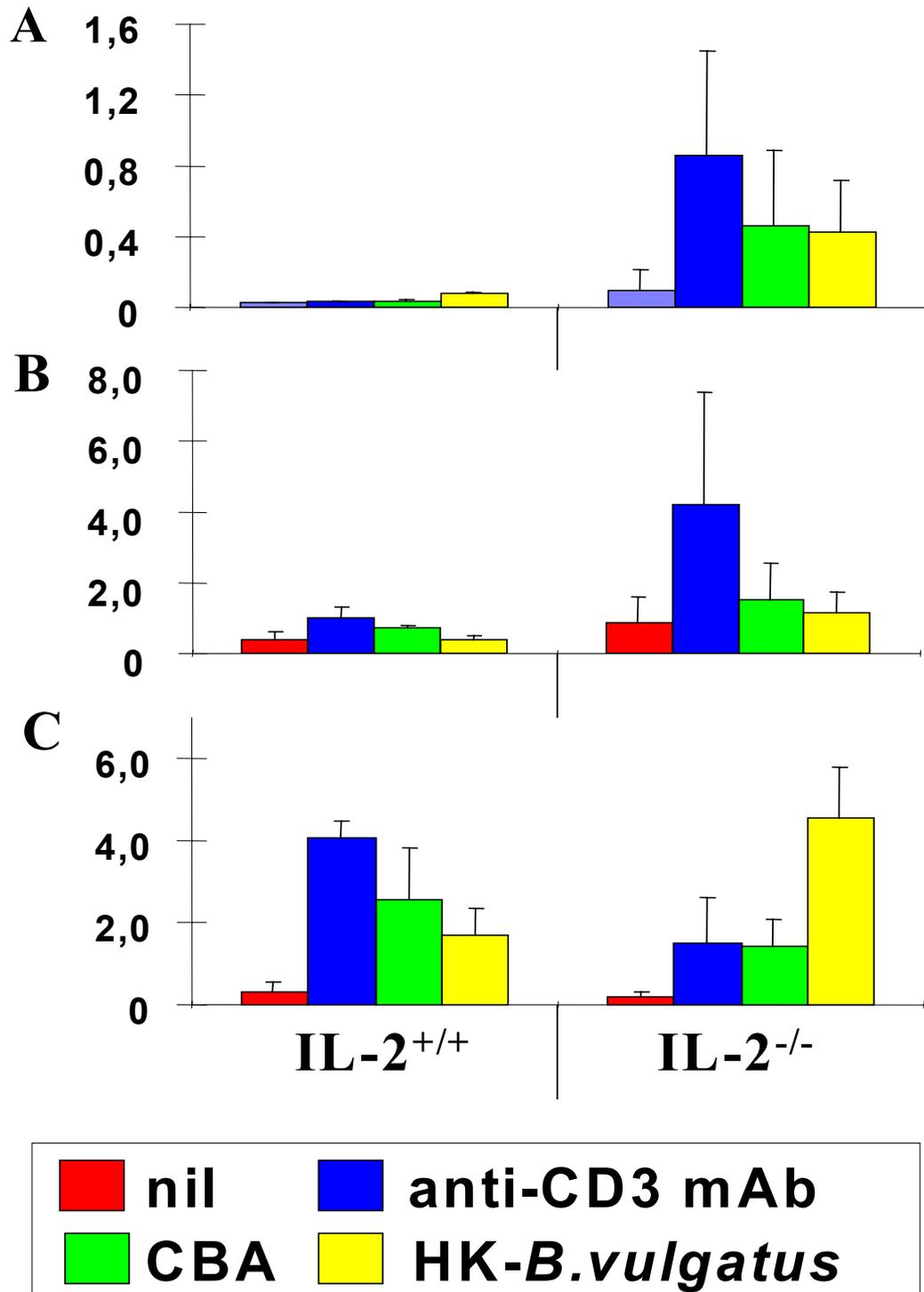


Abbildung 15. IL-10 Produktion in Gegenwart bakterieller Antigene

Von 20 Wochen alten, SPF-gehaltenen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen wurden Kolon_{IEL} (A), Kolon_{LPL} (B) und Milzzellen (C) isoliert und in Gegenwart der genannten Stimuli kultiviert. Die Zellkultur erfolgte unter Zusatz von 20 U/ml rekombinatem IL-2. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 bestimmt. Die Nachweisgrenze des ELISA lag bei 30 pg/ml. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichungen.

Wie *Abbildung 15* verdeutlicht, wurde von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} in der Gegenwart von bakteriellen Antigenen in der Tat mehr IL-10 produziert als in der Zellkultur mit reinem Medium. Besonders bei der Stimulation von Kolon_{IEL} von IL-2^{-/-} Mäusen war die IL-10 Menge bedeutend höher als bei Kolon_{IEL} von IL-2^{+/+} Mäusen (in Gegenwart von IL-2 und CBA generierten Kolon_{IEL} aus IL-2^{+/+} SPF-Mäusen 36 pg/ml IL-10, entsprechende Zellen von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen aber 460 pg/ml). Gleichzeitig fällt jedoch auf, daß lymphoide Zellen aus der Milz insbesondere in Gegenwart von HK-*B. vulgatus* wesentlich mehr IL-10 produzieren, als bei Stimulation durch anti-CD3 mAb (für Milzzellen von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen unter Zusatz von IL-2 4560 pg/ml respektive 1495 pg/ml IL-10). Darum erscheint es sehr wahrscheinlich, daß zumindest bei Kultur von Milzzellen neben T-Zellen andere Zelltypen maßgeblich an der IL-10 Produktion beteiligt sind. Da bei Kultur von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} die Menge an IL-10 in Gegenwart der bakteriellen Antigene nicht größer war als bei Stimulation durch anti-CD3 mAb, ist nicht klar, ob auch hier andere als T-Zellen zur IL-10 Produktion beitragen.

Zusammenfassend deuten diese Daten auf eine durch bakterielle Antigene induzierte IL-10 Produktion durch Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} hin. Möglicherweise tragen neben T-Zellen andere Zelltypen hierzu bei.

4.5.2.2 Analyse der Rolle von IL-10 in den Zellkulturexperimenten

Wie in Abschnitt 4.5.2.1 erläutert, führte der Zusatz von bakteriellen Antigenen zur Kultur von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} von Mäusen mit Kolitis nicht zu einer Zunahme der Produktion des Kolitis-assoziierten Zytokins IFN- γ , sondern zu einer vermehrten Bildung des vorrangig immunsuppressiv wirkenden Zytokins IL-10. Durch den Zusatz von monoklonalen Antikörpern, die die biologische Aktivität von IL-10 blockieren, wurde die Bedeutung dieses Zytokines in dem eingesetzten Zellkultursystem untersucht. *Abbildung 16* zeigt die Ergebnisse.

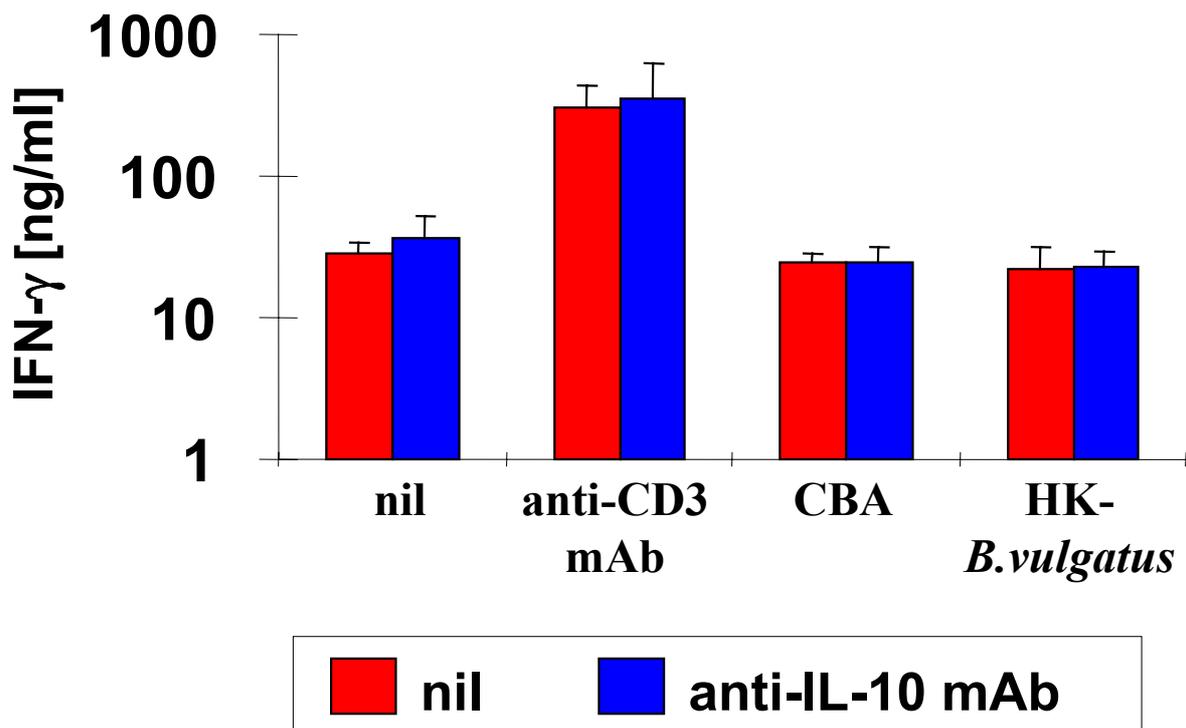


Abbildung 16. Einfluß von Interleukin-10 auf die IFN- γ Produktion

Kolon_{LPL} von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis wurden isoliert und in Gegenwart der angegebenen Stimuli und 20 U/ml rekombinanten IL-2 kultiviert. Wo angegeben, wurde zusätzlich 0,05 μ g/ml inaktivierender anti-IL-10 mAb zugesetzt. Nach 44 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturüberstände geerntet und darin IFN- γ mittels ELISA quantitativ bestimmt. Die Nachweisgrenze des ELISA war 1ng/ml. Die Abbildung faßt die Resultate von drei unabhängigen Experimenten zusammen.

Durch den Zusatz von blockierenden anti-IL-10 mAb wurde keine über die Negativkontrolle (nil) hinausgehende IFN- γ Produktion in der Gegenwart von bakteriellen Antigenen erreicht. Dies bedeutet, daß IL-10 nicht oder nicht alleine für das Ausbleiben der IFN- γ Produktion in Gegenwart der bakteriellen Antigene verantwortlich ist. Da aber auch TGF- β 1, ein weiteres Zytokin mit zentraler regulatorischer Funktion im GALT [85] in Gegenwart der bakteriellen Antigene nicht vermehrt gebildet wurde (Daten nicht gezeigt), ist es unwahrscheinlich, daß suppressive Zytokine in-vitro zu einer Kaschierung proinflammatorischer Florareaktivität von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} führen.

4.5.2.3 Aufklärung der zellulären Quelle von IL-10

Ausgehend von der Hypothese der pathologisch gesteigerten T-Zellreaktivität gegenüber Floraantigenen war die Identifizierung der IL-10 produzierenden Zellen von großem Interesse. Neben T_H2-Zellen sind besonders Makrophagen, aber auch andere Zelltypen in der Lage, IL-

IL-10 zu sekretieren [86]. Für Makrophagen ist beschrieben, daß die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) zu einer verzögerten IL-10 Sekretion führt [87]. Andere Arbeiten zeigten die unspezifische Suppression spezifischer Immunantworten bei in-vitro Restimulation mit Zellysaten von *E. coli* IL-10, wodurch das Erkennen der spezifischen Immunität erschwert werden kann [88]. Da zu erwarten ist, daß LPS als Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien in den hier verwendeten Antigenaufbereitungen HK-*B.vulgatus* und CBA vorkommt, wurde PolymyxinB zur Inaktivierung von LPS zur Zellkultur zugesetzt [89]. Abbildung 17 zeigt die Resultate.

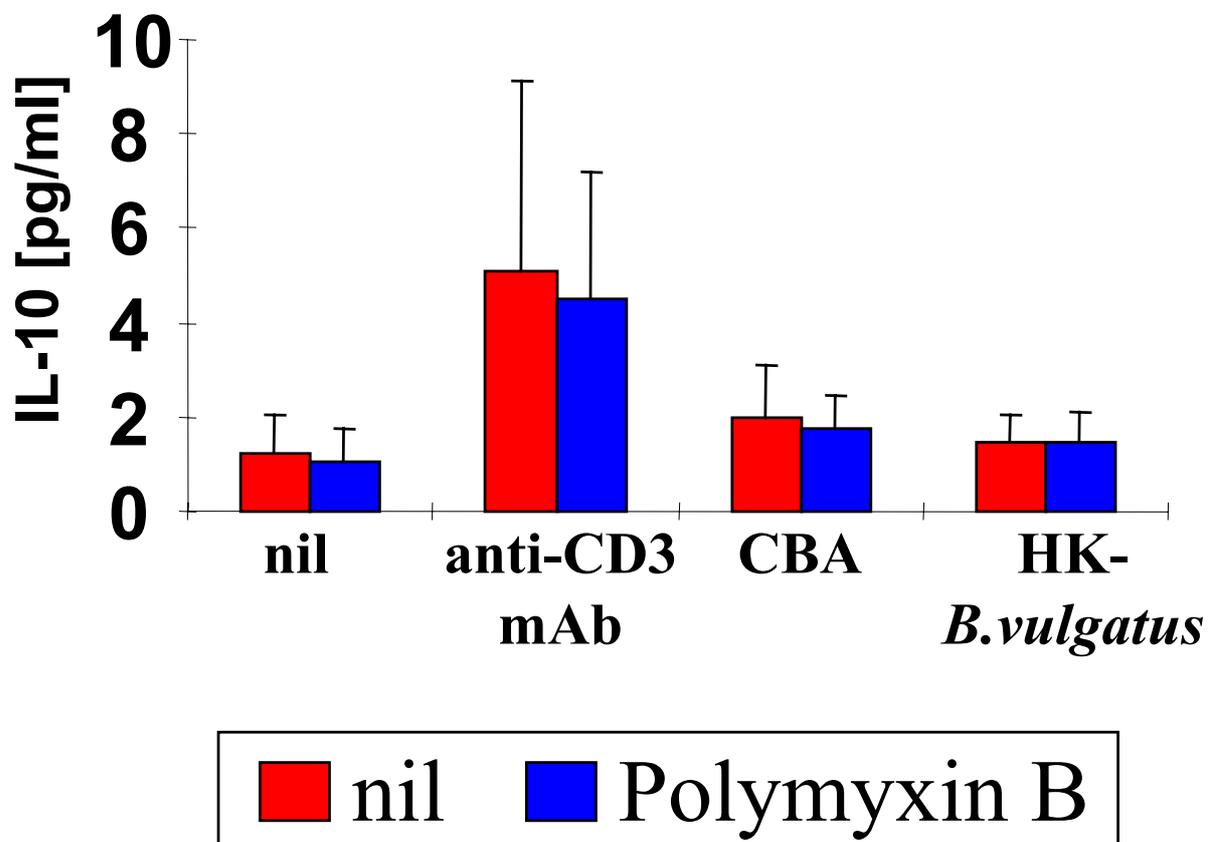


Abbildung 17. Produktion von IL-10 durch Kolon_{LPL}

Kolon_{LPL} von SPF-gehaltenen, IL-2^{-/-} Mäusen mit Kolitis wurden isoliert und in Gegenwart von HK-*B.vulgatus* unter Zusatz von 20 U/ml rekombinanten IL-2 mit den angegebenen Stimuli kultiviert. Wo angegeben, wurde zusätzlich 10 µg/ml Polymyxin B zur Komplexierung von LPS zugesetzt. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturüberstände geerntet und darin IL-10 mittels ELISA quantitativ bestimmt. Die Nachweisgrenze des ELISA war 30 pg/ml. Die Abbildung faßt die Resultate von drei unabhängigen Experimenten zusammen.

Die Inaktivierung von LPS durch PolymyxinB führte zu keiner deutlichen Reduktion von IL-10. Dies erlaubt den Rückschluß, daß LPS nicht maßgeblich an der Induktion von IL-10 durch bakterielle Antigene beteiligt ist.

Der Versuch, durch die Depletion von CD4⁺ Zellen vor der Zellkultur die zelluläre Quelle von IL-10 zu identifizieren, lieferte keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

4.7 Untersuchung der Übertragbarkeit der Kolitis durch adoptiven Transfer von T-Zelllinien

4.6.1 Charakterisierung der in-vitro Eigenschaften CBA-spezifischer Zelllinien

Frisch isolierte Kolon_{LPL} und Milzzellen von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis sowie Milzzellen von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen wurden in regelmäßigen Abständen mit CBA (*colonic bacterial antigen*) und IL-2 stimuliert. Unter diesen Konditionen sollten CBA-spezifische T-Zellen expandieren, so daß ihre Eigenschaften besser analysierbar werden. Die auf diese Art etablierten Zelllinien wurden durchflusszytometrisch charakterisiert (*Tabelle 12*).

Während die Milzzelllinien SW98.1 und SK98.2 sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen enthielten, fanden sich in der Kolon_{LPL}-Zelllinie LCK98 ausschließlich CD4⁺ T-Zellen. Für diese Untergruppe von T-Zellen wurde gezeigt, daß sie für die Entstehung der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus essentiell ist [^{73, 74}]. Die sekretierten Zytokine der etablierten Zelllinien werden in *Tabelle 13* zusammengefasst.

Tabelle 12. Phänotyp CBA-spezifischer Zelllinien

Name der Zelllinie	LCK98		SW98.1		SK98.2	
	Kolon _{LPL} IL-2 ^{-/-} frisch isoliert	6 Wochen Zellkultur	Frisch isoliert	Milz IL-2 ^{+/+} 6 Wochen Zellkultur	frisch isoliert	Milz IL-2 ^{-/-} 6 Wochen Zellkultur
T-Zellen	74,6	99,0	nd	77,3	71,7	43,3
CD4 ⁺	27,1	2,7	nd	23,2	33	59,4
CD8 ⁺	98,9	98,8	nd	97,7	98,6	98,0
αβTCR ⁺	1,1	<1	nd	<1	<1	<1
γδTCR ⁺	nd	30,0	nd	17,0	nd	5,3
CD25 ⁺	nd	63,1	nd	10,2	nd	17,7
CD69 ⁺						
T-Zellen : B-Zellen	59,5 : 28,1	93,5 : <1	nd	97,7 : 4,7	nd	90,5 : 2,7

Die angegebenen Zellpopulationen wurden aus IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis respektive IL-2^{+/+} Mäusen isoliert und mit CBA (10 µg/ml) und rekombinantem IL-2 (20 U/ml) wie in *Methoden* beschrieben kultiviert. Sechs Wochen vor und nach Beginn der Kultivierung wurden die lymphoiden Zellen durchflusszytometrisch analysiert. CD3⁺ Zellen wurden als T-Zellen und Immunglobulin⁺ Zellen (sIg⁺, engl. *surface immunoglobulin*) als B-Zellen definiert.

Tabelle 13. Sekretierte Zytokine CBA-spezifischer Zelllinie

Zellpopulation	Name der Zelllinie	Stimulus	Sekretierte Zytokine		
			IFN- γ [ng/ml]	IL-10 [pg/ml]	TGF- β 1 [pg/ml]
Kolon _{LPL} IL-2 ^{-/-}	LCK98	nil	<1	21925,8	1336,9
		anti-CD3 mAb	20,2	>80.000	2007,1
Milz IL-2 ^{+/+}	SW98.1	nil	<1	<30	430,2
		Concanavalin A	422,8	1012,4	485,8
Milz IL-2 ^{-/-}	SK98.2	nil	<1	169,7	413,5
		Concanavalin A	386,3	3163,4	549,8

Die angegebenen Zellpopulationen wurden aus IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis respektive IL-2^{+/+} Mäusen isoliert und mit CBA (10 μ g/ml) und rekombinantem IL-2 (20 U/ml) wie in *Methoden* beschrieben kultiviert. Nach mehr als sechs Monaten Kultivierung wurden die Zellkulturüberstände 44 (IFN- γ) und 72 Stunden (IL-10 und TGF- β 1) nach Zugabe von CBA geerntet und die genannten Zytokine darin mittels ELISA quantitativ bestimmt. Die Nachweisgrenzen: IFN- γ 1 ng/ml; IL-10 und TGF- β 1: 30 pg/ml

Auf unspezifische Stimulation (Lektin Concanavalin A und anti-CD3 mAb) produzierte LCK98 enorme Mengen des regulatorischen Zytokins IL-10. Ein weiteres, suppressives Zytokin, TGF- β 1 wurde ebenfalls in nennenswertem Umfang gebildet. Im Gegensatz dazu wurden nur geringe Mengen des proinflammatorischen Zytokines IFN- γ produziert. Diese Daten entsprechen den Befunden der Restimulationsexperimente mit frisch isolierten Zellen (s. Abschnitt 4.5.1) und belegen die Anwesenheit von potentiell regulatorischen T-Zellen innerhalb der Kolon_{LPL} trotz der massiven Entzündung.

Die Milzzelllinien SW98.1 und SK98.2 produzierten dagegen deutlich mehr IFN- γ und weniger IL-10 als die Kolon_{LPL}-Zelllinie. Dieses eher proinflammatorische Zytokinprofil von T-Zellen peripheren Ursprunges zeigt, daß die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen innerhalb der Kolon_{LPL} ein Charakteristikum des GALT ist, das man in peripheren Lymphorganen nicht findet. Dies steht im Einklang mit der gängigen Lehrmeinung, daß im GALT eine besonders strenge immunologische Regulation notwendig ist, um eine überschießende Immunantwort gegen harmlose Antigene der Darmflora zu unterdrücken.

4.6.2 Adoptiver Transfer CBA-spezifischer Zellen

4.6.2.1 Beurteilung der klinischen Manifestationen der Kolitis mit einem Score

Für IL-2^{-/-} Mäuse ist nur der Serumgehalt an Serum-Amyloid A als Parameter beschrieben, der es erlaubt, den Verlauf der Kolitis an der lebenden Maus zu verfolgen [90]. Eine regelmäßige Bestimmung dieses Parameters kommt allerdings nicht in Frage, da die Mäuse bereits eine ausgeprägte Anämie haben und eine weitere Blutentnahme ein zu großes Risiko darstellen würde. Darum wurde der Verlauf der Kolitisentwicklung anhand der Beobachtung klinischer Parameter durchgeführt, die im klinischen Kolitis-Score zusammengefasst werden (s. 2.11.2.2). Folgende *Abbildung 18* zeigt den typischen zeitlichen Verlauf des Kolitis-Scores von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen.

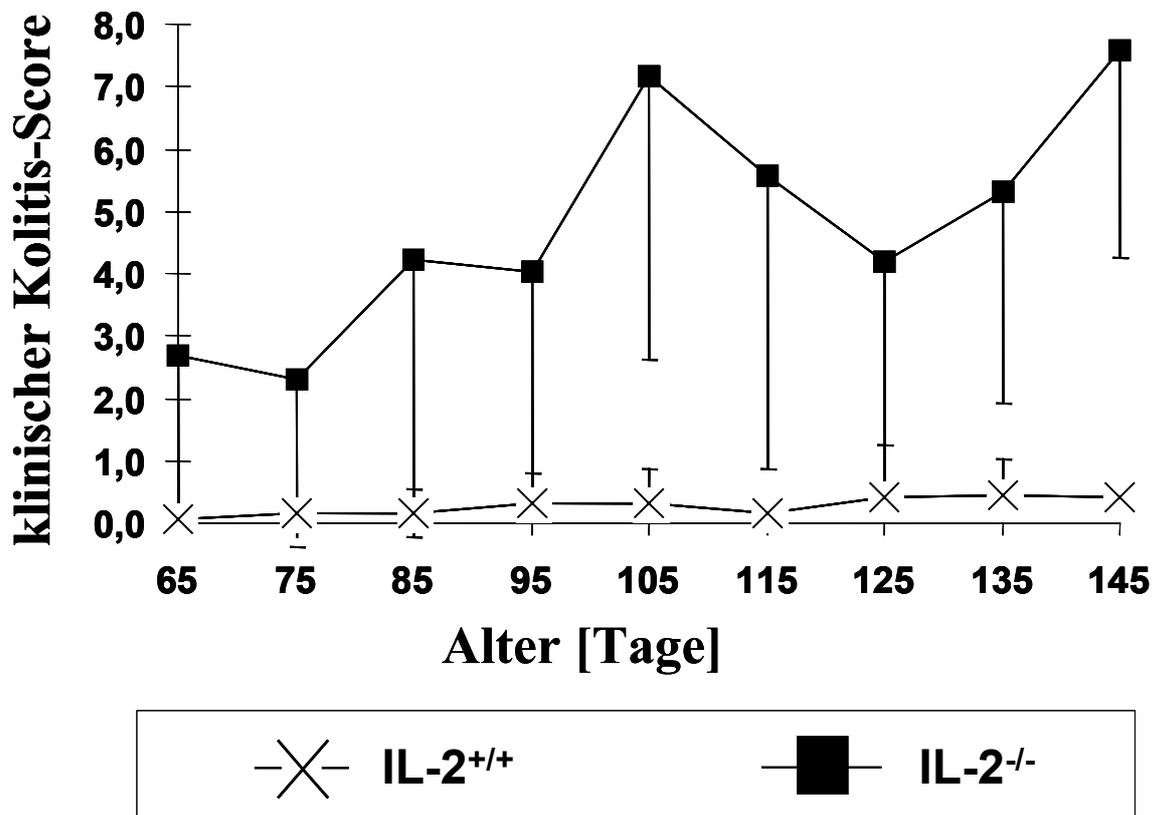


Abbildung 18. Verlauf des klinischen Kolitis-Scores SPF-gehaltener Mäuse

10 unter SPF-Bedingungen gehaltene Mäuse des angegebenen Genotypes wurden regelmäßig auf klinische Symptome einer Kolitis untersucht. Die Resultate sind im klinischen Kolitis-Score zusammengefasst, wie in *Methoden* beschrieben. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt.

Man erkennt, daß mit zunehmendem Alter die Kolitissymptomatik von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen zunahm. Eine mittlere Kolitis entsprach einem Kolitis-Score von 2,0 – 4,5. Höhere Werte kennzeichneten eine schwere Kolitis. Gleichmaßen wird auch deutlich, daß große Schwankungen auftraten, die sowohl durch die verschiedene Kinetik der Kolitisentwicklung individueller Mäuse, als auch durch die unterschiedlich starke Ausprägung der untersuchten Symptome in erkrankten Tieren zustande kamen. Darum kann der klinische Kolitis-Score nur zur groben Beurteilung des Krankheitszustandes der Mäuse herangezogen werden.

4.6.2.2 Verlauf des Kolitis-Scores adoptiver transferierter Mäuse

4.6.2.2.1 Adoptiver Transfer der Kolon_{LPL}-Zelllinie von IL-2^{-/-} Mäusen (LCK98)

Das gefundene Zytokinprofil von LCK98 läßt aufgrund seiner Polarisierung zu regulatorischen Zytokinen (*Tabelle 13*) eine kolitogene Kapazität dieser Zellen eher unwahrscheinlich erscheinen. Um nun das in-vivo Verhalten dieser Zellen direkt zu untersuchen, wurden sie adoptiv auf syngene Empfängermäuse transferiert. Als solche wurden sowohl gesunde IL-2^{+/+} SPF-Mäuse, als auch IL-2^{-/-} SPF-Mäuse vor dem Auftreten einer klinischen Kolitissymptomatik verwendet. Als Kontrolle wurde Mäusen der selben Zucht PBS injiziert. In regelmäßigen Abständen wurden die Empfängertiere auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht. Die Resultate des Transfers von 8×10^6 LCK98-Zellen pro Tier auf IL-2^{-/-} Mäuse in SPF-Haltung sind in *Abbildung 19* dargestellt.

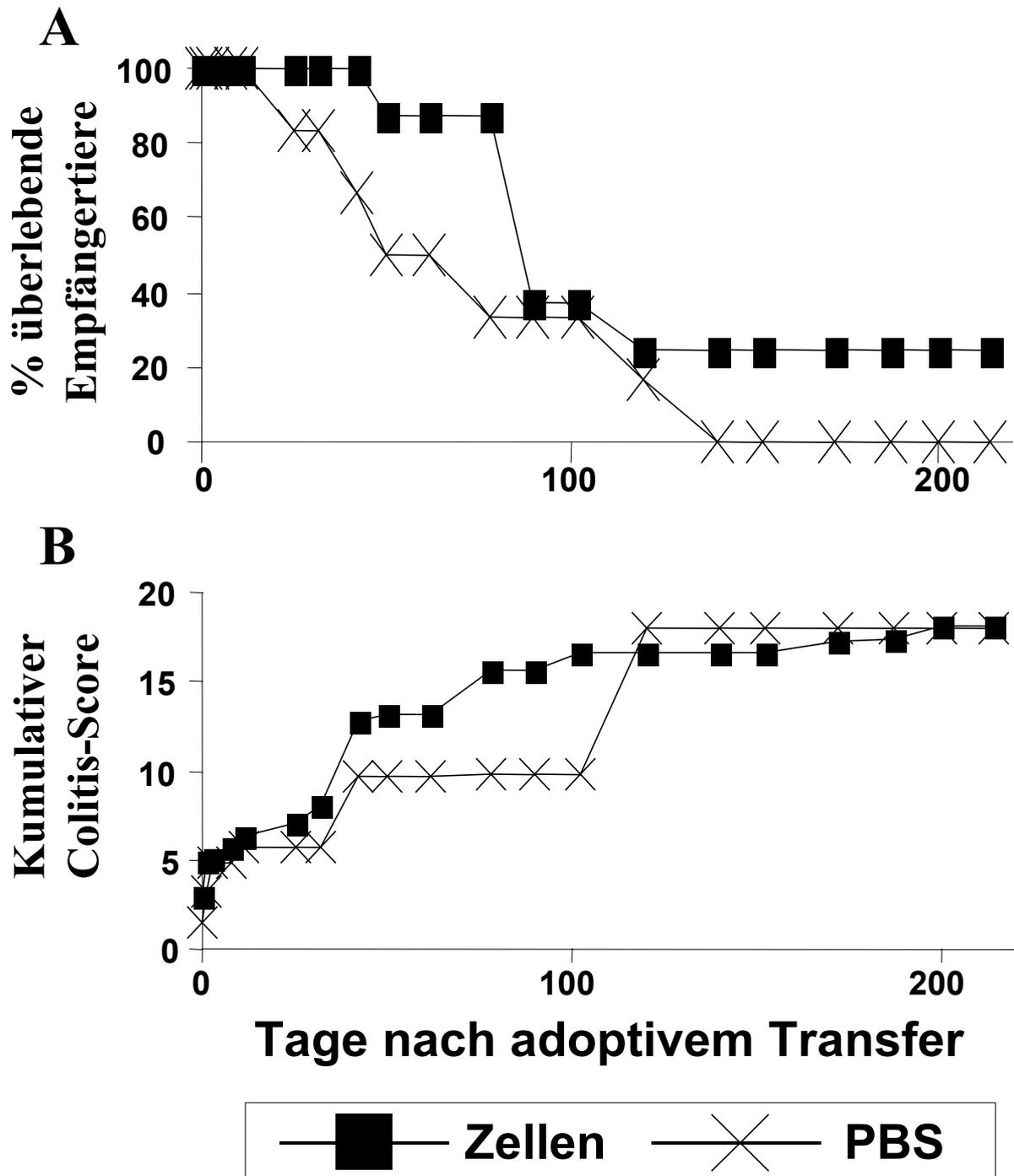


Abbildung 19. Adoptiver Transfer von LCK98-Zellen

Ausgehend von Kolon_{LPL} von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis wurde durch wiederholte Stimulation mit CBA eine Zelllinie generiert wie in *Methoden* beschrieben. 8×10^6 Zellen/Maus dieser Zelllinie (LCK98) wurden adoptiv auf IL-2^{-/-} SPF-Mäuse ohne Kolitis (8 Tiere) übertragen. Als Kontrolltiere wurden IL-2^{-/-} SPF-Mäuse ohne Kolitis (6 Tiere) mit PBS behandelt. Die Empfängertiere wurden für 30 Wochen in regelmäßigen Abständen auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht. Die Ergebnisse sind als Überlebenskinetik (A) und als kumulativer Colitis-Scores (B) dargestellt. Der kumulative Colitis-Score wurde auf 6 Tiere normalisiert.

Abbildung 19 verdeutlicht, daß sowohl die Überlebensdauer, als auch die Entwicklung des klinischen Kolitis-Scores der IL-2^{-/-} Empfängertiere keine deutlichen Unterschiede zu den Kontrolltieren aufwiesen. Die durchschnittliche Überlebensdauer von IL-2^{-/-} SPF-Empfängermäusen lag leicht über der von PBS-behandelten IL-2^{-/-} SPF-Kontrollmäusen (82,3 versus 61,5 Tage). Doch die statistische Auswertung (*Log Rank-Test*) ergab keine Signifikanz. Auch der Transfer von LCK98-Zellen auf IL-2^{+/+} Mäuse führte zu keinen deutlichen klinischen Anzeichen einer Kolitis (Daten nicht gezeigt). Ebenso wenig zeigten die histologischen Untersuchungen der Kolonmukosa der Empfängermäuse Hinweise auf eine Entzündung. Zusammenfassend kann man feststellen, daß es nicht möglich ist, durch adoptiven Transfer von LCK98-Zellen eine Kolitis mit klinischer Symptomatik in IL-2^{+/+} Empfängermäusen auszulösen, beziehungsweise in IL-2^{-/-} Empfängermäusen wesentlich zu beeinflussen.

4.6.2.2.2 Adoptiver Transfer der Milzzelllinie von IL-2^{-/-} Mäusen (SK98.2)

Die Resultate des adoptiven Transfers der CBA-spezifischen Milzzelllinie SK98.2 auf IL-2^{-/-} SPF-Mäuse sind in *Abbildung 20* zusammengefasst.

Abbildung 20 zeigt, daß der Transfer von SK98.2-Zellen auf IL-2^{-/-} Mäuse keine deutliche Beschleunigung der Entwicklung einer Kolitis zur Folge hatte. Trotz der höheren Produktion von IFN- γ und der geringeren Menge von IL-10 induzierte auch diese Zelllinie im adoptiven Transfer keine Beschleunigung der Kolitis. Zwar war die durchschnittliche Überlebensdauer von Mäusen, die Zellen erhalten haben, etwas kürzer als die der PBS-behandelten Kontrolltiere (139 versus 163 Tage), doch dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (*Log Rank-* und *Cox-Test*).

Der adoptive Transfer auf IL-2^{+/+} Mäuse führte weder zu einer klinischen Kolitissymptomatik noch zu einer histologisch nachweisbaren Entzündungsreaktion (Daten nicht gezeigt).

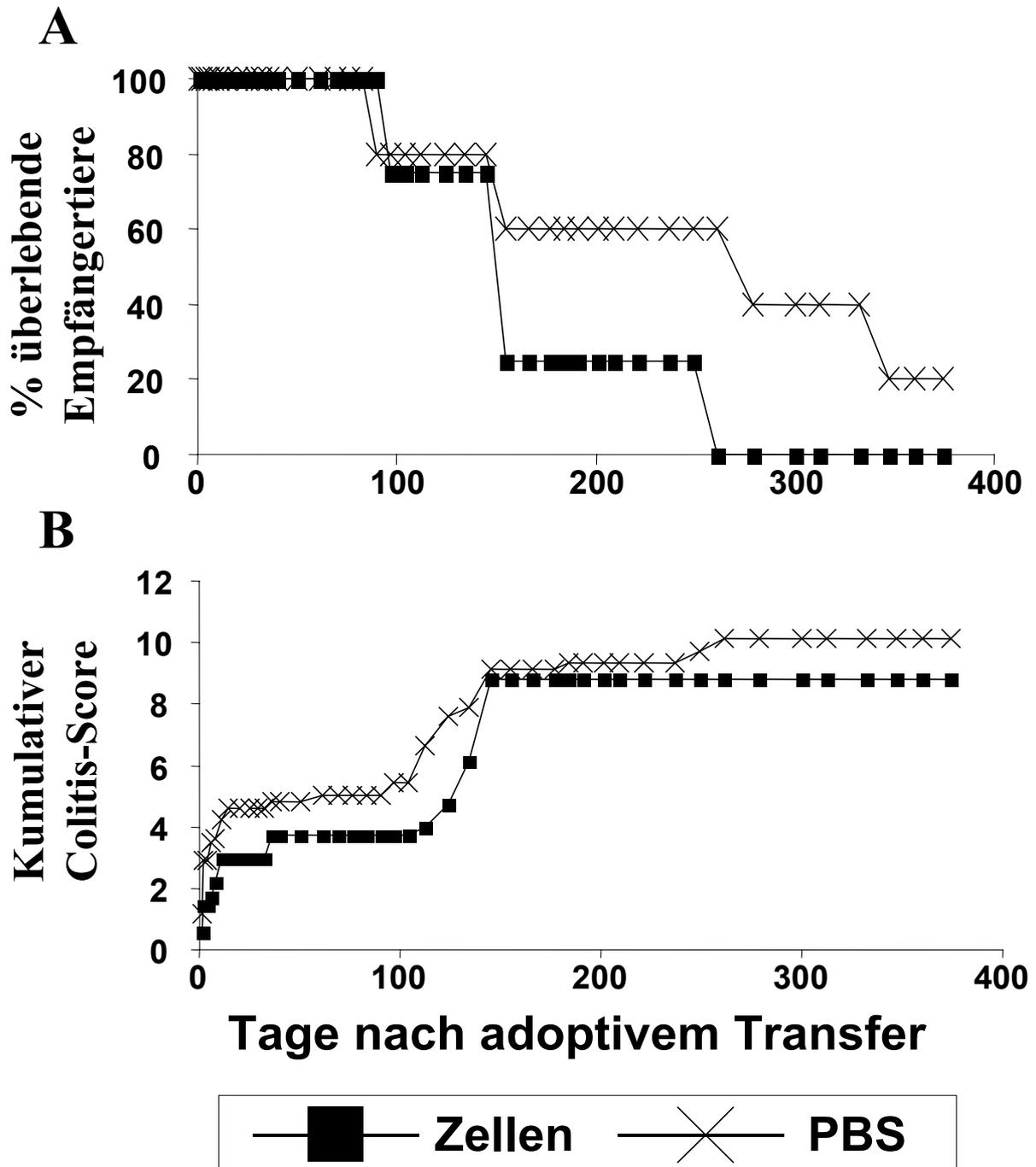


Abbildung 20. Adoptiver Transfer von SK98.2-Zellen

Ausgehend von Milzzellen IL-2^{-/-} SPF-Mäuse mit Kolitis wurde durch wiederholte Stimulation mit CBA eine Zelllinie generiert wie in *Methoden* beschrieben. 8x10⁶ Zellen/Maus dieser Zelllinie (SK98.2) wurden adoptiv auf IL-2^{-/-} SPF-Mäuse ohne Kolitis (4 Tiere) übertragen. Als Kontrolltiere wurden IL-2^{-/-} SPF-Mäuse ohne Kolitis (5 Tiere) mit PBS behandelt. Die Empfängertiere wurden für >50 Wochen in regelmäßigen Abständen auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht. Die Ergebnisse sind als Überlebenskinetik (A) und als kumulativer Colitis-Scores (B) dargestellt. Der kumulative Colitis-Score wurde auf 4 Tiere normalisiert.

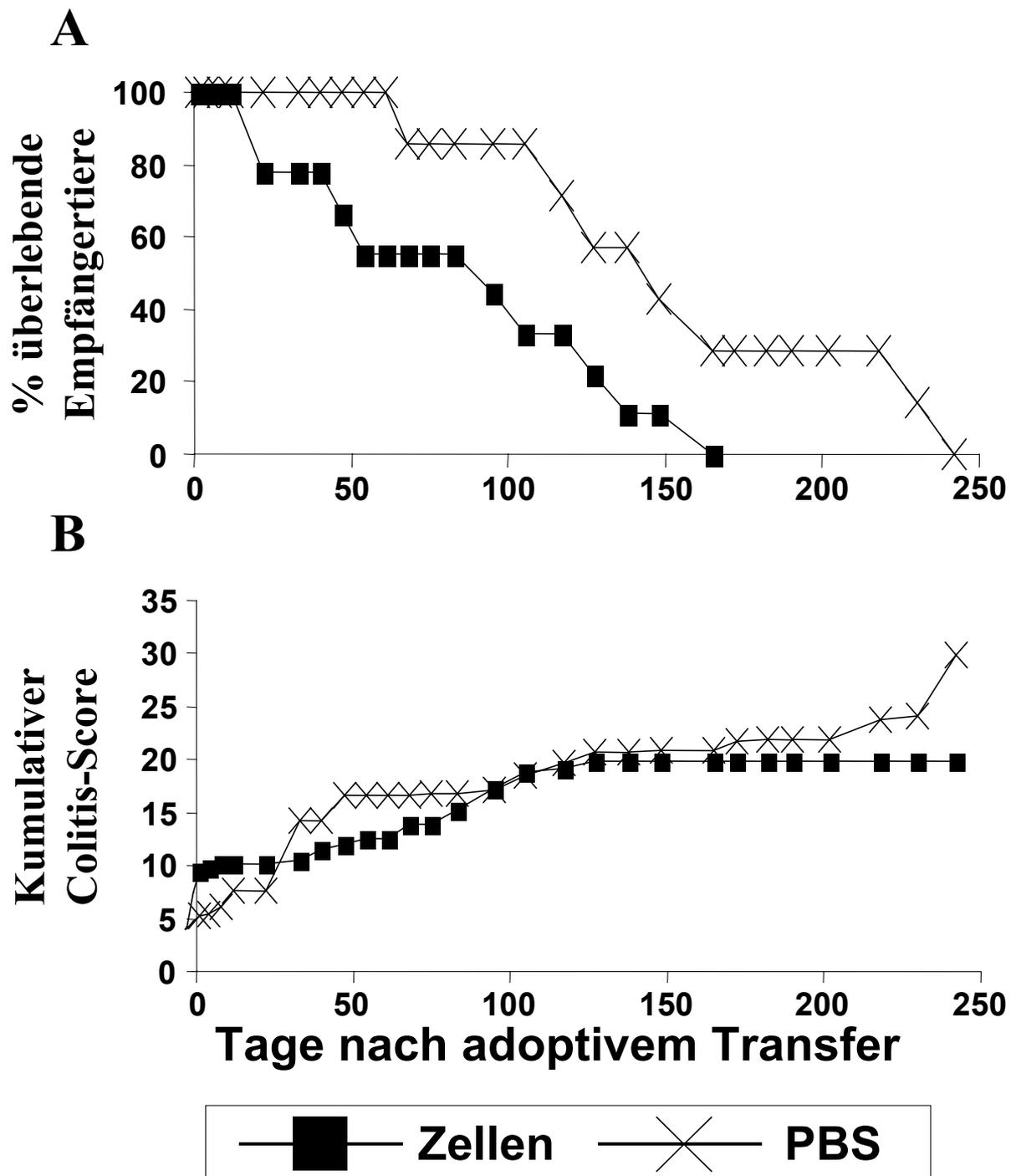


Abbildung 21. adoptiver Transfer von SW98.1-Zellen

Ausgehend von Milzzellen von IL-2^{+/+} SPF-Mäuse wurde durch wiederholte Stimulation mit CBA eine Zelllinie generiert wie in *Methoden* beschrieben. 8x10⁶ Zellen/Maus dieser Zelllinie (SW98.1) wurden adoptiv auf IL-2^{-/-} SPF-Mäuse ohne Kolitis (9 Tiere) übertragen. Als Kontrolltiere wurden IL-2^{-/-} SPF-Mäuse ohne Kolitis (7 Tiere) mit PBS behandelt. Die Empfängertiere wurden für 35 Wochen in regelmäßigen Abständen auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht. Die Ergebnisse sind als Überlebenskinetik (A) und als kumulativer Colitis-Scores (B) dargestellt. Der kumulative Colitis-Score wurde auf 7 Tiere normalisiert.

Um zu überprüfen, ob CBA-spezifische T-Zellen von IL-2^{+/+} Mäusen in der Lage sind, das Entstehen der Kolitis SPF-gehaltener IL-2^{-/-} Mäuse zu verhindern oder zu verlangsamen, wurde eine CBA-spezifische Zelllinie aus Milzzellen adulter IL-2^{+/+} Mäusen generiert (SW98.1) und adoptiv auf IL-2^{-/-} SPF-Mäuse vor dem Auftreten einer Kolitissymptomatik transferiert. *Abbildung 21* faßt die Daten zusammen.

Es ist erkennbar, daß sich die Überlebensdauer von Empfängertieren von SW98.1-Zellen verringerte (Kontrollgruppe 148 Tage, Zellempfänger 75 Tage). Der statistische Vergleich der Überlebensdauer nach adoptivem Transfer ergab einen nicht signifikanten Trend zu verkürzter Überlebensdauer nach Zelltransfer ($p < 0,1$). Dies steht im Einklang mit dem Befund, daß SW98.1-Zellen das am meisten proinflammatorisch geprägte Zytokinprofil aufwiesen (s. *Tabelle 13*).

4.7 Besiedlung adulter KF-Mäuse mit einer SPF-Flora

Die Substitution von IL-2 in IL-2^{-/-} Mäusen konnte nur dann die extraintestinalen Erkrankungen (autoimmune, hämolytische Anämie; Lymphozytenaktivierung mit Milzvergrößerung) dieser Tiere verhindern, wenn sie innerhalb der ersten 10 Tage nach Geburt einsetzte [⁹¹]. Dies impliziert einerseits, daß bereits sehr früh in der Entwicklung der IL-2^{-/-} Maus ein endogener Defekt vorliegt und andererseits, daß Umweltantigene bereits lange vor der Ausprägung der eigentlichen Kolitis den Krankheitsprozeß initiieren. Um zu überprüfen, ob IL-2^{-/-} Mäuse nur während eines kurzen Abschnittes ihrer Entwicklung für die antigene Initiierung der Kolitis empfänglich sind oder ob diese Eigenschaft auch in adulten Mäusen erhalten bleibt, wurden erwachsene IL-2^{-/-} Mäuse aus der KF-Zucht in die SPF-Haltung überführt. Die Etablierung der wichtigsten anzüchtbaren aeroben und anaeroben Keime der Darmflora in diesen Mäusen erfolgte binnen weniger Tage und wurde durch Ausplattung von Fäzes bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Mäuse wurden in regelmäßigen Abständen auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht und die Resultate als klinischer Kolitis-Score ausgedrückt. Die Entwicklung des Kolitis-Scores der Tiere ist in *Abbildung 22* zusammengefasst.

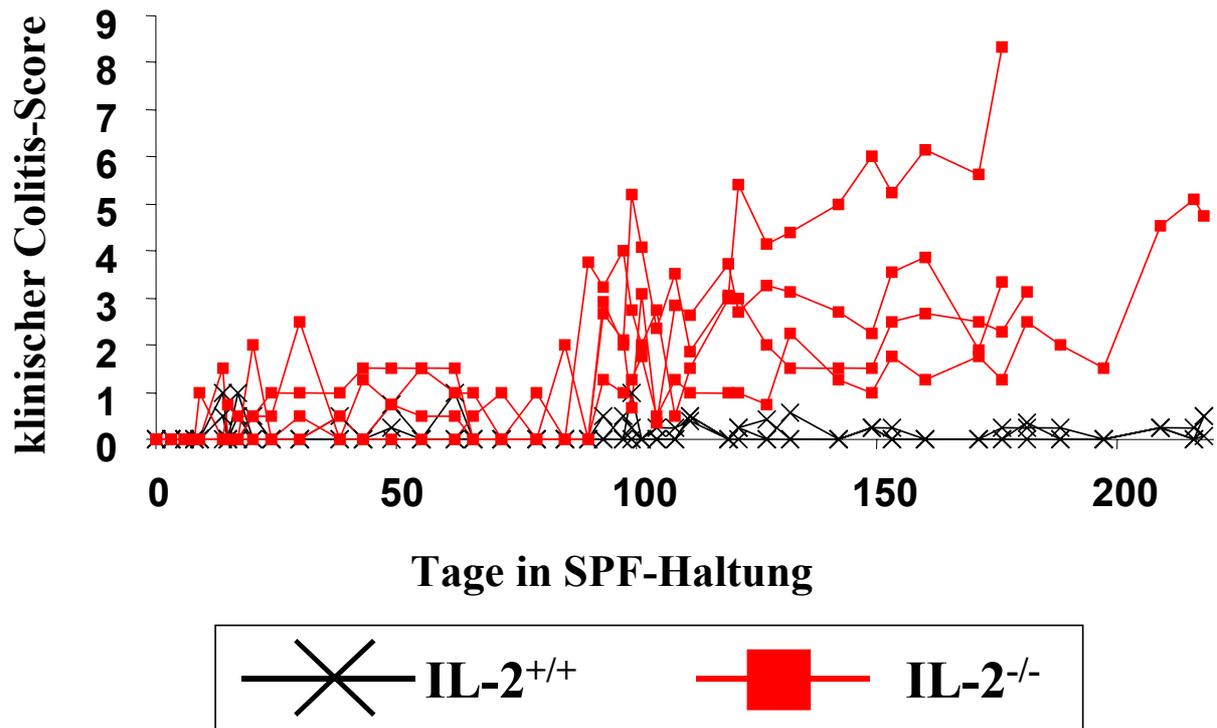


Abbildung 22. Verlauf des Kolitis-Scores nach Erstkontakt mit SPF-Flora

10 Wochen alte IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäuse (3 bzw. 4 Tiere) wurde aus KF-Umgebung in die SPF-Zucht überführt und nachfolgend für >30 Wochen in regelmäßigen Abständen auf klinische Anzeichen einer Kolitis untersucht. Die Resultate sind als klinischer Kolitis-Score dargestellt, wie in *Methoden* erläutert.

Die Kolitis der neu besiedelten Tiere folgte nach dem Überführen in die SPF-Zucht weitgehend der Kinetik der Kolitis von IL-2^{-/-} Mäusen, die von Geburt an unter SPF-Konditionen gehalten werden (vgl. *Abbildung 18*). So bestand bei beiden Gruppen eine klinisch inapparente Phase von rund 10 Wochen zwischen dem Erstkontakt mit der Umgebungsflora und Auftauchen einer Kolitissymptomatik. Dies bedeutet, daß die Empfänglichkeit für die mikrobielle Kolitisinduktion nicht auf ein zeitliches Fenster der Entwicklung der Tiere beschränkt ist, sondern auch in der erwachsenen Maus noch induziert werden kann.

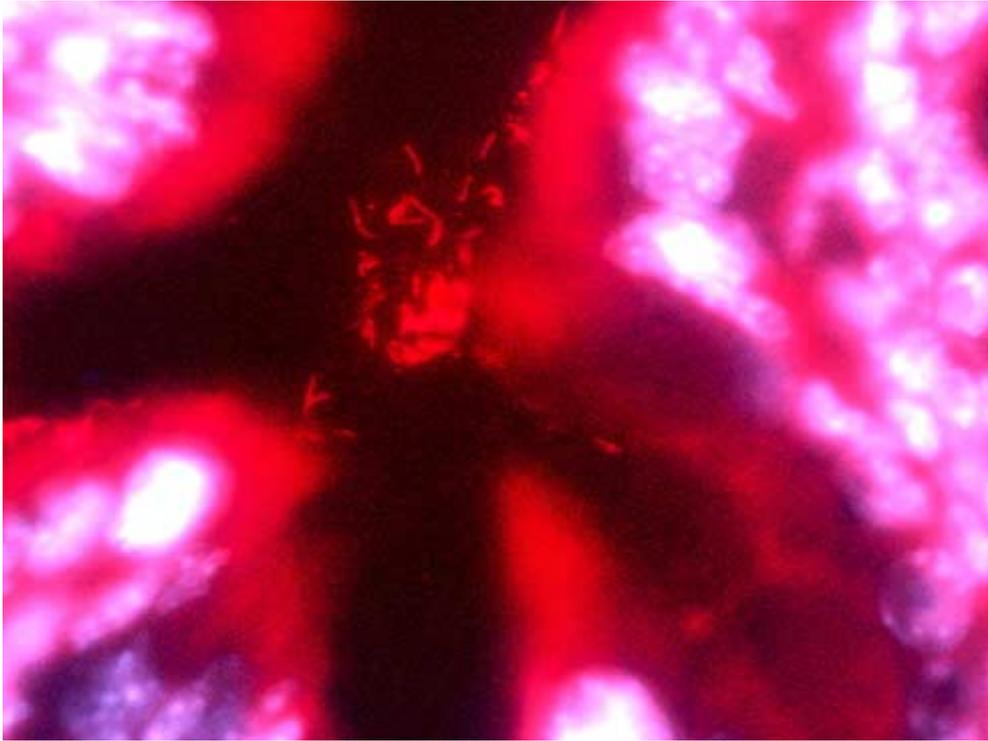
4.8 Analyse der Kolitis-induzierenden Eigenschaften ausgewählter Vertreter der murinen Darmflora

Die physiologische Darmflora übt einen positiven Effekt auf den Wirt aus. Dieser umfasst neben der Bereitstellung von wichtigen Stoffwechselfaktoren wie kurzkettigen Fettsäuren und Vitamin K [2] auch das Verhindern der Ansiedlung pathogener Keime [3]. Zusammenfassend spricht man hierbei von "probiotischen Effekten" [92]. Man nimmt an, daß die verschiedenen, im Darm normalerweise vorkommenden Keime auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Wirtsorganismus wechselwirken.

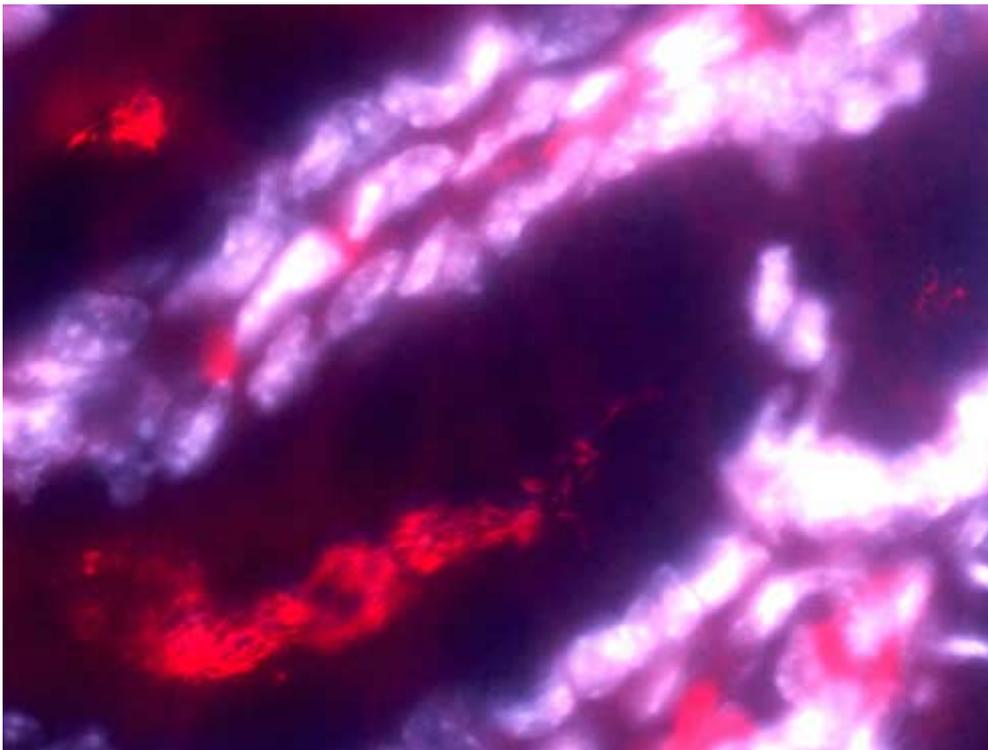
Um die kolitogene Potenz wichtiger Keime der Darmflora beurteilen zu können, wurden IL-2^{-/-} und IL-2^{+/+} Mäuse mit ausschliesslich einem oder mehreren ausgewählten Keimen besiedelt. Diese Keime wurden zuvor aus dem Stuhl von Mäusen der für die vorliegende Arbeit verwendeten Mauszucht isoliert. Die artifizielle Besiedlung von Zuchttieren unter Isolationsbedingungen wird auch als „gnotobiotische Zucht“ bezeichnet. Die Haltung der Tiere erfolgte in keimdichten Isolatoren unter identischen Bedingungen wie in der Zucht keimfreier Mäuse (s. Methodenteil). Infolge der Aufzucht durch Elterntiere, die mit einem oder mehreren Keimen besiedelt waren, standen die Versuchstiere von Geburt an in Kontakt mit der jeweiligen Flora. Im Alter von 20 und 33 Wochen wurden die Tiere histologisch und mit der RT-PCR Methode auf Anzeichen einer Entzündungsreaktion im Kolon untersucht.

Im Rahmen der Untersuchungen an gnotobiotischen Mäusen wurde auch die Lokalisation der Bakterien im Kolon mit der FISH-Methode (engl. *fluorescence in-situ hybridization*) untersucht. Diese Methode basiert auf dem Nachweis von rRNA mit Oligonukleotiden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eub₃₃₈-Sonde eingesetzt, deren Sequenz komplementär zu einem konservierten Abschnitt der 16S-rRNA (ribosomale RNA) von Eubakterien ist. Die Menge an pro Bakterienzelle vorhandener ribosomaler RNA korreliert mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen [93].

Zum Vergleich zeigt *Abbildung 23* die typische Lokalisation von Bakterien im Kolon einer IL-2^{+/+} SPF-Maus. Epitheladhärierende Keime waren hier sehr häufig und in großer Zahl vorhanden. Das Kolonepithel war zu ungefähr gleichen Teilen diffus besiedelt, mit Bakterienclustern besiedelt (*Abbildung 23A*) oder frei von Bakterien. Die Mehrzahl der Krypten waren mit zahlreichen Bakterien gefüllt (*Abbildung 23B*).



A



B

Abbildung 23 Bakterielle Lokalisation im Kolon von SPF-Mäusen

Mittels der FISH-Methodik wurden Eubakterien mit der spezifischen Sonde Eub₃₃₈-Cy3 im 5µm Gefrierschnitt detektiert. Zur histologischen Orientierung wurde Nukleinsäure mit Di-Amino-Propidiumiodid gefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen einer 20 Wochen alten IL-2^{+/+}-Maus in 1000x Vergrößerung..

Neben der routinemäßigen Kontrolle des Besiedlungszustandes der gnotobiotischen Mäuse wurde bei den Versuchstieren eine quantitative Bestimmung der anzüchtbaren Keime (CFU; engl. *colony-forming unit*) im Stuhl durchgeführt. Die folgende Tabelle faßt die Daten von gnotobiotischen und SPF-Mäusen zusammen.

Tabelle 14. Keimzahl pro Gramm Fäzes von gnotobiotischen und SPF-Mäusen

Besiedlungsart	Bakterienspezies	CFU pro Gramm Fäzes
SPF	<i>B.vulgatus</i>	$1,10 \times 10^9 \pm 1,10 \times 10^9$
	<i>E. coli</i>	$3,72 \times 10^7 \pm 1,34 \times 10^8$
	<i>Clostridia</i> spp.	$2,56 \times 10^6 \pm 1,92 \times 10^6$
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>B.vulgatus</i>	$3,61 \times 10^9 \pm 2,29 \times 10^9$
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	$1,72 \times 10^{10} \pm 1,05 \times 10^{10}$
<i>Bacteroides vulgatus</i> & <i>Escherichia coli</i>	<i>B. vulgatus</i>	$1,29 \times 10^{10} \pm 1,35 \times 10^{10}$
	<i>E. coli</i>	$4,29 \times 10^{10} \pm 4,05 \times 10^{10}$
<i>Clostridium aff. innocuum</i> & <i>Clostridium. Clostridiiformis</i>	<i>C. aff. innocuum</i>	$4,15 \times 10^{10} \pm 3,18 \times 10^{10}$
	<i>C. clostridiiformis</i>	$3,43 \times 10^{10} \pm 3,06 \times 10^{10}$

Frischer Stuhl der jeweiligen Tiere wurde in LB-Medium durch Vortexen homogenisiert, mit PBS verdünnt und auf Selektivnährböden ausgeplattet wie im Methodenteil beschrieben. Die Kolonien der geeigneten Verdünnungsstufe wurden gezählt und typisiert (s. Methodenteil). Bei der CFU-Bestimmung im Stuhl von SPF-Mäusen wurden nur die genannten Bakterienspezies ausgewertet. Die CFU wurden pro Gramm Stuhl berechnet. Die Resultate sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens 7 Tieren pro Gruppe dargestellt.

Wie in *Tabelle 14* verdeutlicht, waren die Keimzahlen von *B. vulgatus* in gnotobiotischen und SPF-Mäusen weitgehend vergleichbar. Im Gegensatz dazu waren unter gnotobiotischen Zuchtbedingungen *Clostridien*-Spezies in rund 10^4 -fach höherer Dichte im Stuhl vorhanden als in SPF-Mäusen. Auch *E. coli* kam unter gnotobiotischer Besiedlung in deutlich höherer Konzentration im Stuhl vor (rund 10^3 -fach) als unter SPF-Bedingungen. Die Ko-Besiedlung mit *E. coli* und *B. vulgatus* führte zu leicht höheren Keimkonzentrationen im Stuhl als in der jeweiligen Mono-Besiedlung. Zwischen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen wurde weder unter SPF- noch unter gnotobiotischen Bedingungen ein signifikanter Unterschied der CFU gefunden.

4.8.1 Untersuchungen an *Bacteroides vulgatus*-assoziierten Mäusen

Bacteroides vulgatus wurde für die Monobesiedlung ausgewählt, da dieser Keim häufig in der physiologischen Darmflora anzutreffen [12] ist und er in anderen Tiermodellen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mit der Krankheitsentstehung in Zusammenhang gebracht wurde [94, 95]. Die Keimzahlen im Stuhl von *B. vulgatus*-monobesiedelten Mäusen waren mit denen von *Bacteroides* spp. im Kolon SPF-geltener Mäuse vergleichbar (s. *Tabelle 14*). In anderen Arbeiten an *B. vulgatus*-monobesiedelten Mäusen wurden sehr ähnliche Keimzahlen im Stuhl gefunden [71].

4.8.1.1 Histologische Untersuchungen des Kolons

Histologische Untersuchungen an 20 Wochen alten Tieren ergaben keine Hinweise auf Entzündungsreaktionen im Kolon (nicht gezeigt). Unter der Annahme einer verzögerten Kinetik der Entzündungsreaktion wurden auch Mäuse im Alter von 33 Wochen untersucht und wiederum fand sich kein histologischer Hinweis auf eine Kolitis. *Abbildung 24* zeigt exemplarisch histologische Präparate von *B. vulgatus*-monobesiedelten IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen beider Altersgruppen. Es lagen keine offensichtlichen histologischen Anzeichen einer Inflammation des Kolons vor. In beiden Gruppen war das Epithel intakt (*Abbildungen 24C* und *24D*) Die Infiltration der Lamina Propria mit mononukleären Zellen war mit der von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen vergleichbar (*Abbildungen 24A* und *24B*; vgl. *Abbildung 1*).

4.8.1.2 Bakterielle Lokalisation im Kolon

Die FISH-Technologie (engl. **f**luorescence **i**n-**s**itu **h**ybridization) erlaubt den Nachweis von RNA im histologischen Präparat. Durch die Verwendung von Oligonukleotid-Sonden, die eubakterielle ribosomale 16S-rRNA erkennen ist es möglich, Bakterien im Darmschnitt zu lokalisieren. *Abbildung 25* zeigt einige typische Verteilungsmuster von mit *B. vulgatus*-monobesiedelten Mäusen.

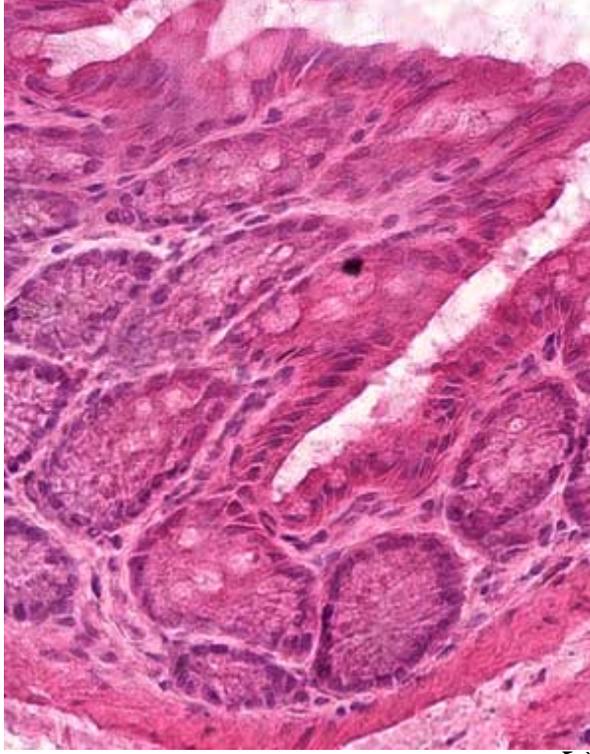
Während im Lumen sehr viele Bakterien präsent waren (*Abbildung 25B*), fanden sich vergleichsweise wenige am Epithel adhärierende Bakterien. Dabei war die Verteilung dieser adhärenen Bakterien sehr ungleichmäßig. Es fanden sich sowohl Abschnitte des Epithels, wo keine Bakterien adhärten, als auch Areale mit vielen Keimen. Die Keime adhärten bevorzugt in Haufen (Cluster) von 5-20 Bakterien (*Abbildung 25A*), doch auch einzelne adhärierende Bakterien waren vorhanden.



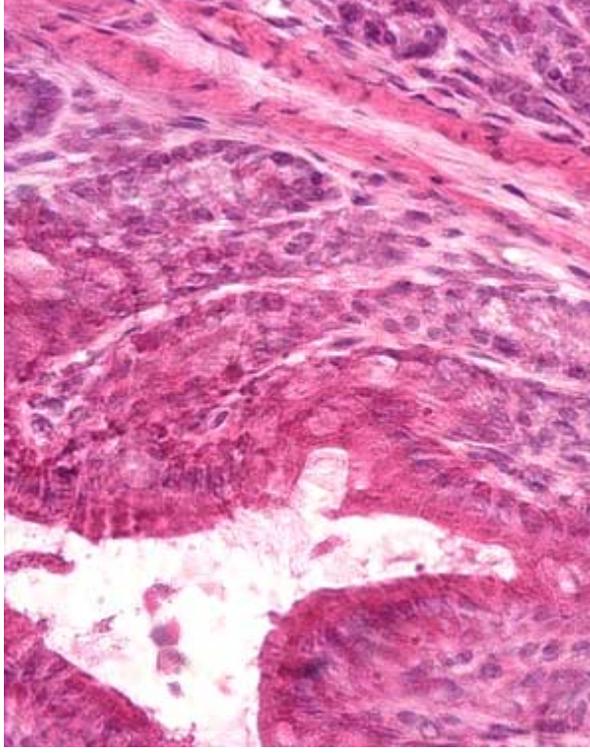
A



B



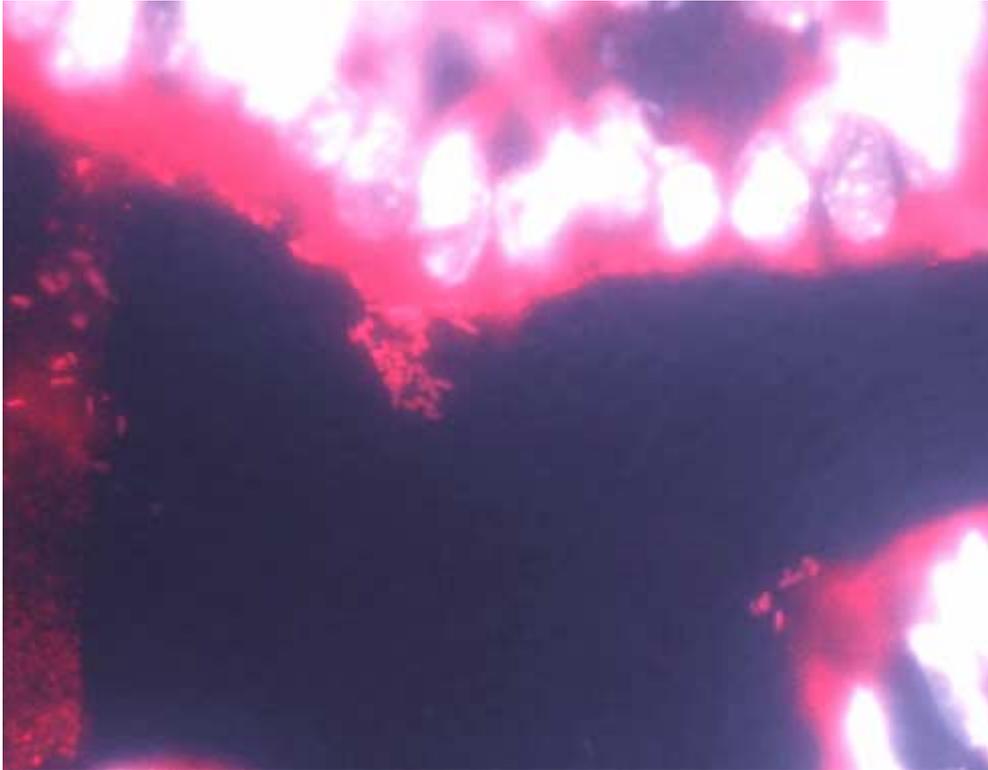
C



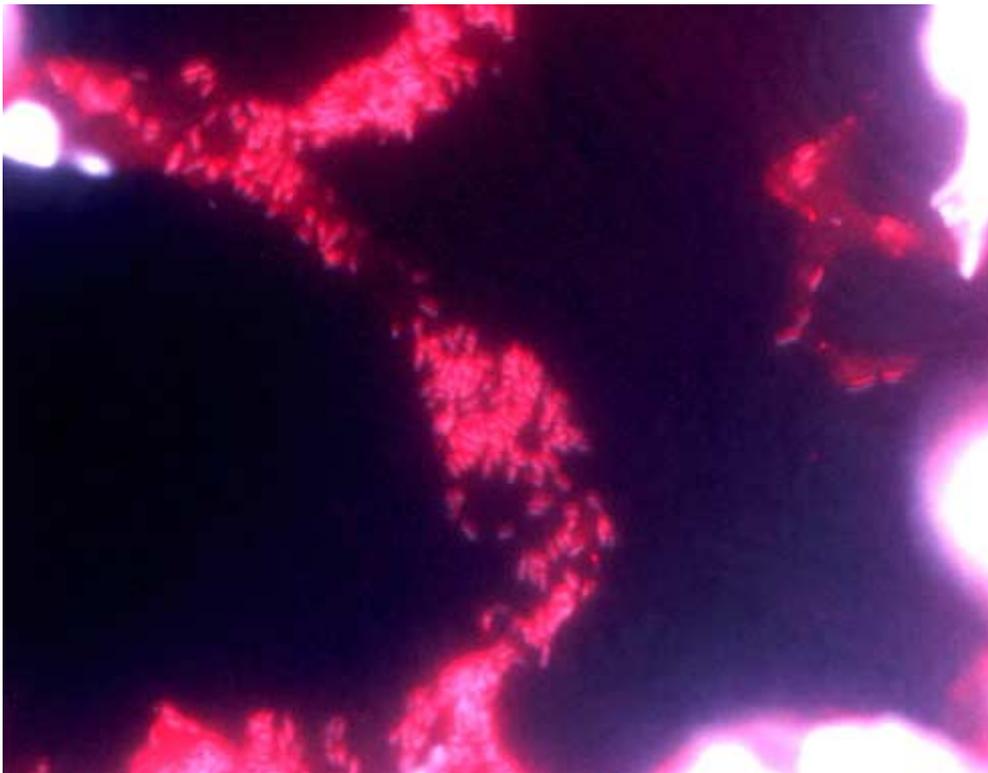
D

Abbildung 24 Kolon von 33 Wochen alten, *B. vulgatus*-monobesiedelten Mäusen

5µm Schnitte von 33 Wochen alten, *B. vulgatus*-monobesiedelten Mäusen wurden angefertigt und H&E-gefärbt wie im Methodenteil beschrieben. Repräsentative Präparate von IL-2^{+/+}- (links) und IL-2^{-/-}-Mäusen (rechts) sind abgebildet. Die Originalvergrößerung beträgt x50 (obere Abbildungen) und x400 (untere Abbildungen).



A



B

Abbildung 25 Bakterielle Lokalisation im Kolon *B. vulgatus*-monobesiedelter Mäuse
 Mittels der FISH-Methodik wurden Eubakterien mit der spezifischen Sonde Eub₃₃₈-Cy3 im 5µm Gefrierschnitt detektiert. Zur histologischen Orientierung wurde Nukleinsäure mit Di-Amidino-Phenylindol gefärbt. Die Abbildung zeigt repräsentative Färbungen einer 33 Wochen alten IL-2^{+/+}-Maus in 1000x Vergrößerung.

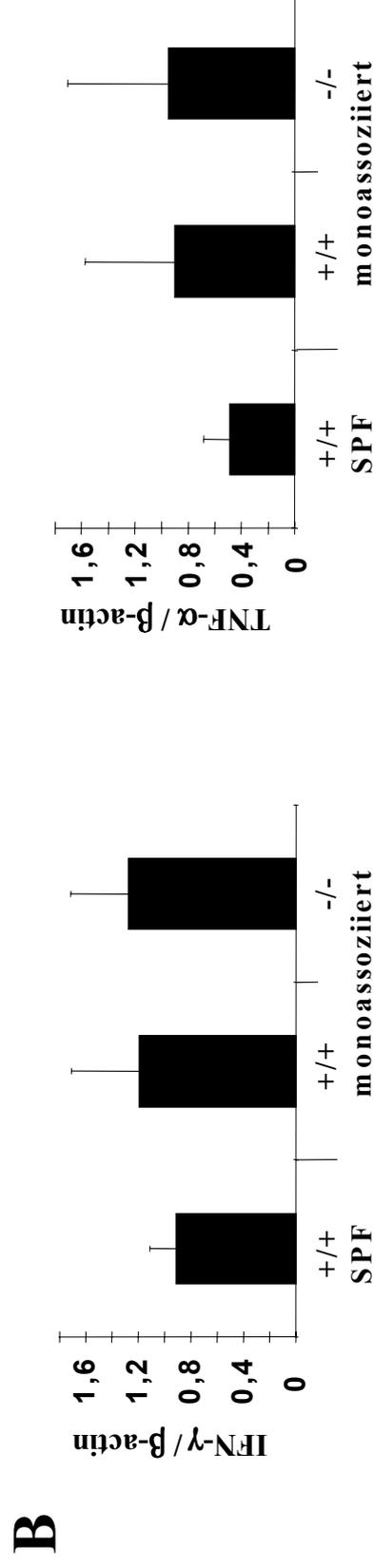
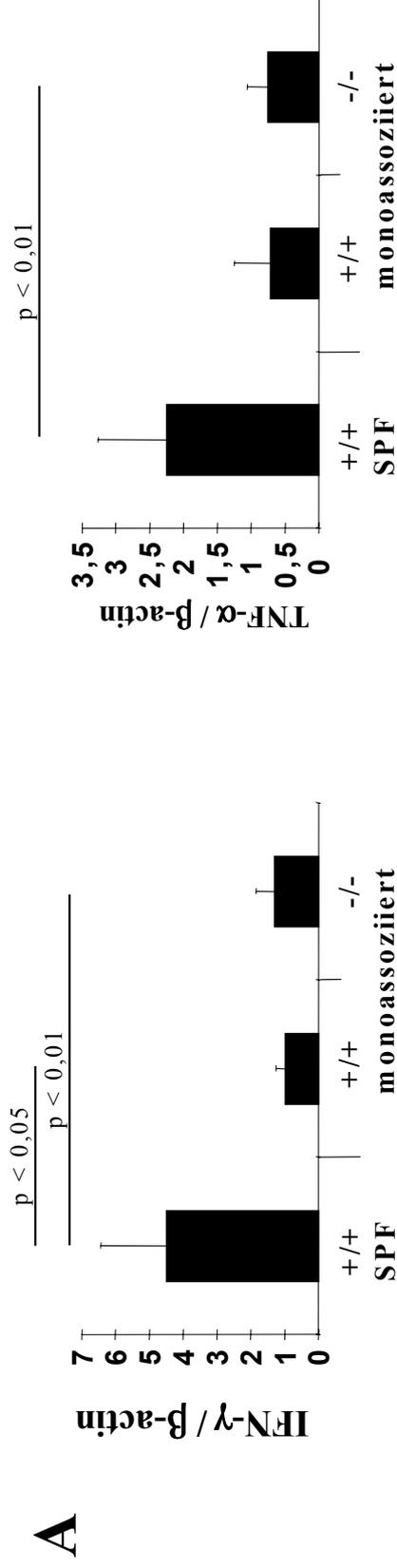


Abbildung 26. Relative Zytokin mRNA-Expression im Kolon *B. vulgatus*-monobesiedelter Mäuse

RNA wurde aus dem Kolon von 20 Wochen (A) und 33 (B) Wochen alten Mäusen isoliert, revers transkribiert und mittels spezifischer PCR amplifiziert wie in *Methoden* beschrieben. Die PCR-Produkte wurden densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Ratio des jeweiligen Zytokins und β -Aktin dargestellt. Signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede gemäß Student's T-Test sind gekennzeichnet. Es wurden untersucht:

20 Wochen SPF: 5 Tiere IL-2^{+/+} monoassoziert: 3 IL-2^{+/+} Mäuse und 6 IL-2^{-/-} Mäuse

33 Wochen SPF: 3 Tiere IL-2^{+/+} monoassoziert: 6 IL-2^{+/+} Mäuse und 7 IL-2^{-/-} Mäuse

4.8.1.3 Zytokin-mRNA Expression im Kolon

Um eine histologisch noch nicht nachweisbare Entzündungsreaktion im Kolon der monobesiedelten Tiere mit einer sensitiveren Methode eventuell doch aufzuspüren, wurde die Zytokin-mRNA Expression mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Als relevante Zytokine wurden IFN- γ und TNF- α ausgewählt, da sie in der Kolitis von SPF-gehaltenen Mäusen am engsten mit der Inflammation korrelieren. Zum Vergleich wurden parallel gleichaltrige SPF-gehaltene Mäuse untersucht. *Abbildung 26* fasst die Resultate für 20 und 33 Wochen alte Mäuse zusammen.

In keiner der untersuchten Altersstufen fand sich eine vermehrte Expression der beiden proinflammatorischen Zytokine in monobesiedelten IL-2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu monobesiedelten IL-2^{+/+} Mäusen. Vielmehr zeigte der Vergleich mit IL-2^{+/+} SPF-Mäusen eine signifikante Reduktion beider Zytokine im Alter von 20 Wochen in monobesiedelten Tieren. Im höheren Alter dagegen blieb dieser Unterschied nicht erhalten. Dieser Befund stimmt gut mit den histologischen Resultaten überein (4.7.1.1).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Monobesiedlung von IL-2^{-/-} Mäusen mit *B. vulgatus* keine Kolitis auslöst.

4.8.2 Untersuchungen an *Escherichia coli*-monoassoziierten Mäusen

Als weiterer Keim zur Monobesiedlung wurde *Escherichia coli* verwendet, da dieser Keim der häufigste Aerobier in der Kolonflora ist [⁹⁶]. Da Aerobier typischerweise in der physiologischen Flora des Kolons in geringerer Dichte angetroffen werden als Anaerobier [^{3, 97}], *E. coli* dagegen in monobesiedelten Mäusen ein leeres Kompartiment antrifft, weichen die Keimzahlen pro Gramm Fäzes von SPF-gehaltenen und monobesiedelten Mäusen deutlich voneinander ab. In monobesiedelten Tieren fanden sich 10³-fach höhere *E. coli*-Zahlen als in SPF-Mäusen (s. *Tabelle 14*). Auch andere Studien mit *E. coli*-monobesiedelten Mäusen zeigten ähnlich hohe Keimzahlen im Stuhl [⁷¹].

4.8.2.1 Histologische Untersuchungen des Kolons 33 Wochen alter Mäuse

Die histologischen Untersuchungen sind in *Abbildung 27* zusammengefasst.

Mit *E. coli*-monobesiedelte IL-2^{+/+} Mäuse zeigten histologisch keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion im Kolon. Das Epithel dieser Tiere war intakt und es fanden sich keine pathologischen Zellinfiltrate in die Lamina Propria (*Abbildungen 27A und C*). Im Gegensatz

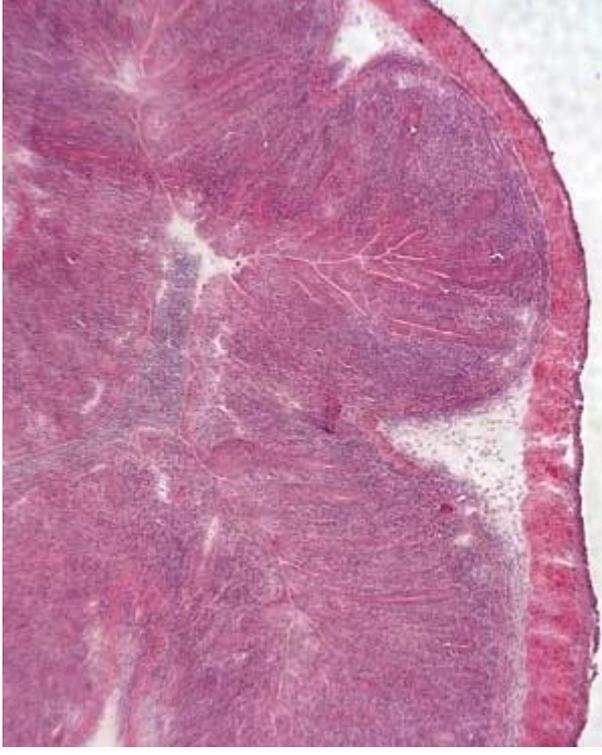
dazu entwickelte sich in mit *E. coli*-monobesiedelten IL-2^{-/-} Mäusen eine schwere Kolitis. Kennzeichnend waren vor allem die massive Infiltration der Lamina Propria mit mononukleären Zellen und die damit einhergehende Verdickung der Kolonwand (*Abbildung 27B*). Auch Zerstörungen des Epithels und Austritt zahlreicher Zellen in das Darmlumen waren vorhanden (*Abbildung 27D*).

4.8.2.2 Bakterielle Lokalisation im Kolon

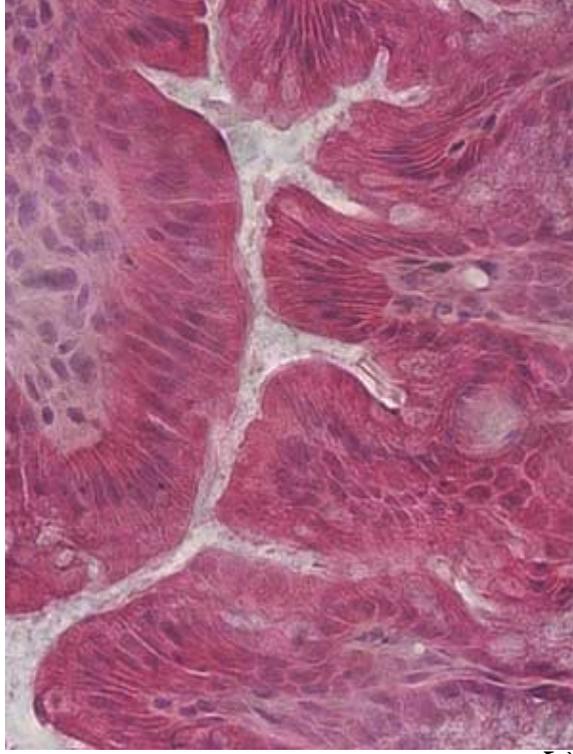
Mittels der FISH-Technologie wurden Bakterien im histologischen Präparat sichtbar gemacht. Zur besseren Orientierung im Gewebe wurde zusätzlich der blau fluoreszierende DNA-Farbstoff DAPI eingesetzt. *Abbildung 28* zeigt exemplarisch die Lokalisation von Bakterien. Trotz der sehr hohen Keimdichte im Stuhl der untersuchten Mäuse adhärten nur wenige Keime pro histologischem Schnitt am Epithel (Schnittdicke 5 µm). Seltener als in *B. vulgatus*-monobesiedelten Mäusen waren in Clustern adhärierende Bakterien anzutreffen (*Abbildung 28A*). Weite Teile des Epithels waren frei von adhärierendem *E. coli* oder mit solitären Keimen besiedelt (*Abbildung 28B*). Vereinzelt waren in der Lamina Propria Bakterien anzutreffen (*Abbildung 28D*). In einer der untersuchten monobesiedelten IL-2^{-/-} Mäuse fiel auf, daß aus dem Gewebeverband herausgelöste Zellen im Lumen rasch von einer großen Anzahl *E. coli* besiedelt wurden (*Abbildung 28C*).



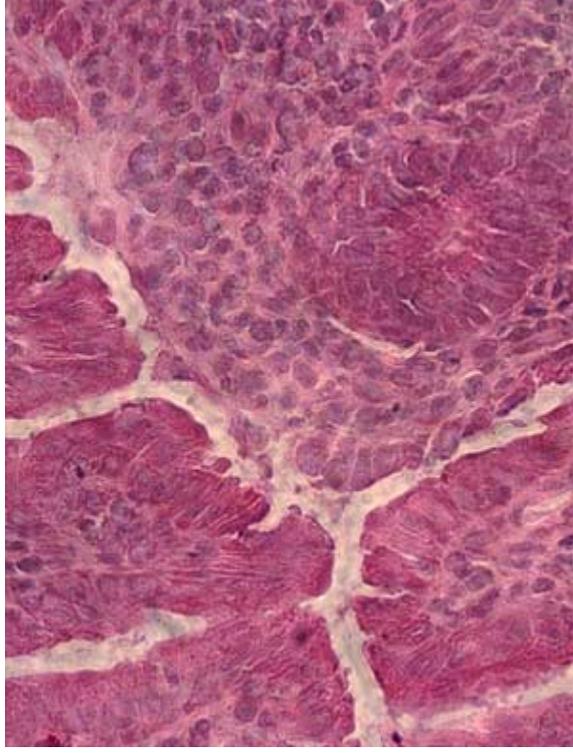
A



B

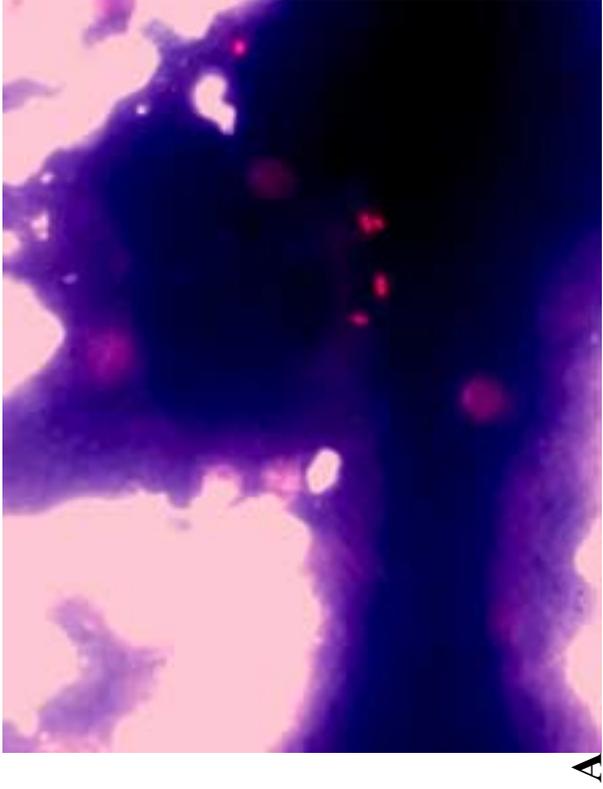


C

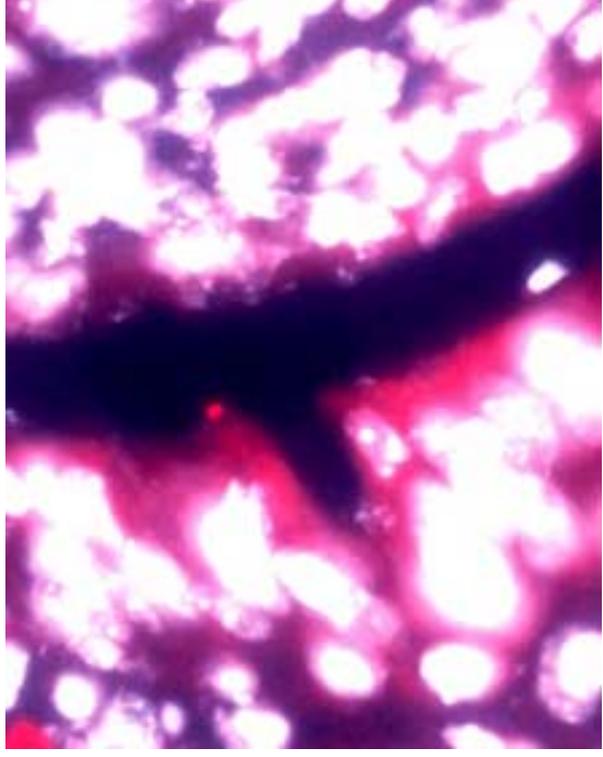


D

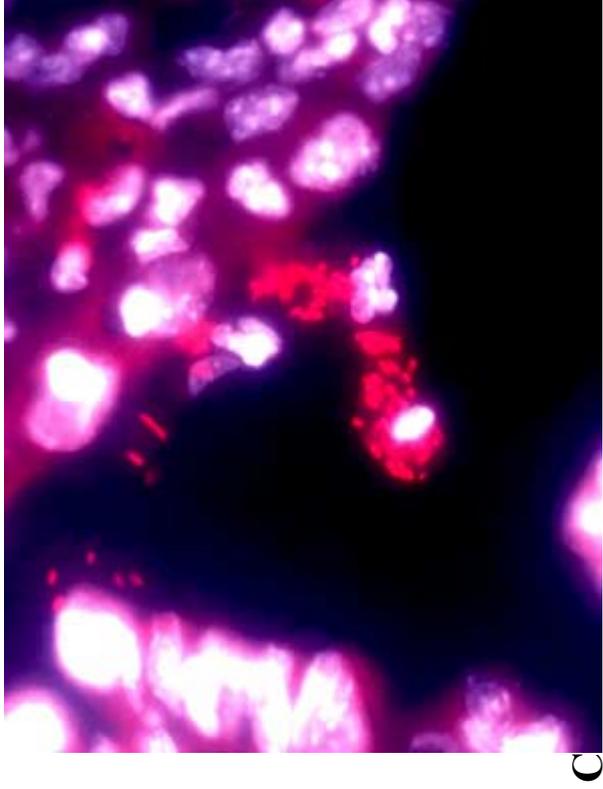
Abbildung 27 Kolon von 33 Wochen alten, mit *E. coli*-monobesiedelten Mäusen
 5µm Schnitte von 33 Wochen alten, *E. coli*-monobesiedelten Mäusen wurden angefertigt und H&E-gefärbt wie im Methodenteil beschrieben.
 Repräsentative Präparate von IL-2^{+/+}- (links) und IL-2^{-/-}-Mäusen (rechts) sind abgebildet. Die Originalvergrößerung beträgt x50 (obere Abbildungen) und
 x400 (untere Abbildungen).



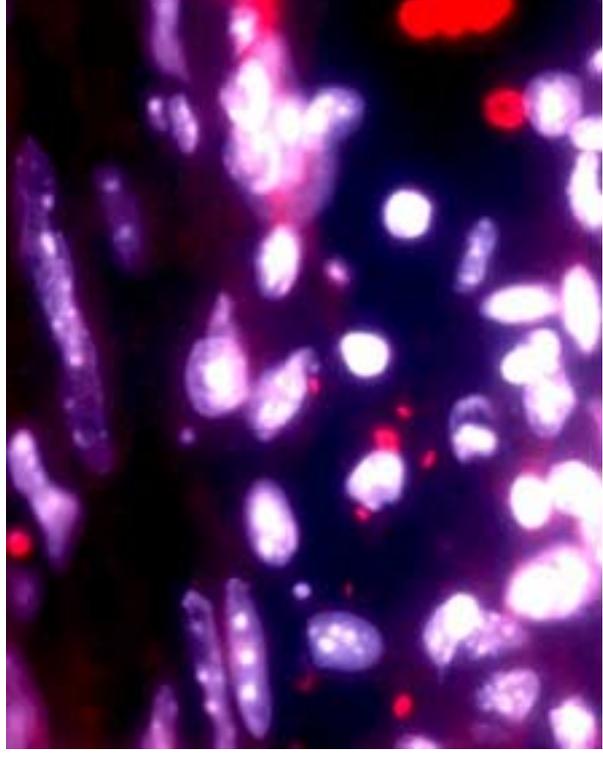
A



B



C



D

Figure 28 Fish-Färbungen *E. coli*-monobesiedelter Mäuse Kolonschnitte von 33 Wochen alten, *E. coli*-monobesiedelten Wildtyp- (A) und Knockoutmäusen (B-D) wurden angefertigt. Eubakterien wurden mit der mit rotem Fluorochrom (Cy-3) gekoppelten Eub₃₃₈-Sonde sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt.

Abbildung 29 fasst die quantitative Auswertung von >15 kompletten Schnitten pro Maus zusammen.

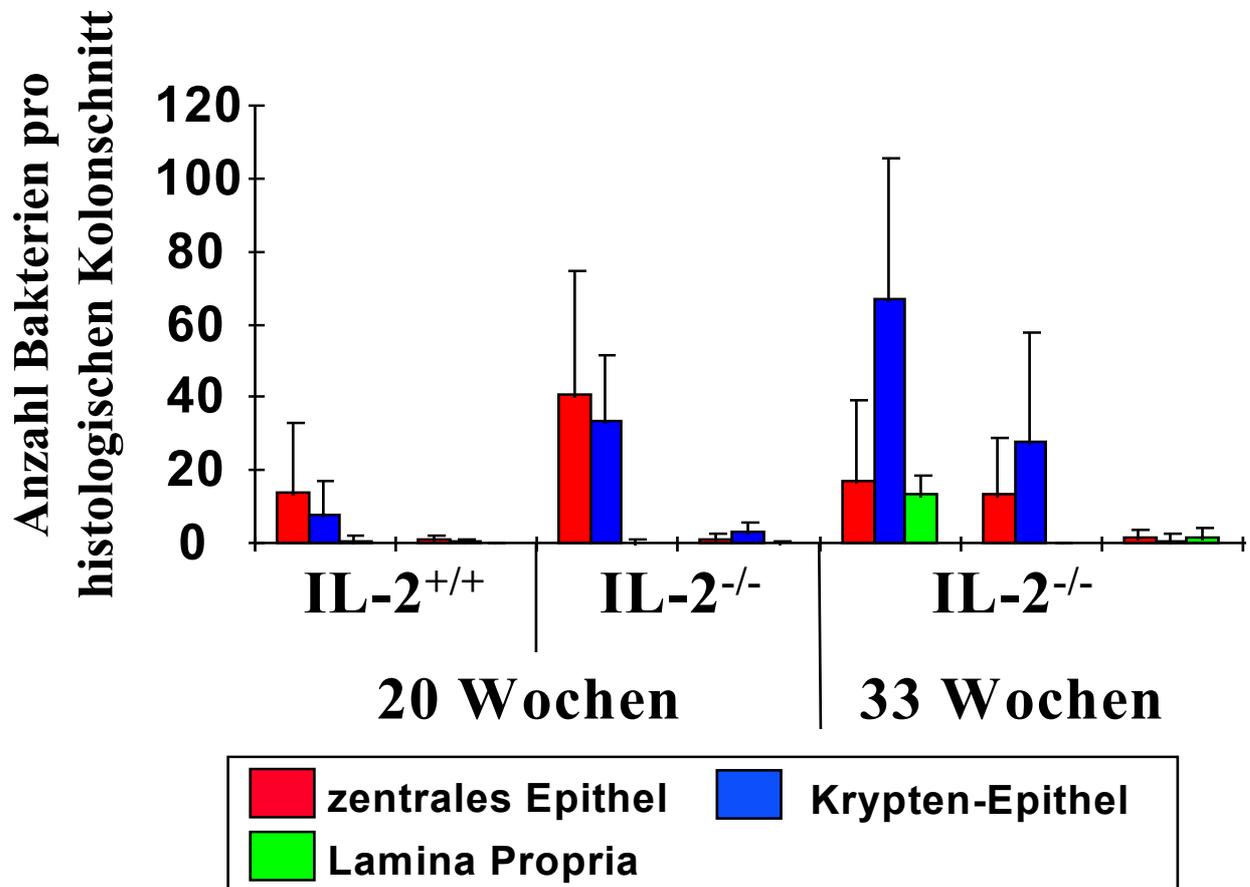


Abbildung 29. Bakterielle Lokalisation im Kolon von *E.coli*-monobesiedelten Mäusen

Eubakterien wurden mittels der FISH-Methodik im Kolonpräparat von *E.coli*-monobesiedelten Mäusen sichtbar gemacht wie im Methodenteil beschrieben. Unter 1000-facher Vergrößerung wurden Bakterien in mindestens 15 vollständigen Kolonquerschnitten ausgezählt. Hierbei wurden drei verschiedene Lokalisationen unterschieden: Epitheladhärenz im zentralen Bereich des Kolons oder in den Krypten und Präsenz in der Lamina Propria. Abgebildet sind der Mittelwert und die Standardabweichung von individuellen Tieren. Die ausgezählten Epithelabschnitte sind im Methodenteil definiert.

Abbildung 29 verdeutlicht, dass es sehr große Abweichungen der Anzahl adhärenter Bakterien sowohl zwischen individuellen Tieren einer Gruppe, als auch zwischen den benachbarten Kolonschnitten desselben Tieres gab. Dies belegt, dass ein quantitativer Vergleich der Epitheladhärenz mit der FISH-Methodik nur schwer zu realisieren ist.

4.8.2.3 Zytokin-mRNA Expression im Kolon

Abbildung 30 dokumentiert die relative mRNA-Expression von IFN- γ und TNF- α im Kolongewebe 20 und 33 Wochen alter *E. coli*-monobesiedelter und SPF-gehaltener Mäuse.

Für die Zytokine IFN- γ und TNF- α fand sich im Alter von 20 Wochen nur eine tendenzielle Erhöhung in monobesiedelten IL-2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu monobesiedelten IL-2^{+/+} Mäusen. Dabei lag die mRNA-Expression aber nicht über den physiologischen Werten von IL-2^{+/+} SPF-Mäusen. Im Gegensatz zu *B. vulgatus*-monobesiedelten Tieren zeigte sich keine allgemeine Reduktion des mRNA-Niveaus in *E. coli*-monobesiedelten Tieren dieser Altersstufe hin. Dies deutet bereits daraufhin, daß *E. coli* zu einer stärkeren Immunstimulation führt als *B. vulgatus*.

Im Alter von 33 Wochen dagegen wurden ähnlich wie in der Kolitis der IL-2^{-/-} SPF-Mäuse beide Zytokine in monobesiedelten IL-2^{-/-} Mäusen signifikant stärker exprimiert als in IL-2^{+/+} Mäusen derselben Zucht. IFN- γ zeigte hierbei einen 18,9-fachen Anstieg und TNF- α einen 2,5-fachen Anstieg des relativen mRNA-Niveaus. Diese Daten entsprechen dem histologischen Befund einer schweren Kolitis in diesen Tieren. Im Vergleich zu den Kontrolltieren (IL-2^{+/+} SPF-Mäuse) wurde jedoch nur IFN- γ , nicht aber TNF- α überexprimiert.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß *E. coli* in monobesiedelten IL-2^{-/-} Mäusen zu einer massiven Kolitis führt.

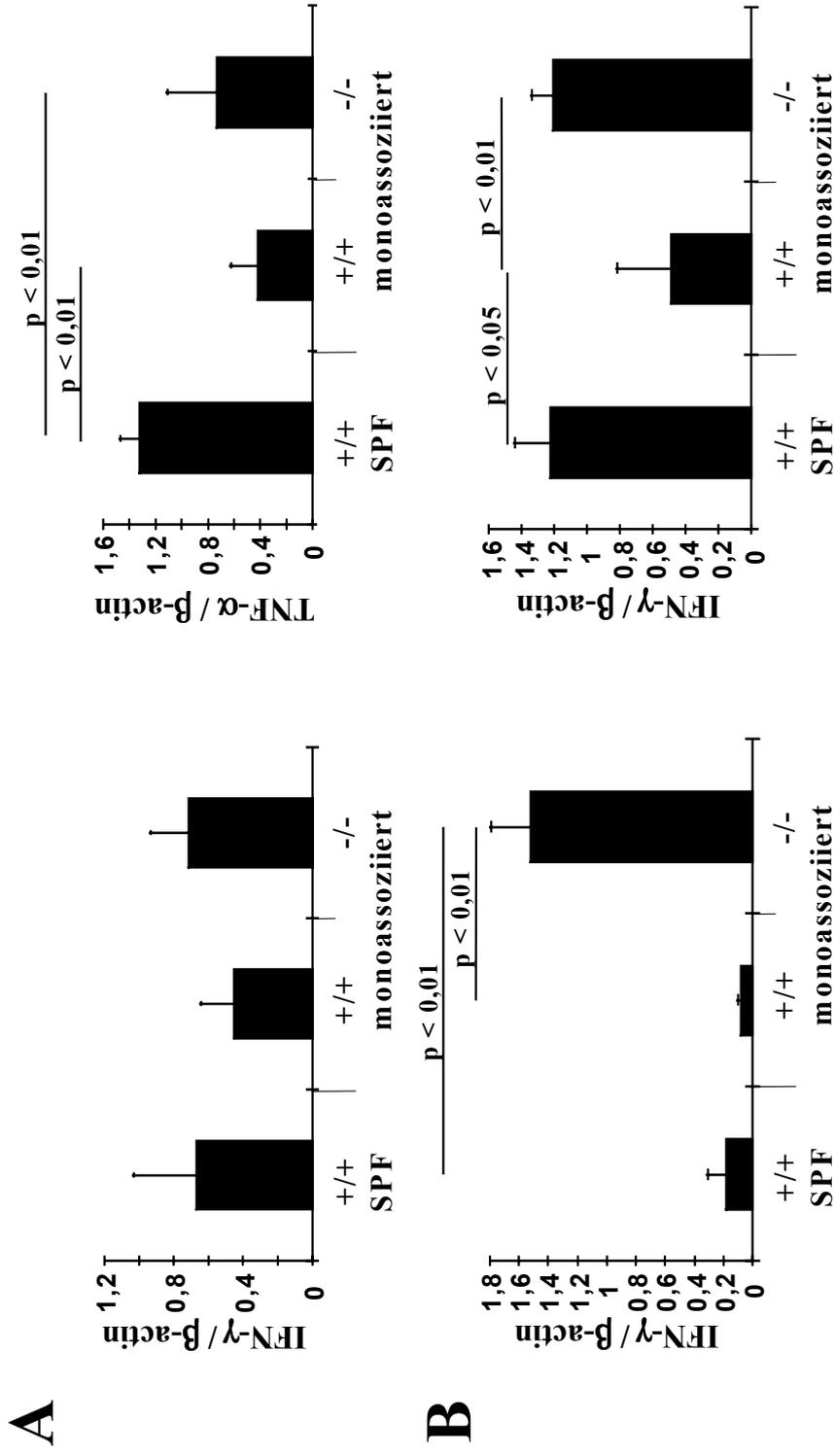


Abbildung 30. Relative Zytokin mRNA-Expression im Kolon *E.coli*-monoassoziierter Mäuse

mRNA wurde aus dem Kolon von 20 Wochen (A) und 33 (B) Wochen alten Mäusen isoliert, revers transkribiert und mittels spezifischer PCR amplifiziert wie in *Methoden* beschrieben. Die PCR-Produkte wurden densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Ratio des jeweiligen Zytokins und β -Aktin dargestellt. Signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede gemäß Student's T-Test sind gekennzeichnet. Es wurden untersucht:

20 Wochen	SPF: 5 IL-2 ^{+/+} Mäuse	monoassoziert: 5 IL-2 ^{+/+} Mäuse und 6 IL-2 ^{-/-} Mäuse
33 Wochen	SPF: 3 IL-2 ^{+/+} Mäuse	monoassoziert: 6 IL-2 ^{+/+} Mäuse und 3 IL-2 ^{-/-} Mäuse

4.8.3 Untersuchungen an mit *Bacteroides vulgatus* und *Escherichia coli* besiedelten Mäusen

Wie oben ausgeführt, lösten die beiden in der Monobesiedlung eingesetzten Keime *E.coli* und *B.vulgatus* ganz unterschiedliche Reaktion im Kolon der besiedelten Tieren aus. Da für die physiologische Darmflora sowohl probiotische als auch negative Effekte für den Wirtsorganismus postuliert werden [2], war die Frage nach Synergien und Antagonismen bei Kobesiedlung mit diesen beiden Keimen sehr interessant. Die Keimzahlen von *E. coli* und von *B. vulgatus* dieser doppelt besiedelten Tiere waren unabhängig von IL-2 Genotyp etwas höher (rund 3-fach; s. *Tabelle 14*) als in der Monobesiedlung.

4.8.3.1 Histologische Untersuchungen des Kolons

Abbildung 31 zeigt repräsentative H&E-gefärbte histologische Präparate des Kolons 33 Wochen alter, mit *B. vulgatus* und *E. coli* besiedelter Mäuse:

Histologisch waren selbst im Alter von 33 Wochen weder bei IL-2^{+/+} (*Abbildung 31A* und *C*), noch bei IL-2^{-/-} Mäusen (*Abbildung 31B* und *D*) unter gnotobiotischer Besiedlung mit *B.vulgatus* und *E. coli* Anzeichen einer Entzündungsreaktion im Kolon sichtbar. Bei allen Tieren war das Epithel intakt (*Abbildung 31B* und *D*) und die Infiltration der Lamina propria mit mononukleären Zellen war normal (*Abbildung 31B* und *D*). Da *E. coli* in der Monobesiedlung eine starke entzündliche Reaktion im Kolon auslöste, die in der gnotobiotischen Kobesiedlung mit *B.vulgatus* ausblieb, scheint *B.vulgatus* in diesem Modell probiotische Eigenschaften zu besitzen. Diese scheinen nicht durch eine Reduktion der *E. coli*-Keimdichte ausgelöst zu werden, da diese unter Kobesiedlungsbedingungen sogar etwas höher war als in den entsprechenden monoassoziierten Tieren.

4.8.3.2 Bakterielle Lokalisation im Kolon

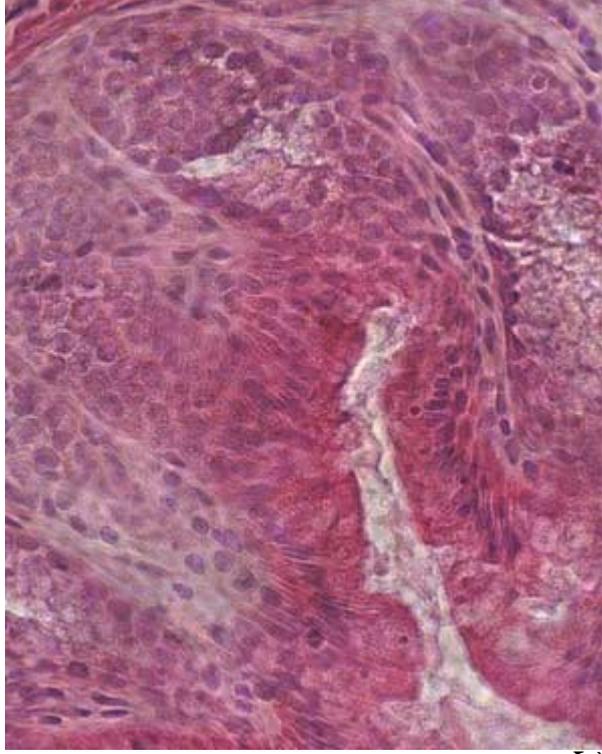
Mit der FISH-Methode visualisierte Bakterien zeigten wenig Epitheladhärenz; weite Areale des Kolonepithels waren frei von Bakterien. Adhärenente Keime kamen sowohl in Clustern (*Abbildung 32A*), als auch einzeln vor (*Abbildung 32B*). Eine mikroskopische Differenzierung von *B.vulgatus* und *E.coli* aufgrund verschiedener Morphologie war nicht eindeutig möglich.



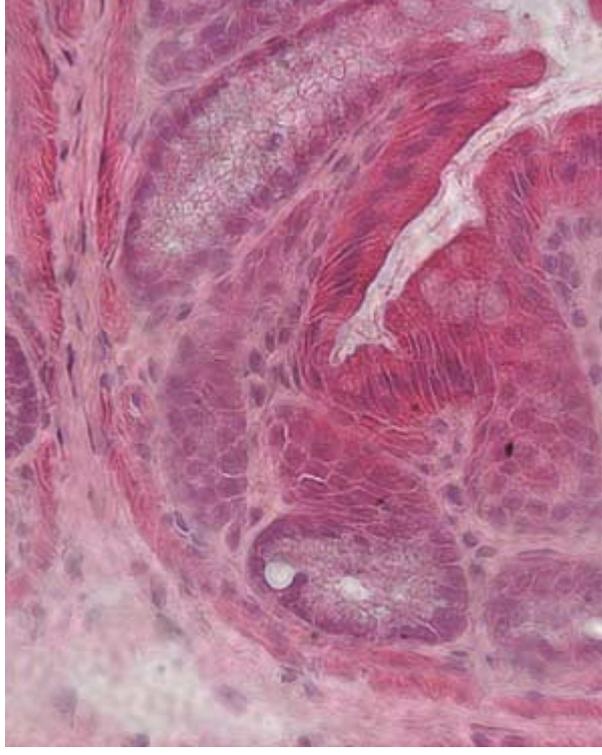
A



B

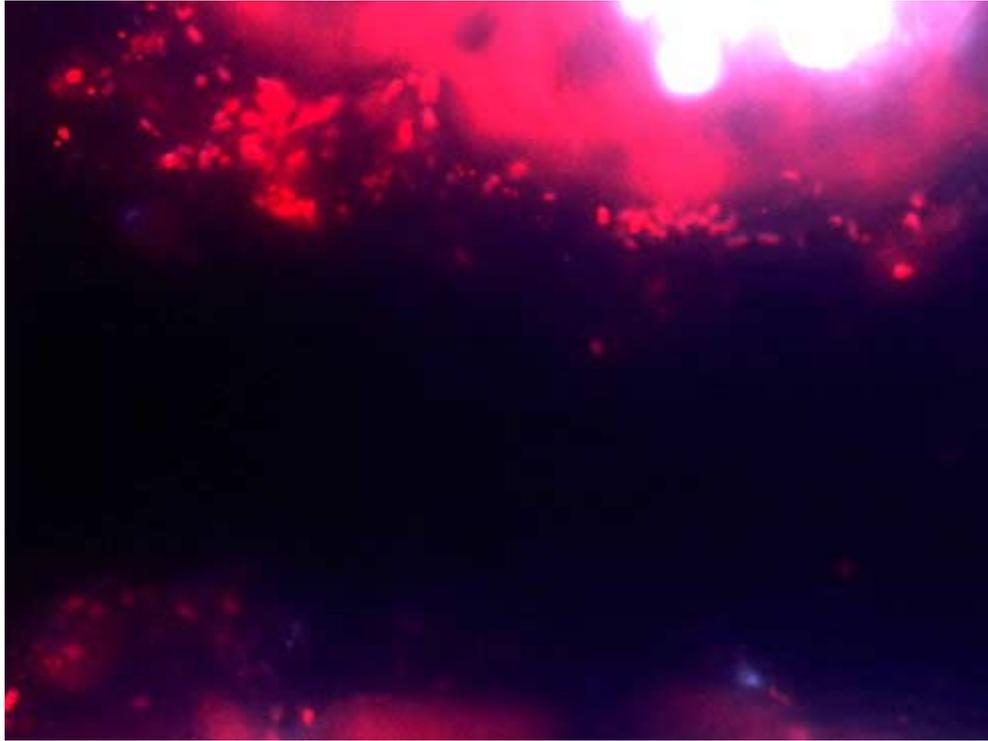


C

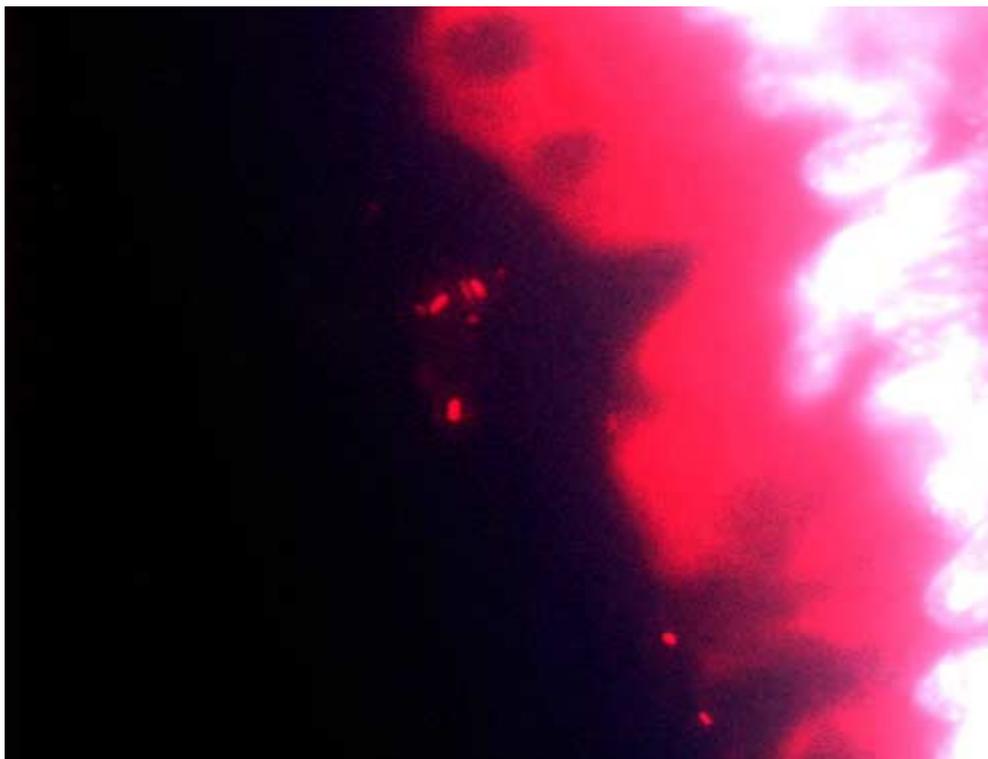


D

Abbildung 31 Kolon von mit *B. vulgatus* und *E. coli* besiedelten gnotobiotischen Mäusen
 Die Abbildung repräsentative H&E-gefärbte Gefrierschnittsmitte (5 µm) des Kolons von 33 Wochen alten, mit *B. vulgatus* und *E. coli* besiedelten gnotobiotischen IL-2^{+/+} - (links) und IL-2^{-/-} -Mäusen (rechts) und 50-facher (oben) und 400-facher (unten) Vergrößerung.80



A



B

Abbildung 32 Bakterielle Lokalisation im Kolon *E. coli* und *B. vulgatus*-besiedelter Mäuse
Mittels der FISH-Methodik wurden Eubakterien mit der spezifischen Sonde Eub₃₃₈-Cy3 im 5µm Gefrierschnitt detektiert. Zur histologischen Orientierung wurde Nukleinsäure mit Di-Amidino-Phenylindol gefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen einer 33 Wochen alten IL-2^{+/+}-Maus in 1000x Vergrößerung..

4.8.3.3 Zytokin-mRNA Expression im Kolon

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse der mRNA-Analyse. Die Untersuchung der mRNA-Expression der für die Kolitis relevanten Zytokine TNF- α und IFN- γ ergab, daß im Alter von 33 Wochen *Clostridien*-besiedelte IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäuse keine signifikanten Expressionsunterschiede aufwiesen. Dies stimmt sehr gut mit den histologischen Befunden in diesen Tieren überein und belegt, daß die zusätzliche Anwesenheit von *B. vulgatus* die durch *E.coli* ausgelöste Entzündungsreaktion des Kolons unterdrücken kann.

Lediglich im Alter von 20 Wochen fand sich ein transientser Anstieg von IFN- γ (3-fach erhöht) in gnotbiotischen IL-2^{-/-} Mäusen, der jedoch nicht über das Expressionsniveau dieses Zytokines in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen hinausging.

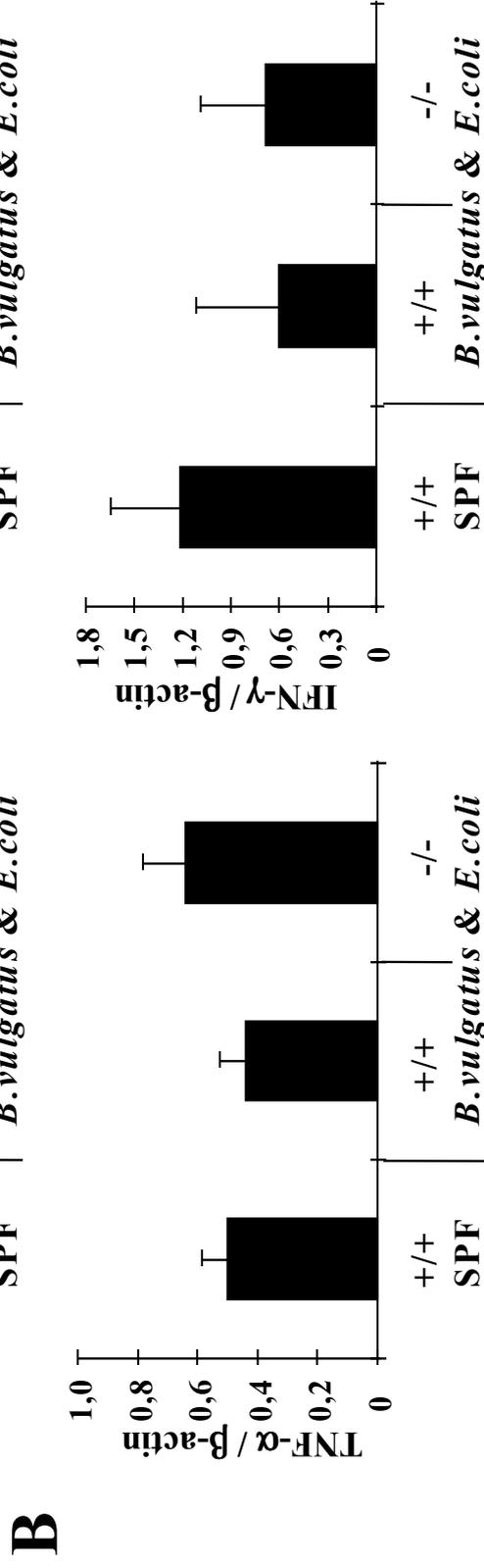
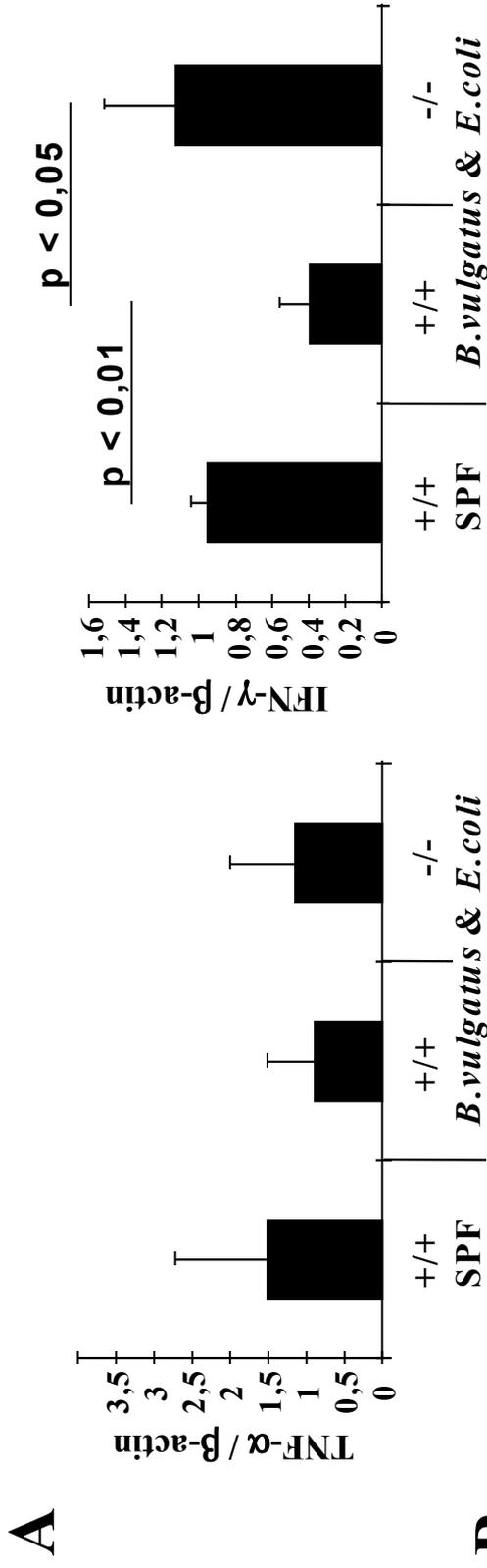


Abbildung 33. Relative Zytokin mRNA-Expression im Kolon *E.coli*-und *B.vulgatus*-monoassoziierter Mäuse

mRNA wurde aus dem Kolon von 20 Wochen (A) und 33 (B) Wochen alten Mäusen isoliert, revers transkribiert und mittels spezifischer PCR amplifiziert wie in *Methoden* beschrieben. Die PCR-Produkte wurden densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Ratio des jeweiligen Zytokins und β -Aktin dargestellt. Signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede gemäß Student's T-Test sind gekennzeichnet. Es wurden untersucht:

20 Wochen SPF: 5 IL-2^{+/+} Mäuse monoassoziert: 5 IL-2^{+/+} Mäuse und 5 IL-2^{-/-} Mäuse

33 Wochen SPF: 3 IL-2^{+/+} Mäuse monoassoziert: 6 IL-2^{+/+} Mäuse und 5 IL-2^{-/-} Mäuse

4.8.4 Untersuchungen an mit *Clostridium aff. innocuum* und *Cl. clostridiiformis* besiedelten Mäusen

Apathogene *Clostridien* gehören zur normalen Kolonflora der Maus. Es ist bekannt, daß unter KF-Zuchtbedingungen eine massive Dilatation der Caecums auftritt, deren Ursache unbekannt ist. Für der Monobesiedlung mit *Clostridien* wurde beschrieben, daß sie zu einer Normalisierung des Caecumlumens führt [98]. Außerdem wurde bei gnotobiotischer Besiedlung mit *Clostridien* spp. eine Normalisierung des Verhältnisses von CD8⁺ : CD4⁺ Kolon_{IEL} nachgewiesen [21]. Dies deutet darauf hin, daß *Clostridien* mit dem GALT in Wechselwirkung treten können. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene, apathogene *Clostridien*-Spezies aus Fäzes von SPF-Mäusen isoliert und für die Doppelbesiedlung verwendet. Die in diesen Tieren gefundenen Keimzahlen von *Clostridien* lagen rund 10⁴-fach höher als in SPF-Mäusen, wobei aber zwischen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen kein signifikanter Unterschied feststellbar war (s. *Tabelle 14*).

4.8.4.1 Histologische Untersuchungen des Kolons

Abbildung 34 zeigt exemplarisch histologische Kolonschnitte von 20 Wochen alten, mit *Clostridien* besiedelten Mäusen: Bereits im Alter von 20 Wochen fanden sich in einigen der gnotobiotischen IL-2^{-/-} Mäuse fokale Zellinfiltrate in der Lamina Propria (*Abbildung 33B*), wobei das Epithel aber intakt blieb (*Abbildung 34D*). In gnotobiotischen IL-2^{+/+} Mäusen fanden sich dagegen keine pathologischen Veränderungen des Kolongewebes (*Abbildungen 34A* und *C*). Im Gegensatz dazu waren in *E. coli*-monobesiedelten Mäusen im Alter von 20 Wochen histologisch noch keine derart ausgeprägten Veränderungen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß *Clostridien* schon relativ früh zu histopathologischen Veränderungen führen. Da ältere Tiere in dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten, kann aufgrund der bisherigen Datenlage allerdings noch nicht endgültig beurteilt werden, ob sich hieraus eine floride Kolitis entwickelt. Die Untersuchung 33 Wochen alter Mäuse wird in Zukunft durchgeführt.

4.8.4.2 Bakterielle Lokalisation im Kolon

Die Visualisierung der *Clostridien* im Kolon gnotobiotischer Mäuse (*Abbildung 35*) zeigte, daß nur sehr wenige Bakterien am Epithel adhärirten. Diese kamen meistens als einzelne Bakterien vor. Die Bildung von Clustern wie bei *E. coli* oder *B. vulgatus*-besiedelten Mäusen wurde kaum beobachtet. Zu der Präsenz von Bakterien im Mukosagewebe kann keine

Aussage gemacht werden, da das mit *Clostridien* am Gewebsschnitt erreichte Fluoreszenzsignal zu schwach war, um eine eindeutige Unterscheidung vom Kolongewebe zu erlauben.

4.8.4.3 Zytokin-*mRNA* Expression im Kolon

Die Analyse der Zytokin-*mRNA* Expression im Kolon 20 Wochen alter, mit *Cl. aff. innocuum* und *Cl. clostridiiformis* besiedelten Mäuse (*Abbildung 36*) ergab bereits einen leichten Anstieg von IFN- γ in IL-2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu IL-2^{+/+} Mäusen (2,5-fach). Entsprechend der großen Varianz der histologischen Hinweise auf eine Kolitis zeigten auch das *mRNA*-Niveau der gnotobiotischen IL-2^{-/-} Mäuse deutliche Unterschiede, so daß die beobachtete Differenz der *mRNA*-Expression nicht signifikant war.

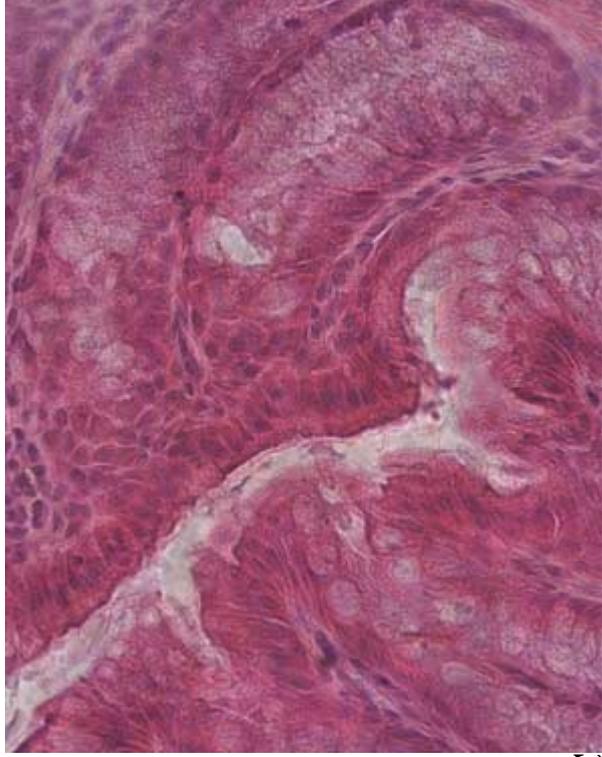
Ob die beschriebenen Anzeichen einer entzündlichen Reaktion transienter Natur sind oder ob sich daraus später eine Kolitis wie in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen entwickelt, kann noch nicht abschließend beurteilt werden, da ältere Tiere noch nicht untersucht wurden.



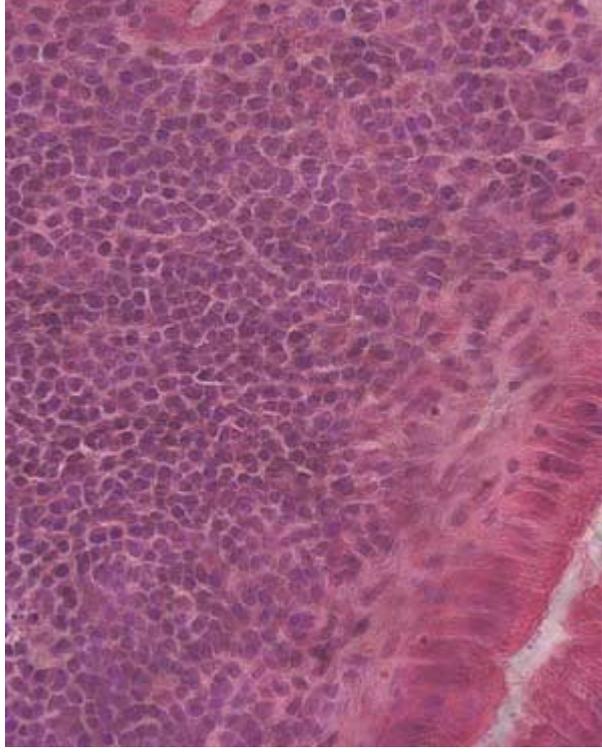
A



B



C

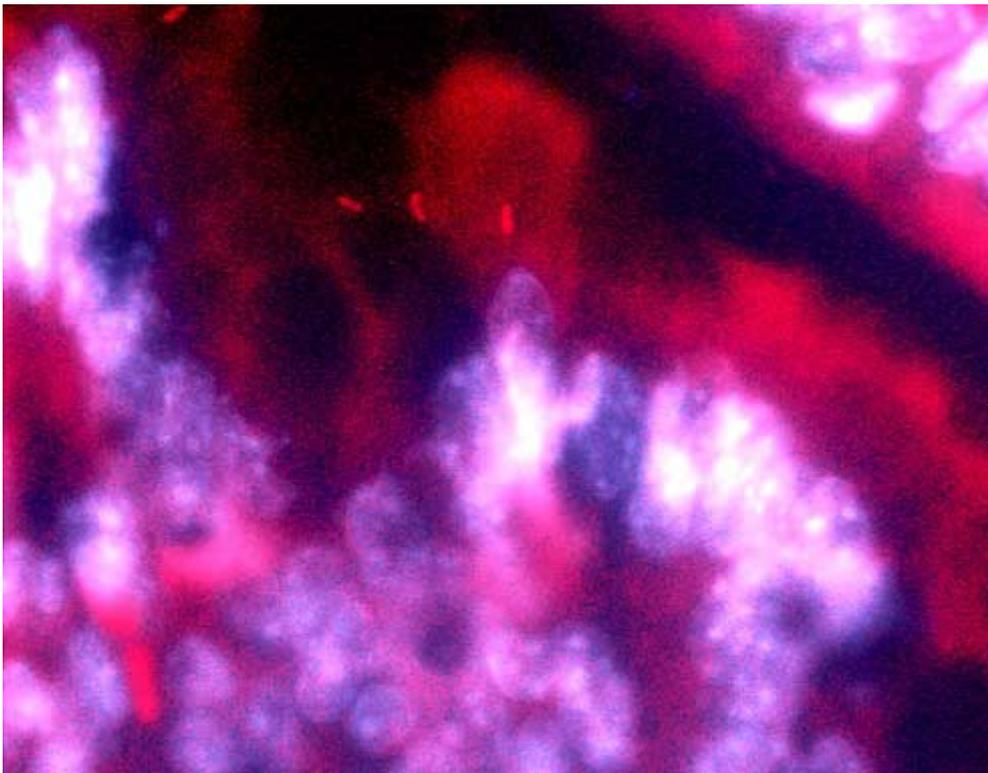


D

Abbildung 34 Kolon von mit *Clostridia* spp. besiedelten, 20 Wochen alten gnotobiotischen Mäusen
 Die Abbildung repräsentative H&E-gefärbte Gefrierschnittsmitte (5 µm) des Kolons von von 20 Wochen alten, mit *Clostridien* spp. besiedelten gnotobiotischen IL-2^{+/+} - (links) und IL-2^{-/-}-Mäusen (rechts) und 50-facher (oben) und 400-facher (unten) Vergrößerung.



A



B

Abbildung 35 Bakterielle Lokalisation im Kolon *Clostridia* spp.-besiedelter Mäuse
 Mittels der FISH-Methodik wurden Eubakterien mit der spezifischen Sonde Eub₃₃₈-Cy3 im 5µm Gefrierschnitt detektiert. Zur histologischen Orientierung wurde Nukleinsäure mit Di-Amidino-Phenylindol gefärbt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Färbungen einer 20 Wochen alten IL-2^{+/+}-Maus in 1000x Vergrößerung.

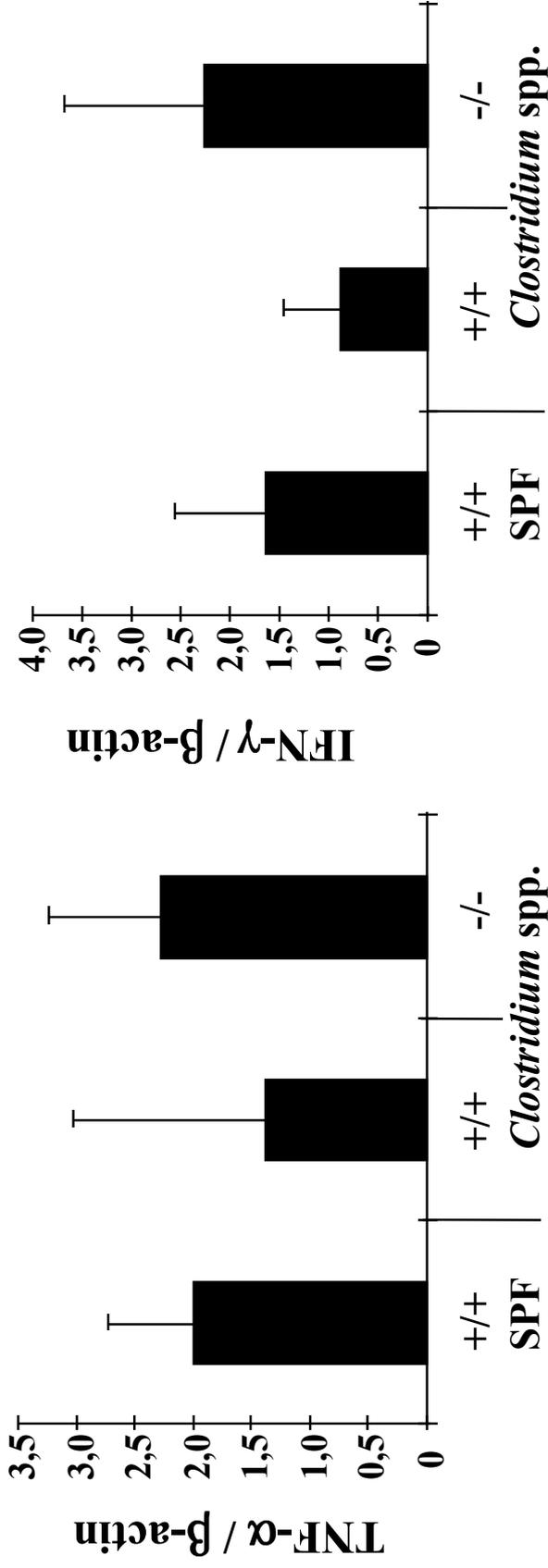


Abbildung 36. relative Zytokin mRNA-Expression im Kolon *Clostridia* spp.-assoziiertter Mäuse

mRNA wurde aus dem Kolon von 20 Wochen (A) Wochen alten Mäusen isoliert, revers transkribiert und mittels spezifischer PCR amplifiziert wie in *Methoden* beschrieben. Die PCR-Produkte wurden densitometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Ratio des jeweiligen Zytokins und β -Aktin dargestellt. Signifikante ($p < 0,05$) und hochsignifikante ($p < 0,01$) Unterschiede gemäß Student's T-Test sind gekennzeichnet. Es wurden untersucht:

20 Wochen SPF: 5 IL-2^{+/+} Mäuse monoassoziiert: 4 IL-2^{+/+} Mäuse und 11 IL-2^{-/-} Mäuse

5. Diskussion

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind mit einer hohen Inzidenz in westlichen Industriestaaten vertreten [5]. Neben einer deutlichen Minderung der Lebensqualität bergen sie auch die Gefahr lebensbedrohlicher Komplikationen [8]. Lange Zeit war die Erforschung dieser Gruppe von Erkrankungen dadurch erschwert, daß man auf klinisches Untersuchungsmaterial angewiesen war, da keine geeigneten Tiermodelle zu Verfügung standen. In den letzten zehn Jahren wurden diverse Tiermodelle der CED entwickelt (s. Tabelle 1, Seite 6). Aus diesen Modellen [39-45, 55] sowie aus Befunden am Menschen [99-101] wurde deutlich, daß das Immunsystem – hier insbesondere die T-Lymphozyten – entscheidend an der Darmentzündung beteiligt ist. Ferner wurde gezeigt, daß die Darmflora ebenfalls einen grossen Einfluss auf CED hat [32, 33, 61].

Darum war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das Wechselspiel von intestinalen T-Zellen und der bakteriellen Darmflora am Kolitismodell der IL-2^{-/-} Maus zu untersuchen.

5.1 Der Einfluss der Darmflora auf die Entstehung der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus

Frühere Arbeiten am CED-Modell der IL-2^{-/-} Maus zeigten, daß die Aufzucht der Tiere unter sterilen Bedingungen die Entstehung der histologisch nachweisbaren Kolitis verhindert [54]. Ähnliche Erfahrungen wurden auch in anderen CED-Tiermodellen gemacht [63, 102, 103]. Da auch beim Menschen Therapieerfolge mit einigen Antibiotika erzielt werden können [32, 33] und das Ableiten des fäkalen Stromes die Ausbildung neuer Entzündungsherde nach Ilektomie verhindert [61], wurde die Hypothese vorgeschlagen, daß die Darmflora ein wichtiger Auslöser von CED ist [8].

Frühe Arbeiten am CED-Modell der IL-2^{-/-} Maus verdeutlichten, daß diese Tiere unter KF-Zuchtbedingungen bis zum Alter von 20 Wochen keine histologischen und klinischen Anzeichen einer Kolitis aufwiesen [54]. Die RT-PCR Methode erlaubt es, sehr sensitiv mRNA nachzuweisen. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, Unterschiede in der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ und TNF- α) im Kolon der IL-2^{-/-} Maus lange vor dem Auftreten der frühesten histopathologischen Befunde nachzuweisen [39, 69].

Damit wurde auch gezeigt, daß die RT-PCR ein für dieses CED-Modell äußerst gut geeignetes Untersuchungswerkzeug darstellt.

Die ersten eigenen Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob die Abwesenheit einer vitalen Darmflora zu einem vollständigen Ausbleiben der Kolitis führt. Die therapeutischen Erfolge von Antibiotika in CED des Menschen [104, 105] implizieren, dass die bakterielle Darmflora eine Rolle in der Pathogenese spielt. Bedenkt man aber, daß sich im Darmlumen unter physiologischen Bedingungen neben Mikroorganismen auch Nahrungsbestandteile befinden, die körperfremde und damit potentiell antigene Substanzen darstellen, so erscheint es durchaus plausibel, daß auch Nahrung alleine zu einer Kolitis führen kann. Für CED-Patienten wurden und werden immer wieder dietätische Maßnahmen wie Vermeidungsdiäten vorgeschlagen [26, 27], so daß die untersuchte Fragestellung auch für den Menschen Relevanz hat.

Die Analyse der mRNA-Expression im Kolongewebe 20 Wochen alter Mäuse zeigte eine deutlich erhöhte Expression vorwiegend proinflammatorischer Zytokine in SPF-gehaltenen IL-2^{-/-} Mäusen. Für IFN- γ und TNF- α , IL-1 α und IL-1 β waren die Unterschiede zwischen IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} SPF-Mäusen signifikant, doch auch das regulatorische Zytokin IL-10 wurde vermehrt exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich des relativen mRNA-Niveaus von IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} KF-Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Vielmehr war das Expressionsniveau für einige der untersuchten Zytokine (IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α und IL-1 β) unter steriler Zucht unabhängig vom Genotyp der Mäuse geringer. Dies stimmt mit dem histologischen Befund einer atrophischen Schleimhaut überein und bestätigt die postulierte Rolle der Darmflora für die Entwicklung des Darmimmunsystems [14-18] GALT, engl. *gut-associated lymphoid tissue*).

Auch die Untersuchung 33 Wochen alter Mäuse erbrachte keine eindeutigen Hinweise auf eine Entzündungsreaktion im Kolon steriler IL-2^{-/-} Mäuse. Zwar zeigte sich, daß IFN- γ leicht vermehrt exprimiert wurde, doch das mRNA-Niveau lag hier nicht höher als unter SPF-Zuchtbedingungen. Auch histologisch zeigte sich lediglich eine milde, fokale Inflammation der Mukosa in einigen der IL-2^{-/-} KF-Mäuse. Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Abwesenheit der Darmflora zu einer drastischen Reduktion der Entzündungsparameter in der IL-2^{-/-} Maus führte und daß sich auch in älteren Tieren allenfalls eine leichte Inflammation fand. Diese Daten stimmen gut mit neueren Arbeiten anderer Gruppen überein [58]. Allerdings erlaubt dies nur den Schluss, daß der direkte Einfluss der Nahrungsantigene auf die Kolitis in diesem Modell eher gering ist. Ob die in IL-2^{-/-} KF-Mäusen vorhandene milde, fokale

Entzündung durch Nahrungsantigene ausgelöst wurde, kann aus den vorliegenden Daten nicht endgültig beurteilt werden. Ferner kann eine indirekte, über die Darmflora vermittelte Beeinflussung des GALT durch die Nahrung nicht ausgeschlossen werden. So wurde beispielsweise gezeigt, daß Ballaststoffe die in-vivo Proliferation von Kryptenepithelzellen nur unter SPF-, nicht aber unter KF-Zuchtbedingungen stimulieren [¹⁰⁶].

Man geht davon aus, daß T-Zellen eine wichtige Rolle in der Entstehung von CED spielen. So wurde gezeigt, daß in Mäusen, die für IL-2 und RAG-2 (engl. *rearrangement activating gene*; IL-2^{-/-} x RAG-2^{-/-}) defizient sind, die also keine Lymphozyten besitzen, die Kolitis ausbleibt [⁵⁵]. Im Gegensatz dazu verhindert das alleinige Fehlen von B-Zellen in IL-2^{-/-} Mäusen (IL-2^{-/-} x JH^{-/-}) die Kolitis nicht [⁵⁶]. Als erster Schritt zur Untersuchung der intestinalen T-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit diese durchflusszytometrisch charakterisiert. Dabei wurde deutlich, daß im Verlauf der Kolitis in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen eine Angleichung der Zusammensetzung intestinaler T-Zellen an den Phänotyp peripherer T-Zellen stattfindet. So fanden sich in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen innerhalb der Kolon_{IEL}-Population deutlich mehr CD4⁺αβTCR⁺ T-Zellen, wogegen in der Kolon_{LPL}-Population mehr CD8⁺αβTCR⁺ T-Zellen angetroffen wurden.

Interessanterweise wurden gleichartige Veränderungen in beiden Kompartimenten auch im Dünndarm und unter KF-Zuchtbedingungen nachgewiesen. Dennoch entwickelte sich weder im Dünndarm SPF-gehaltener, noch im Kolon von IL-2^{-/-} KF-Mäusen eine entzündliche Reaktion. Dies belegt, daß die vermehrte Gegenwart von T Zellen alleine für die Entstehung der Entzündung nicht ausreichend ist, sondern daß sich die Inflammation nur dann entwickelt auftritt, wenn diese T Zellen im Kolon einer SPF-Maus auf (bakterielle) Antigene in entsprechender Menge treffen. Durch die Transplantation von Dünndarmgewebe in das Kolon und umgekehrt wäre es möglich, die Bedeutung des lokalen Milieus für die Entzündungsreaktion zu untersuchen.

5.2 Rezirkulation von T-Zellen in IL-2^{-/-} Mäusen mit Kolitis

Der oben erläuterten Angleichung der Zusammensetzung intestinaler T-Zellen an die Zusammensetzung von T-Zellen der Peripherie können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß in-situ eine gesteigerte Proliferation der entsprechenden T-Zellpopulation zu den beobachteten Verschiebungen führt. Zum anderen ist denkbar, daß eine verstärkte Retention von T-Zellen im Mukosagewebe und/oder eine

gesteigerte Rekrutierung von T-Zellen aus der Blutbahn in das Darmgewebe stattfindet. Die letztere Möglichkeit wurde direkt untersucht, indem das Zirkulationsverhalten radioaktiv markierter CD4⁺CD25⁻ T-Zellen analysiert wurde.

Hierbei zeigte sich, daß in SPF-gehaltenen IL-2^{-/-} Mäusen mit zunehmender Schwere der Kolitis auch die Einwanderung von T-Zellen aus der Peripherie in das Kolon zunimmt. Dies stimmt mit dem immunhistologischen Befund von T-Zellinfiltraten überein [69]. Unter KF-Bedingungen dagegen entsprach die Organretention von T-Zellen in IL-2^{-/-} Mäusen dem physiologischen Zirkulationsmuster in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen. Zusammengefasst belegen die Daten, daß die vermehrte Einwanderung von T-Zellen in das Kolon von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen direkt mit dem klinischen Verlauf der Kolitis korreliert.

Weitere Experimente dienten der Aufklärung der an der pathologischen Rekrutierung von T-Zellen beteiligten endothelialen Addressine. Es wurden hierbei die zwei potentiell wichtigen Addressine MAdCAM-1 und VCAM-1 untersucht. MAdCAM-1 war von besonderem Interesse, da es das zentrale Addressin für Lymphozytenextravasation in das GALT ist [75, 76]. Es wird unter physiologischen Bedingungen ausschließlich in den Venolen der intestinalen Lamina propria, in den Peyer-Plaques des Dünndarmes und in den mesenterialen Lymphknoten exprimiert [107, 108]. VCAM-1 dagegen ist ein induzierbares Addressin, das in vielen entzündlichen Prozessen eine Rolle spielt [77].

In Übereinstimmung mit oben zitierten Studien fand sich in IL-2^{+/+} SPF-Mäusen folgendes Muster: MAdCAM-1 spielte für die Einwanderung von T-Lymphozyten in Dün- und Dickdarm eine dominante Rolle. Auch in den mesenterialen Lymphknoten wurde ein bedeutender Anteil der T-Zell Rekrutierung über diesen Rezeptor vermittelt. Die Blockade von VCAM-1 dagegen beeinflusste in keinem der untersuchten Organe die Einwanderung von T-Zellen signifikant.

In IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis fand sich keine veränderte Beteiligung der beiden untersuchten Addressine an der T-Zell Rekrutierung. Ebenso wie bei den IL-2^{+/+} Tieren wurde ein Großteil der Einwanderung in mesenteriale Lymphknoten, Dün- und Dickdarm über MAdCAM-1 vermittelt. Übereinstimmend zeigten immunhistologische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, daß MAdCAM-1 in SPF-gehaltenen IL-2^{-/-} Tieren [69] und in IL-10^{-/-} mit Kolitis [109] vermehrt exprimiert wird. Für VCAM-1 wurde keine Beteiligung an der T-Zell Rekrutierung gefunden. Da VCAM-1 auf kultivierten Endothelzellen mit TNF- α induziert werden kann [110] und da dieses Zytokin in der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus vermehrt exprimiert wurde, war die fehlende Rolle dieses Adhäsionsmolekül zunächst etwas

unerwartet. Allerdings konnte in mehreren Arbeiten über CED des Menschen ebenfalls keine Steigerung der VCAM-1 Expression nachgewiesen werden [111-113], so daß die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden am Menschen gut übereinstimmen. Eine andere Arbeit konnte in Kolonbiopsien von CED-Patienten keinen Anstieg von löslichem VCAM-1, wohl aber von löslichem ICAM-1 (engl. *intracellular adhesion molecule*) nachweisen [114]. Man stellt sich die Extravasation von Leukozyten als einen mehrstufigen Prozess vor [115]. Hierbei treten die Leukozyten zunächst in eine lose Wechselwirkung mit dem Gefäßendothel (*tethering*), die zu einer rollenden Bewegung (*rolling*) der Zellen an der Gefäßwand führt. Gleichzeitig werden die Leukozyten aktiviert, was zur Beteiligung weiterer Moleküle an der Interaktion mit den Endothelzellen führt. Dies ermöglicht das feste Anhaften an der Gefäßwand (*arrest*), woraufhin die Leukozyten durch das Endothel hindurch in das umliegende Gewebe auswandern können (*transmigration*). An jedem dieser Schritte nehmen verschiedene Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Leukozyt und Endothelzelle teil. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Beteiligung von VCAM-1 in der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus wäre, daß seine Funktion in der Extravasation durch andere Adhäsionsmoleküle ersetzt wird (Redundanz).

Ein besonders interessanter Aspekt dieser Befunde ist, daß die Dominanz von MAdCAM-1 als intestinales Adressin während der Kolitis aufrechterhalten bleibt. In Anbetracht der selektiven Rolle dieses Adressins im Intestinaltrakt stellt die Blockade von MAdCAM-1 eine äußerst vielversprechende therapeutische Option dar. So konnten Arbeiten an anderen Kolitismodellen eine deutliche Verminderung sowohl der Anzahl der in das Kolon rekrutierten Zellen als auch der inflammatorischen Aktivität durch blockierende Antikörper gegen MAdCAM-1 [116] und gegen seinen leukozytären Liganden $\alpha_4\beta_7$ -Integrin erzielen [117]. Die Tatsache, daß MAdCAM-1 auch beim Menschen eine tragende Rolle für die intestinale T-Zell Rekrutierung spielt, berechtigt zu der Hoffnung der Übertragbarkeit der Resultate auf die humanen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet zeigten, daß der Prozentsatz aktivierter (CD4⁺CD25⁺) $\alpha_4\beta_7^+$ - T-Zellen in beiden Formen der CED erhöht ist [118]. Allerdings wurde auch berichtet, daß andere Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und E-Selektin ebenfalls eine Rolle im Modell der DSS-induzierten Kolitis der Ratte haben [119, 120]. Entsprechende Erfahrungen wurden auch am Rattenmodell der mit Essigsäure induzierten Kolitis gemacht [121]. Auch beim Menschen deuten Arbeiten auf eine Beteiligung weiterer Adhäsionsmoleküle in CED hin [114, 122-124].

Zusammengefasst deuten diese Daten auf ein komplexes Wechselspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle bei der pathologisch gesteigerten Leukozytenrekrutierung in CED hin. Hierbei berechtigen insbesondere das tierexperimentell belegte Fehlen der Redundanz von ICAM-1 und MAdCAM-1 und die gewebsspezifische Expression dieser Adhäsionsmoleküle zu der Hoffnung, ideale Angriffspunkte für eine spezifische antiinflammatorische Intervention der CED identifiziert zu haben.

5.3 Untersuchungen intestinaler Lymphozyten

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Florareaktivität von Darmlymphozyten. Hierzu wurden sowohl in-vitro, als auch in-vivo Experimente durchgeführt.

5.3.1 In-vitro Experimente zum funktionellen Phänotyp und der Antigenpezifität intestinaler T-Zellen

Wie bereits erwähnt, führten die zahlreichen Befunde aus CED-Tiermodellen und am Menschen zu der Arbeitshypothese, daß sich im Verlauf der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus eine proinflammatorische Reaktivität der T-Zellen gegenüber der bakteriellen Flora des Kolons entwickelt.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Lymphozyten aus dem Epithel und der Lamina propria des Kolons gesunder und an Kolitis erkrankter Mäuse isoliert und in Gegenwart von verschiedenen Floraantigenen kultiviert. Als Maß für die Florareaktivität wurde die Menge an gebildetem IFN- γ gemessen, da dieses Zytokin in der Kolitis dieses Tiermodelles stark vermehrt exprimiert wird [39, 125] und da IFN- γ ein wichtiges Produkt der involvierten T_H1-Zellen ist. Die Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- *-Die deutlich gesteigerte IFN- γ Sekretion von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} aus Mäusen mit Kolitis ohne Primärstimulation und in Gegenwart polyklonaler T-Zellstimuli (anti-CD3 mAb) spiegelte den hohen Aktivierungszustand dieser Zellen beziehungsweise die Dominanz einer T_H1-Antwort in diesem Kolutismodell wider.
- In Gegenwart der Floraantigene dagegen konnte keine über das Maß der Negativkontrolle (Zellkultur ohne Stimuli) hinausgehende IFN- γ Sekretion der Kolonlymphozyten

erkrankter Mäuse festgestellt werden. Auch die Supplementierung von IL-2 im Zellkultursystem bewirkte keine antigenspezifische Produktion von IFN- γ .

Diese Daten implizieren, daß trotz der massiven Entzündung im Kolon von IL-2^{-/-} SPF-Mäusen keine proinflammatorische Reaktivität intestinaler T-Zellen gegenüber Antigenen der Darmflora entsteht.

In einigen Experimenten wurde durch die Anwesenheit von bakteriellen Antigenen die durch IL-2 induzierte IFN- γ -Sekretion sogar deutlich reduziert. Dies deutet darauf hin, daß trotz der schweren Entzündung die Kolon_{LPL} in der Lage sind, regulatorische Funktionen auszuüben. In den vergangenen Jahren wurde die besondere Bedeutung von Interleukin-10 in der Immunregulation des GALT herausgearbeitet. Darum wurde in dieser Studie die IL-10 Produktion von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} aus IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen bestimmt (Abbildung 15). Dabei zeigte sich in beiden Zellpopulationen von IL-2^{-/-} Mäusen eine gesteigerte Bildung von IL-10 auf polyklonale Stimulation (anti-CD3 Antikörper). Besonders interessant ist aber der Befund, daß Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} aus IL-2^{-/-} Mäusen in Anwesenheit von bakteriellen Antigenen mehr IL-10 bilden als ohne diese Antigene. Dieser Befund steht im Einklang mit der Analyse der mRNA-Expression, die ebenfalls eine erhöhte IL-10 Expression im entzündeten Kolon zeigte. Ähnliche Daten wurden auch am Menschen erhoben [51]. Die Frage nach der zellulären Quelle von IL-10 konnte aufgrund der Heterogenität der Zellpopulationen nicht eindeutig geklärt werden. Einerseits produzierten von erkrankten IL-2^{-/-} Mäusen isolierte Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} mehr IL-10 auf polyklonale Stimulation (anti-CD3 mAb). Andererseits konnte durch die Depletion von CD4⁺ Zellen keine eindeutige Reduktion des durch Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} in Gegenwart der bakteriellen Antigene produzierten IL-10 erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Darum ist nicht auszuschließen, daß außer T-Zellen noch andere Zellen zur IL-10 Produktion beitragen. So wurde von Hessle *et al.* berichtet, daß Zellysate von *E. coli* zu einer LPS-abhängigen, unspezifischen Induktion von IL-10 führen können [88]. Die Komplexierung von LPS durch Polymyxin B führte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht zu einer Reduktion von IL-10.

Eine andere Arbeit [78] untersuchte ebenfalls die Reaktivität von CD4⁺ T-Zellen gegenüber CBA. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß CD4⁺ T-Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten von C3H/HeJBir Mäusen mit Kolitis eine gesteigerte Reaktivität gegenüber CBA besitzen. Diese Zellen produzierten vorwiegend IL-2 und IFN- γ und waren in der Lage, im adoptiven Transfer eine Kolitis in den Empfängertieren auszulösen. Diese Daten widersprechen auf den ersten Blick den in der vorliegenden Studie gemachten

Beobachtungen. Allerdings weisen die beiden Arbeiten grundlegende Unterschiede auf. So wurde die zitierte Arbeit an einem „spontanen“ CED-Modell durchgeführt, das bedeutet, die Versuchstiere entwickeln ohne Manipulation eine Kolitis. Der diesem Phänomen zugrunde liegende Defekt ist nicht bekannt, was bei der IL-2^{-/-} Maus nicht der Fall ist. Weiterhin wurden in der zitierten Studie hohe Mengen an IL-2 in Gegenwart von CBA produziert. Da T-Zellen von IL-2^{-/-} Mäusen nicht in der Lage sind, dieses Zytokin zu bilden, sind die Resultate beider Studien nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Ausserdem wurden nicht intestinale T-Zellen untersucht, sondern Zellen aus den peripheren sekundären Lymphorganen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Etablierung von Zelllinien aus peripheren sekundären Lymphorganen zeigte, daß diese wesentlich mehr IFN- γ produzierten als entsprechende Zelllinien aus Kolon_{LPL}. Dies bedeutet, daß die Untersuchungen von peripheren und intestinalen T-Zellen sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern können.

Um die Charakterisierung der Antigenpezifität intestinaler T-Zellen und der von ihnen gebildeten Zytokine von Kolon_{LPL} erkrankter IL-2^{-/-} Mäuse zu ermöglichen, wurden durch langfristige Stimulation frisch isolierter Zellen mit CBA Zelllinien generiert. Die dabei stattfindende Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen vereinfacht die Analyse dieser Zellen entscheidend. Diese T-Zelllinie zeigte ein Zytokinprofil, welches von suppressiven Zytokinen, insbesondere IL-10 dominiert wurde. Dies steht mit den Resultaten der Restimulationsexperimente in direktem Einklang.

5.3.2 in-vivo Experimente zur Übertragbarkeit der Kolitis durch den adoptiven Transfer von T-Zellen

Die in-vitro Untersuchungen der Eigenschaften frisch isolierter Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} lieferten keine Hinweise auf eine gesteigerte IFN- γ Produktion in Gegenwart von bakteriellen Antigenen in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen mit Kolitis. Allerdings sind diese Untersuchungen mit mehreren methodischen Nachteilen behaftet. Zum einen ist die Isolation der Zellen sehr langwierig, so daß hierdurch Variationen in der Vitalität der isolierten Zellen auftreten können. Zum anderen erschwert die IL-2-Defizienz einen Vergleich der in-vitro Daten von Zellen von IL-2^{+/+} und IL-2^{-/-} Mäusen. Der Zusatz einer konstanten Menge von rekombinantem IL-2 zur Zellkultur kann dies nur bedingt kompensieren. Aufgrund dieser Nachteile der in-vitro Experimente wurden diese durch in-vivo Untersuchungen der kolitogenen Eigenschaften von Kolon_{IEL} und Kolon_{LPL} ergänzt.

Wie im Ergebnisteil ausführlicher erläutert, führte der adoptive Transfer von CBA-spezifischen Zelllinien, die ausgehend von Milzzellen von IL-2^{+/+} (SW98.1) sowie von 7Milzzellen (SK98.2) und Kolon_{LPL} (LCK98) von IL-2^{-/-} Mäusen mit Kolitis etabliert wurden, weder zu einer klinisch nachweisbaren Kolitissymptomatik in IL-2^{+/+} Empfängermäusen noch zu einer wesentlichen Beschleunigung der Kolitis in IL-2^{-/-} Empfängermäusen. Allerdings zeigte der zeitliche Verlaufes der Kolitis in IL-2^{-/-} SPF-Mäusen bereits eine hohe natürliche Varianz. Darum war die Methode des adoptiven Transfers zum Nachweis kolitogener und protektiver Eigenschaften der transferierten Zellen nur in der Lage, eine sehr ausgeprägte Beeinflussung des Krankheitsverlaufes zu zeigen. Um eine geringgradige Beeinflussung des Verlaufes der Kolitis durch den adoptiven Transfer nachweisen zu können, wäre der Einsatz von wesentlich mehr Empfängertieren unumgänglich. Dennoch stehen diese Befunde mit dem Muster der von den Zelllinien in-vitro sekretierten Zytokine im Einklang. Gemeinsam mit den in 5.4.1 diskutierten Daten zur Florareaktivität frisch isolierter Darmlymphozyten sprechen diese Ergebnisse eindeutig gegen die Ausgangshypothese der Entstehung pathologischer Florareaktivität intestinaler T-Zellen von IL-2^{-/-} Mäusen mit Kolitis. Vielmehr implizieren diese Resultate, daß trotz der massiven Entzündungsreaktion im Kolon dieser Tiere T-Zellen mit potentiell regulatorischen/suppressiven Eigenschaften vorhanden sind.

Diese Aussage erscheint auf den ersten Blick paradox, denn de facto entwickeln SPF-gehaltene IL-2^{-/-} Mäuse ja eine Kolitis und die gefundenen regulatorischen T-Zellen sind offensichtlich nicht in der Lage, die Entzündungsreaktion zu kontrollieren. Zwei mögliche Erklärungen für diesen scheinbaren Widerspruch sollen im folgenden aufgeführt werden.

Ausschlaggebend darüber, ob eine pathologische Entzündungsreaktion entsteht, ist nicht allein die Anwesenheit suppressiver und proinflammatorischer Faktoren, sondern vor allem die Relation beider zueinander. So wurde beispielsweise für CED des Menschen ein auf den ersten Blick unerklärlicher Anstieg des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1RA) gefunden [¹²⁶, ¹²⁷]. Dieses Molekül kompetitiert mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 um die Bindung an den IL-1 Rezeptor ohne jedoch eine eigene intrinsische Aktivität zu besitzen. Eine Ausweitung der Analysen ergab in späteren Studien, daß bedingt durch den noch stärkeren Anstieg von IL-1 in CED das Verhältnis IL-1 / IL-1RA ansteigt, was für eine entzündliche Erkrankung durchaus plausibel erscheint [¹²⁸, ¹²⁹].

In diesem Kontext wäre eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der IL-10 Produktion in der IL-2^{-/-} Maus, daß sie relativ zu dem massiven Anstieg proinflammatorischer Zytokine zu

gering ist, um die Entzündung zu kontrollieren. In wieweit die Zunahme von IL-10 direkt von der Flora ausgelöst wird oder sich indirekt als Folge der bereits stattfindenden Inflammation entwickelt, kann auf der Grundlage der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

Eine alternative Erklärung des Anstieges von IL-10 im Kolon trotz der vorhandenen massiven Inflammation könnte in einer defizitären Antwort des IL-2^{-/-} Organismus auf dieses suppressive Zytokin liegen. Es wäre denkbar, daß der Mangel des pleiotrophen Wachstums- und Differenzierungsfaktors IL-2 zu einer bevorzugten Beeinträchtigung IL-10 abhängiger regulatorischer Funktionen des Immunsystems kommt und darum der Anstieg an IL-10 im Verlauf der Kolitis ohne Wirkung bleibt.

Obwohl ähnliche Mechanismen auch für CED des Menschen vorgeschlagen wurden [130], erscheint diese Hypothese im Fall der IL-2^{-/-} Maus eher unwahrscheinlich, da der Zusatz von blockierende anti-IL-10 Antikörpern zu Kolon_{LPL}-Zellkulturen zu einem allgemeinen Anstieg der IFN- γ Produktion führte (*Abbildung 16*). Dies belegt zumindest für Kolon_{LPL} die Sensitivität für IL-10.

Auch wäre möglich, daß proinflammatorische Eigenschaften von Interleukin-10 an der Entstehung der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus beteiligt sind. So wurde kürzlich gezeigt, daß IL-10 unter bestimmten Umständen die IFN- γ Produktion sogar steigern kann [131]. In Anbetracht der Tatsache, daß die Interleukin-10 defiziente Maus eine Enteritis entwickelt und ebenfalls als CED-Modell verwendet wird, läßt eine proinflammatorische Funktion von IL-10 im Gastrointestinaltrakt aber eher unwahrscheinlich erscheinen [132, 133].

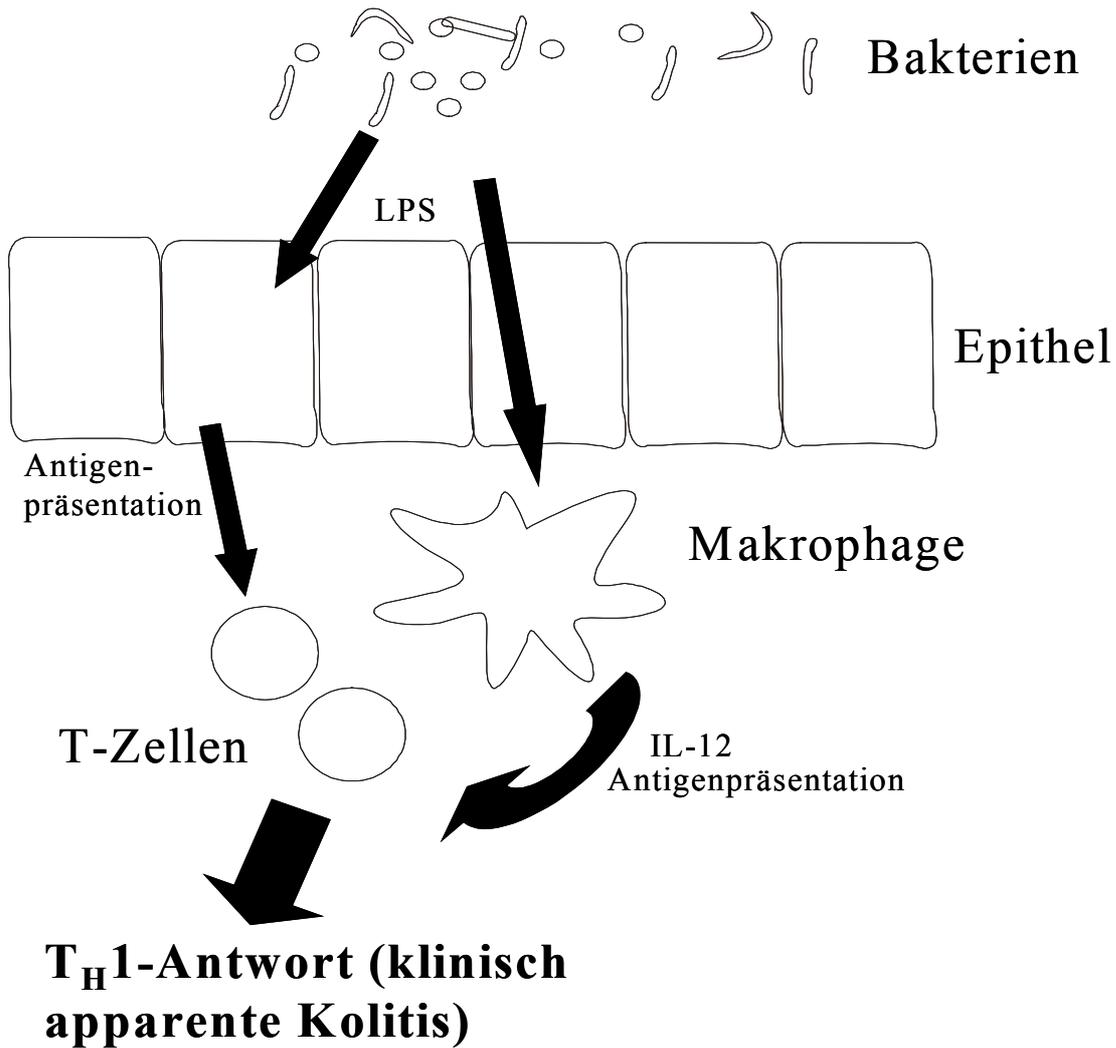
Eine endgültig Klärung der in-vivo Effektivität von IL-10 im CED-Modell der IL-2^{-/-} Maus wäre nur durch einen Therapieversuch möglich. So zeigte IL-10 bereits in mehreren CED-Modellen therapeutische Wirkung [41, 64, 134, 135], doch erste Daten am Menschen waren eher ernüchternd (Übersicht in [31]).

In Anbetracht der neuen Datenlage erscheint es angebracht, die Rolle von T-Zellen im Entzündungsgeschehen der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus neu zu definieren. Da keine Produktion von IFN- γ durch intestinale T-Zellen in der Gegenwart von bakteriellen Antigenen nachweisbar war, werden die T-Zellen vermutlich als Folge einer primären, subklinischen Entzündung sekundär aktiviert und vermitteln daraufhin die klinische Ausprägung der Kolitis. Die Darmflora scheint besonders in dieser primären Phase der Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen, da sie ja nicht unmittelbar auf intestinale T-Zellen wirkt. Der Beitrag der Flora in der späteren, klinisch apparenten Phase dagegen ist schwieriger zu beurteilen, da eine

„Sterilisation“ zuvor normal besiedelter Tiere nicht durchführbar ist. Die Therapieerfolge verschiedener Antibiotika an Mensch [32, 33] und Tier [136] implizieren jedoch, daß die Flora auch in der bereits manifesten Kolitis eine wichtige Rolle spielt.

Auch wenn der Mechanismus der Initiierung der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus und die mechanistische Bedeutung des Defizites an IL-2 noch immer unklar sind, so liegen doch bereits einige Indizien vor, die auf eine frühe Beteiligung von Makrophagen hindeuten. So haben Untersuchungen in der Frühphase der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus gezeigt, daß Makrophagen noch vor Lymphozyten in den zellulären Infiltraten des Kolons anzutreffen sind [137]. Ebenso wurde gezeigt, daß die ersten pathologisch überexprimierten Zytokine typischerweise von Makrophagen und nicht von T-Zellen gebildet werden (IL-1 und TNF- α). Außerdem ist bekannt, daß Makrophagen über den LPS-Rezeptor CD14 und TLR (engl. *toll-like receptor*) in der Lage sind, auf bakterielle Stimuli zu reagieren [138-140]. Interessanterweise wurde an der IL-2^{-/-} Maus ein sehr früher Anstieg der CD14-Expression auch auf Kolonepithelzellen gezeigt [141] was impliziert, daß neben Makrophagen auch Epithelzellen in die frühesten pathophysiologischen Ereignisse verwickelt sind. Auch der Nachweis von IL-2 Rezeptoren auf Enterozyten [142] legt nahe, daß diese von dem Defizit dieses Zytokines betroffen sein könnten.

Die folgende Skizze fasst die durch die vorliegende Arbeit hinzugewonnenen Erkenntnisse und die genannten Diskussionspunkte schematisch zusammen.



Zukünftige Arbeiten werden sich zur Überprüfung der angeführten Hypothese mit der Fragestellung gefassen, welche Zellen als erste vor der Entstehung der klinisch und histologisch apparenten Kolitis aktiviert werden. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde bereits die Detektion von NF- κ B mittels Immunfluoreszenz etabliert. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist an der Regulation von vielen immunologischen Prozessen beteiligt und seine Aktivierung in der Kolitis der IL-2^{-/-} Maus wurde bereits gezeigt. Daher sollte es der Nachweis dieser Transkriptionsfaktors am Kolonschnitt sehr junger IL-2^{-/-} Mäuse erlauben, die am frühesten aktivierten Zellen zu identifizieren,

5.4 Kolitis-induzierende Eigenschaften repräsentativer Keime der Darmflora

Der Beitrag der „physiologischen Darmflora“ zur Entstehung von CED kann sowohl für den Menschen, als auch für viele der bekannten CED-Tiermodelle als gesichert gelten [32, 33, 61, 63, 102, 103]. Da bislang vergebens nach einem CED-auslösenden Pathogen gesucht wurde, kann man es als sehr wahrscheinlich ansehen, daß die Anwesenheit der physiologischen Darmflora genügt, um im genetisch prädisponierten Individuum CED auszulösen. Allerdings steckt die Erforschung der Darmflora und ihrer Wechselwirkungen mit dem Wirt noch in den Kinderschuhen.

Die Möglichkeit der KF-Aufzucht und gezielten Besiedlung von Versuchstieren im Rahmen der gnotobiotischen Tierzucht bietet die einzigartige Möglichkeit, aus der enormen Vielfalt der Keime der Darmflora selektiv einen oder wenige Keime isoliert zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden kontrollierte Besiedlungen von IL-2^{-/-} Mäusen mit apathogenen Keimen durchgeführt, die aus der Flora SPF-gehaltener Tiere isoliert wurden.

Die Resultate dieser Experimente werden im folgenden kurz zusammengefasst und diskutiert:

- *Escherichia coli* führte bei Monobesiedlung von IL-2^{-/-} Mäusen zu einer schweren Kolitis. Diese wurde histologisch und mittels mRNA-Analyse nachgewiesen und manifestierte sich erst im Alter von 33 Wochen. Unter denselben Bedingungen gehaltene IL-2^{+/+} Mäuse blieben dagegen unauffällig. Trotz der massiven Inflammation konnte mit der neuartigen FISH-Methode weder vermehrte Epitheladhäsion noch vermehrte Translokation von Bakterien nachgewiesen werden.
- *Bacteroides vulgatus* und *Clostridium innocuum* & *C. clostridiiformis* (bis zu einem Alter von 20 Wochen) induzierten in gnotobiotischen Mäusen unabhängig vom Genotyp der Tiere keine Kolitis.
- Die gleichzeitige Besiedlung mit *E.coli* und *B.vulgatus* führte ebenso zu keiner Entzündungsreaktion im Kolon. Dies bedeutet, daß *B.vulgatus* die kolitogenen Eigenschaften von *E.coli* antagonisiert.

Auf den ersten Blick stehen diese Resultate im Widerspruch zu Arbeiten von Rath *et al* [143]. In dieser Arbeit konnte durch Monobesiedlungen von HLA-B27-transgenen Ratten gezeigt werden, daß *B. vulgatus* eine stärkere entzündliche Reaktion im Caecum dieser Tiere auslöste als *E. coli*. Allerdings war die histologisch nachgewiesene Inflammation wesentlich geringer ausgeprägt, als die massive *E. coli*-induzierte Kolitis der vorliegenden Arbeit. In jedem Fall

demonstrieren die aufgezeigten Unterschiede zwischen beiden Studien, daß sowohl die Wahl des Tiermodells, als auch die Wahl des untersuchten Bakterienstammes für das Ergebnis von grosser Bedeutung sind.

Die alleinige Erkenntnis, daß die bakterielle Darmflora an der Entstehung der CED beteiligt ist, bietet für die Therapie noch keinen entscheidenden Fortschritt. Erst die Erkenntnis, welche Keime auf welche Art auf das Darmimmunsystem einwirken, erlaubt Rückschlüsse auf therapeutische Ansatzpunkte. Im Gegensatz zur Erforschung der Wechselwirkungen von Darmpathogenen wie *Yersinia enterocolitica* mit dem Wirtsorganismus steht die Aufklärung der Beeinflussung des GALT durch die apathogene Normalflora noch weitgehend am Anfang. Daß die verschiedenen Vertreter der Darmflora zum Entzündungsgeschehen von CED unterschiedliche Beiträge leisten, läßt bereits die selektive Wirksamkeit von einigen Antibiotika wie Metronidazol oder Ciprofloxacin bei CED vermuten [32, 33].

Bacteroides vulgatus führte bei Monobesiedlung von Mäusen zu einer wesentlich deutlicheren Stimulation des GALT als andere Keime der normalen Darmflora [71]. Ausserdem wurde *B.vulgatus* in zwei CED-Tiermodellen als besonders wichtig für die Kolitisentstehung erkannt [43, 94, 143] und auch bei CED-Patienten zeigte sich abnorme Immunreaktivität gegenüber *B.vulgatus* und *E.coli* [144, 145]. Um so erstaunlicher war darum der Befund, daß dieser Keim in der IL-2^{-/-} Maus offensichtlich nicht zu einer Kolitis führt. Natürlich ist nicht auszuschließen, daß stammspezifische Unterschiede für die abweichenden Befunde verantwortlich sind. Da allerdings dieselbe Arbeitsgruppe, die zuvor von der kolitogenen Potenz von *B.vulgatus* berichtet hatte, in einem anderen CED-Modell mit demselben Keim nur eine sehr schwache Kolitis auslösen konnte [146], scheint es vielmehr wahrscheinlicher, daß der Pathomechanismus eines CED-Modells die Sensitivität gegenüber einzelnen Bakterienarten der Normalflora definiert.

Die pathogenetische Rolle von *Escherichia coli* in der Entstehung von CED wird in der Literatur sehr unterschiedlich beurteilt. Der immunhistologische Nachweis gesteigerter Präsenz von *E.coli*-Antigen wurde erbracht [147], doch die kausale Bedeutung dieses Befundes ist umstritten [148]. Ebenso wurde über vermehrte humorale Reaktivität gegenüber *E.coli*-Antigen in CED-Patienten berichtet, doch dies scheint nur Antikörper vom IgG, und nicht vom IgA-Subtyp zu betreffen [149]. Ferner ist unklar, ob sich die humorale Reaktivität sekundär als Folge der Entzündung entwickelt, oder ob sie kausal beteiligt ist [150, 151]. Die direkte Beteiligung von *E.coli* an der Auslösung von chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen ist dagegen bislang noch nicht eindeutig beschrieben worden. Auch die Fähigkeit zur Epitheladhäsion von *E.coli*-Isolaten aus gesunden Probanden und CED-Patienten wird kontrovers diskutiert. Zwar wurde über vermehrte Präsenz potentiell Epitheladhärenter *E.coli*-Stämme in CED [152] berichtet, aber dies konnte von einer anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden [153]. Neuere Arbeiten fanden eine vermehrte Immunreaktivität gegenüber *E.coli* bei CED [144]. Im Gegensatz dazu liegen auch Berichte über die erfolgreiche Verwendung von *E.coli*-haltigen Zubereitungen (Mutaflor®) zur Remissionserhaltung in der Kolitis ulcerosa vor [154, 155].

In den letzten Jahren sind viele Epidemien von entero- und uropathogenen *E.coli*-Stämmen beschrieben worden, so daß mittlerweile bereits einige der hierfür relevanten Pathogenitätsfaktoren näher charakterisiert wurden [156]. Enteropathogene *E.coli*-Stämme, die einen oder mehrere der bekannten Virulenzfaktoren tragen, können durchaus intestinale Läsionen induzieren, die große Ähnlichkeit mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben [157, 158]. Allerdings ist die Bedeutung der bekannten Pathogenitätsfaktoren für CED eher fraglich, da sie in *E.coli*-Isolaten aus CED-Patienten nicht vermehrt vorhanden waren [153, 159].

Ob die in der vorliegenden Arbeit gefundene kolitogene Potenz von *E. coli* an bislang noch nicht bekannte Virulenzfaktoren gebunden ist oder ob es sich um eine allgemeine Eigenschaft von *E. coli* handelt, ist Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte. So stellte sich vor kurzem heraus, daß ein *E. coli*-Isolat aus einem M. Crohn-Patienten, das keine bekannten Virulenzfaktoren besaß, dennoch in-vitro ebenso invasiv für Enterozyten war wie enteropathogene *E. coli*-Stämme [160]. Es wurde auch postuliert, daß die in der Kolitis ulcerosa häufig nachweisbaren pANCA-Antikörper gegenüber Epitopen von *E. coli* kreuzreaktiv sind [161, 162]. In wieweit dies allerdings kausal an der Pathogenese von CED beteiligt ist, kann derzeit noch nicht beantwortet werden. Bekannte Virulenzfaktoren von *E. coli* (EAE, EPEC, EHEC) konnten in dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm mit der RCR-Methode nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin deuten vorläufige Daten darauf hin, daß dieser *E. coli*-Stamm dennoch sehr gut an Cervix-Karzinomzellen (HeLa-Zellen) adhärieren und diese invadieren kann (Daten nicht gezeigt).

Die Tatsache, daß der in der vorliegenden Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm bei Monobesiedlung von IL-2^{-/-}, nicht aber von IL-2^{+/+} Mäusen eine schwere Kolitis auslöst, zeigt jedoch, daß normalerweise apathogene *E. coli*-Stämme sehr wohl zu chronisch entzündlichen

Reaktionen führen können. Im Gegensatz dazu führte die *E. coli*-Monobesiedlung von HLA-B27 transgenen Ratten nur zu einer sehr milden Kolitis [143].

Zwar besteht die Möglichkeit, daß die unphysiologisch hohe Keimdichte von *E. coli* unter Monobesiedlungsbedingungen ursächlich an der Pathogenese der Kolitis beteiligt war (s. *Tabelle 14*), doch dies erscheint aus zweierlei Gründen wenig wahrscheinlich. Erstens fanden sich in IL-2^{+/+} Mäusen vergleichbare Keimzahlen, ohne daß diese Tiere eine entzündliche Reaktion zeigten. Zweitens ergaben die FISH-Untersuchungen, daß trotz der hohen Keimdichte im Stuhl der Tiere nur sehr wenige Bakterien am Epithel adhärten, was als wichtige Eigenschaft von Darmpathogenen gilt. Demzufolge scheinen andere als Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle zu spielen. Ein etabliertes Kolutismodell beruht auf der Injektion von bakteriellen Zellwandpolymeren in die Darmwand [163]. Dies belegt, daß auch Bestandteile von Bakterien ohne die Anwesenheit der vitalen Keime eine Kolitis auslösen können. Eine frühe Studie zeigte ferner, daß für das GALT stimulatorische Keime der Darmflora diese Funktion auch nach Hitze- und Strahlensterilisation beibehalten [71]. Ob derartige, passive Mechanismen auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kolitis der *E. coli*-monobesiedelten IL-2^{-/-} Maus eine Rolle spielten, kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt liegt in der Vermeidung der *E. coli*-induzierten Kolitis durch die gleichzeitige Anwesenheit von *B. vulgatus*. Eine wichtige Aufgabe der physiologischen Darmflora besteht darin, Darmpathogene an der Besiedlung des Darmepithels zu hindern. Dies kann über verschiedene Mechanismen geschehen. So wurden beispielsweise antimikrobielle Faktoren für Bifidobakterien [164] beschrieben, aber auch die Konkurrenz um Epitheladhärenz und Nahrungsangebot spielen hier eine Rolle. Es wurde auch vorgeschlagen, daß im Kolon in Antwort auf *B. vulgatus* kreuzreaktives sekretorisches IgA (sIgA) gebildet wird, das ein gemeinsames LPS-Epitop von vielen Darmbakterien erkennt und somit einen allgemeinen Mechanismus zur Neutralisation von Endotoxinen darstellt [96]. Für Butyrat, ein wichtiges Endprodukt der anaeroben, bakteriellen Fermentation im Kolon wurden antiinflammatorische Eigenschaften gezeigt [165]. Ob einer der genannten Mechanismen für die Suppression der Kolutogenität von *E. coli* durch *B. vulgatus* im Modell der gnotobiotischen IL-2^{-/-} Maus eine Rolle spielt, ist derzeit nicht klar. Konkurrenz um Nahrungssubstrate scheint zumindest nicht von Bedeutung gewesen zu sein, da die gefundenen Stuhlkeimzahlen von *E. coli* durch die Anwesenheit von *B. vulgatus* nicht gemindert, sondern sogar leicht erhöht wurden. Auch eine deutliche Verminderung der Epitheladhärenz von *E.*

coli durch *B. vulgatus* war mit der FISH-Methodik nicht evident. Da die am Kolonepithel der untersuchten gnotobiotischen Mäusen adhärierenden Bakterien allerdings sehr ungleichmäßig verteilt (in „Clustern“) auftraten, war die Quantifizierung mit der FISH-Methodik nur schwer durchführbar.

Die Untersuchungen der mit *Cl. aff. innocuum* und *Cl. clostridiiformis* besiedelten Tiere im Alter von 20 Wochen ergaben bereits erste Hinweise auf eine starke Stimulation des GALT. Dies steht im Einklang zu Arbeiten von Umesaki et al., die eine vorwiegende Beeinflussung von Immunparametern des Kolons durch Besiedlung mit *Clostridien* nachwiesen [166]. Histologisch fanden sich in einigen Tieren deutliche Infiltrate der Lamina Propria mit mononukleären Zellen. Die Analyse der mRNA-Expression im Kolon zeigte weitgehend physiologische Mengen von IFN- γ und TNF- α mRNA in gnotobiotischen Tieren. Allerdings fand sich in gnotobiotischen IL-2^{-/-} Mäusen eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Expression. Ob sich zu einem späteren Zeitpunkt daraus eine manifeste Kolitis entwickelt, kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen an gnotobiotischen Mäusen, daß zum einen verschiedene apathogene Keime der normalen Darmflora sich in der Fähigkeit, in IL-2^{-/-} Mäusen eine Kolitis zu induzieren, deutlich unterscheiden. Zweitens zeigt der Vergleich mit anderen Studien, daß man die Keime der Normalflora nicht in kolitogene und nicht-kolitogene Vertreter unterteilen kann, sondern vielmehr, daß in Abhängigkeit des angewandten Tiermodelles verschieden Keime an der Entstehung der Kolitis beteiligt sind.

Man vermutet, daß sich unter den Oberbegriffen Morbus Crohn und Kolitis ulcerosa jeweils verschiedene Pathogenesen verbergen, die ein ähnliches klinisches und histologisches Erscheinungsbild haben. Darum wäre es denkbar, daß je nach zu Grunde liegendem Pathomechanismus verschiedene Keime kausal in die Entstehung der CED verwickelt sind [167, 168]. Für den therapeutischen Erfolg einer gezielten antimikrobiellen Behandlung wäre daher die Aufschlüsselung der pathogenetischen Untergruppen der CED sehr wichtig.

Zukünftige Arbeiten werden die Wechselwirkungen des Kolitis-induzierenden *E. coli*-Stammes mit dem GALT untersuchen, um die beteiligten Pathogenitätsfaktoren auf molekularer Ebene charakterisieren zu können. Diese Fragestellung ist insbesondere mit Blick

auf den therapeutischen Einsatz von *E. coli*-haltigen Präparationen wichtig, um die Sicherheit dieser Therapieansätze beurteilen zu können.

6. Zusammenfassung:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Rolle von T-Zellen in der Kolitis der Interleukin-2 defizienten Maus ($IL-2^{-/-}$) und der Beteiligung der physiologischen Darmflora an der Pathogenese.

Die Untersuchungen der mRNA-Expression im Kolon ergaben, daß die Kolitis der $IL-2^{-/-}$ Maus durch die Zytokine $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ und $IL-1$ gekennzeichnet war, was auf eine T-Zell vermittelte Immunreaktion vom T_H1 -Typ schließen läßt. Ausserdem konnte mit dieser sensitiven Methode gezeigt werden, daß die Abwesenheit einer bakteriellen Darmflora zu einer drastischen Minderung der Kolitis führte. Daraus kann man ableiten, daß der Einfluss der Nahrungsantigene auf die Kolitis eher gering ist, wogegen die bakterielle Darmflora den massgeblichen Stimulus für die Entstehung der Kolitis der $IL-2^{-/-}$ Maus darstellt. Ausserdem ist die Identifizierung der am Entzündungsgeschehen beteiligten Zytokine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Pharmaka zur Beeinflussung dieser Mediatoren. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen und die Analyse des Migrationsverhaltens belegten die vermehrte Einwanderung von $\alpha\beta TCR^+ CD4^+$ T-Zellen in das Kolon erkrankter Tiere. Eine direkte Beeinflussung von $CD4^+$ T-Zellen könnte daher ebenfalls eine neue Therapieoption sein.

Die Studien der pathologisch gesteigerten T-Zell Einwanderung zu Grunde liegenden Mechanismen ergaben, daß dem endothelialen Addressin MAdCAM-1 eine dominante Rolle in der Lymphozytenrekrutierung in der Kolitis der $IL-2^{-/-}$ Maus zukommt, wogegen das Addressin VCAM-1 keine nachweisbare Beteiligung an der Vermittlung der Inflammation hat. Ferner zeigte die vorliegende Studie auch, daß die Funktion von MAdCAM-1 bei der Rekrutierung von $CD4^+$ T-Zellen auch während der Kolitis auf das Darmkompartiment beschränkt bleibt. Dies macht MAdCAM-1 zu einer sehr interessanten Zielstruktur für einen neuartigen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von CED. Gleichzeitig belegen die präsentierten Daten, daß eine weitgehende funktionelle Blockade der Lymphozytenrekrutierung an den Ort der Entzündung mit monoklonalen Antikörpern möglich ist. Experimente mit einer längeren Anwendungsdauer der monoklonalen Antikörper werden über die therapeutische Wirksamkeit und die Sicherheit dieser Anwendung Auskunft geben.

Die Analyse der Reaktivität der interstinalen T-Zellen der IL-2^{-/-} Maus gegenüber Antigenen der bakteriellen Darmflora ergab keinen Hinweis auf eine gesteigerte proinflammatorische Reaktivität. Durch die Etablierung von spezifischen T-Zelllinien konnte im Gegenteil sogar gezeigt werden, daß trotz der massiven Inflammation des Kolons der IL-2^{-/-} Maus T-Zellen mit potentiell antiinflammatorischem Zytokinmuster vorhanden waren. Dies widerlegte die Anfangshypothese einer pathologisch gesteigerten T-Zell Reaktivität gegenüber Antigenen der Darmflora und impliziert, daß T-Zellen nicht primär in die Krankheitsentstehung verwickelt sind, sondern sekundär aktiviert werden und daraufhin die klinische Manifestation der Kolitis vermitteln. Zukünftige Untersuchungen werden der Frage nachgehen, welche Zellen direkt von der Flora stimuliert werden und wie dies zu einer sekundären Beteiligung von T-Zellen führt.

Die bedeutende Rolle der Darmflora für die Entstehung von CED kann als gesichert gelten. Für *Bacteroides vulgatus* lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeit mehrere Berichte über eine Beteiligung an der Kolitis in CED-Modellen vor. Um die Beteiligung verschiedener apathogener Vertreter der physiologischen Darmflora an der Kolitisentstehung in der IL-2^{-/-} Maus zu untersuchen, wurden Mäuse mit einem oder zwei apathogenen Keimen der Darmflora besiedelt. Diese Experimente zeigten, daß *Escherichia coli* alleine eine massive Kolitis auslöste, wogegen *Bacteroides vulgatus* keine Kolitis bewirkte und im Gegenteil sogar vor der *E. coli*-induzierten Kolitis schützte. Erste Arbeiten zu den hierbei beteiligten Mechanismen zeigten keine vermehrte Epitheladhärenz von *E. coli* in Mäusen mit Kolitis. Die Suche nach einigen bekannten *E. coli*-Virulenzfaktoren für den Menschen blieb negativ. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von *E. coli* und *B. vulgatus* kamen beide Keime in erhöhter Dichte im Stuhl vor, so daß eine Konkurrenz um Nahrungsangebot nicht für die Verhinderung der *E. coli*-induzierten Kolitis durch *B. vulgatus* verantwortlich war.

Diese Daten zeigen, daß ein vermeintlich apathogener Vertreter der Darmflora im entsprechend prädisponierten Organismus eine schwere Kolitis auslösen kann. Da die hierfür verantwortlichen Mechanismen und Virulenzfaktoren noch nicht aufgeklärt sind, mahnen die gewonnenen Erkenntnisse zu großer Sorgfalt bei der Auswahl von *E. coli*-Stämmen zur probiotischen Therapie. Zukünftige Arbeiten werden sich mit der Aufklärung der für die Kolitisinduktion relevanten Virulenzfaktoren von *E. coli* beschäftigen.

7. Literaturzitate

- 1 Dietary factors and vitamin K. *Nutr Rev* 1964;**22**:225.
- 2 Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997;**21**:357-65.
- 3 Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984;**86** :174-93.
- 4 Beagley KW, Elson CO. Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;**21**:347-66.
- 5 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;**115**:182-205.
- 6 Shanahan F, O'Sullivan GC. How do intestinal T cells sense the dietary and microbial environment? *Gastroenterology* 2000;**118**:444-6.
- 7 Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;**100**:6-10.
- 8 Elson CO. Mucosal Immunology (Academic Press; 2nd edition). 1999;
- 9 Bargen J. Experimental studies on the etiology of chronic ulcerative colitis. *J Am Med Assoc* 1924;**83**:332-6.
- 10 Dargstaedt IR, Dack GM, Kirsner JB. Chronic ulcerative colitis: a summary of evidence implicating *Bacterium necrophorum* as an etiologic agent. *Ann Surg* 1941;**114**:653-8.
- 11 Stallmach A. Immunsuppressive Therapie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. 1999;
- 12 Autenrieth IB. [Physiology and pathophysiology of intestinal flora]. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 1998;**1**:16-20.
- 13 Rotimi VO, Duerden BI. The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol* 1981;**14**:51-62.
- 14 Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, *et al.* Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996;**89**:494-501.
- 15 Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, *et al.* Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 1993;**79**:32-7.
- 16 Kawaguchi M, Nanno M, Umesaki Y, *et al.* Cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in germ-free mice is strain dependent and determined by T cells expressing gamma delta T-cell antigen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:8591-4.
- 17 Imaoka A, Matsumoto S, Setoyama H, *et al.* Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. *Eur J Immunol* 1996;**26**:945-8.
- 18 Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun* 1995;**63**:3904-13.
- 19 Butler JE, Sun J, Weber P, *et al.* Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization Of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 2000;**100**:119-30.

- 20 Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, *et al.* Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun* 1999;**67**:1992-2000.
- 21 Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, *et al.* Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect Immun* 1999;**67**:3504-11.
- 22 Petras RE, Mir-Madjlessi SH, Farmer RG. Crohn's disease and intestinal carcinoma. A report of 11 cases with emphasis on associated epithelial dysplasia. *Gastroenterology* 1987;**93**:1307-14.
- 23 Korelitz BI. Considerations of surveillance, dysplasia, and carcinoma of the colon in the management of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Med Clin North Am* 1990;**74**:189-99.
- 24 Stiefelhagen P. Extraintestinale Manifestationen und Komplikationen. *Med Monatsschrift für Pharmazeuten* 2000;**23**:274-5.
- 25 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (2) [see comments]. *N Engl J Med* 1991;**325**:1008-16.
- 26 Lutz W. Zuckerfreie Diät: eine neue Perspektive zur Behandlung des Morbus Crohn? *Z Gastroent* 1999;**19**:196.
- 27 Wright R, Truelove SC. A controlled therapeutic trial of various diets in ulcerative colitis. *Brit Med Journal* 1965;**2**:138.
- 28 Stenson WF, Cort D, Rodgers J, *et al.* Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis [see comments]. *Ann Intern Med* 1992;**116**:609-14.
- 29 Greenfield SM, Green AT, Teare JP, *et al.* A randomized controlled study of evening primrose oil and fish oil in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;**7**:159-66.
- 30 Kasper H. Ernährungsmedizin und Diätetik. 1996;
- 31 Sands BE. Novel therapies for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;**28**:323-51.
- 32 Turunen UM, Farkkila MA, Hakala K, *et al.* Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study [see comments]. *Gastroenterology* 1998;**115**:1072-8.
- 33 Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, *et al.* Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection [see comments]. *Gastroenterology* 1995;**108**:1617-21.
- 34 Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, *et al.* Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;**99**:956-63.
- 35 Olaison G, Smedh K, Sjødahl R. Natural course of Crohn's disease after ileocolic resection: endoscopically visualised ileal ulcers preceding symptoms [see comments]. *Gut* 1992;**33**:331-5.
- 36 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;**115**:182-205.
- 37 Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, *et al.* Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;**109**:1344-67.
- 38 O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;**8**:275-83.
- 39 Autenrieth IB, Bucheler N, Bohn E, *et al.* Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut* 1997;**41**:793-800.

- 40 Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;**98**:1010-20.
- 41 Powrie F, Leach MW, Mauze S, *et al.* Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994;**1**:553-62.
- 42 Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, *et al.* CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 1998;**187**:855-64.
- 43 Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, *et al.* Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;**98**:945-53.
- 44 Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, *et al.* Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;**188**:1929-39.
- 45 Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, *et al.* Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 1996;**183**:847-56.
- 46 Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, *et al.* Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 1994;**107**:1643-52.
- 47 von-Freeden JU, Davidson N, Wiler R, *et al.* IL-7 deficiency prevents development of a non-T cell non-B cell-mediated colitis. *J Immunol* 1998;**161**:5673-80.
- 48 Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, *et al.* Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997;**150**:823-32.
- 49 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;**51**:2-9.
- 50 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, *et al.* 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* 1996;**157**:1261-70.
- 51 Niessner M, Volk BA. 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* 1995;**101**:428-35.
- 52 Abbas AK, Lichtman AH, Ober JS. Cellular and molecular immunology. *Cellular and molecular immunology* 1994;(W.B. Saunders, Philadelphia; 2nd Ed.):
- 53 Schorle H, Holschke T, Hunig T, *et al.* Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991;**352**:621-4.
- 54 Sadlack B, Merz H, Schorle H, *et al.* Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene [see comments]. *Cell* 1993;**75**:253-61.
- 55 Ma A, Datta M, Margosian E, *et al.* T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J Exp Med* 1995;**182**:1567-72.
- 56 Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, *et al.* Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol* 1995;**25**:2618-25.

- 57 Sadlack B, Lohler J, Schorle H, *et al.* Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1995;**25**:3053-9.
- 58 Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, *et al.* IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999;**276**:G1461-G1472.
- 59 Orholm M, Munkholm P, Langholz E, *et al.* Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;**324**:84-8.
- 60 Orchard TR, Satsangi J, Van HD, *et al.* Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scand J Immunol* 2000;**51**:10-7.
- 61 Rutgeerts P, Goboos K, Peeters M, *et al.* Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum [see comments]. *Lancet* 1991;**338**:771-4.
- 62 Leach MW, Davidson NJ, Fort MM, *et al.* The role of IL-10 in inflammatory bowel disease: "of mice and men". *Toxicol Pathol* 1999;**27**:123-33.
- 63 Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, *et al.* The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994;**180**:2359-64.
- 64 Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, *et al.* Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;**26**:934-8.
- 65 Duchmann R, Marker HE, Meyer-zum BK. Bacteria-specific T-cell clones are selective in their reactivity towards different enterobacteria or H. pylori and increased in inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;**44**:71-9.
- 66 Davies MD, Parrott DM. Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut* 1981;**22**:481-8.
- 67 Galvin F, Freeman GJ, Razi WZ, *et al.* Murine B7 antigen provides a sufficient costimulatory signal for antigen-specific and MHC-restricted T cell activation. *J Immunol* 1992;**149**:3802-8.
- 68 Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, *et al.* The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *J Clin Invest* 1998;**102**:2096-105.
- 69 McDonald SA, Palmen MJ, Van RE, *et al.* Characterization of the mucosal cell-mediated immune response in IL-2 knockout mice before and after the onset of colitis. *Immunology* 1997;**91**:73-80.
- 70 Wold AE, Dahlgren UI, Hanson LA, *et al.* Difference between bacterial and food antigens in mucosal immunogenicity. *Infect Immun* 1989;**57**:2666-73.
- 71 Moreau MC, Ducluzeau R, Guy GD, *et al.* Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmacytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun* 1978;**21**:532-9.
- 72 Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, *et al.* IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999;**276**:G1461-G1472.
- 73 Ma A, Datta M, Margosian E, *et al.* T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *J Exp Med* 1995;**182**:1567-72.
- 74 Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, *et al.* Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol* 1995;**25**:2618-25.

- 75 Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, *et al.* Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993;**74**:185-.
- 76 Hamann A, Andrew DP, Jablonski WD, *et al.* Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 1994;**152**:3282-93.
- 77 Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* 1996;**32**:733-42.
- 78 Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, *et al.* CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 1998;**187**:855-64.
- 79 Onderdonk AB, Franklin ML, Cisneros RL. Production of experimental ulcerative colitis in gnotobiotic guinea pigs with simplified microflora. *Infect Immun* 1981;**32**:225-31.
- 80 Autenrieth IB, Bucheler N, Bohn E, *et al.* Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut* 1997;**41**:793-800.
- 81 O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;**8**:275-83.
- 82 Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, *et al.* Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;**108**:1434-44.
- 83 Groux H, O'Garra A, Bigler M, *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;**389** :737-42.
- 84 Asseman C, Mauze S, Leach MW, *et al.* An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;**190**:995-1004.
- 85 Strober W, Kelsall B, Fuss I, *et al.* Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997;**18**:61-4.
- 86 Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity [published erratum appears in *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998 Mar;**80**(3):A-6]. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;**79**:469-83.
- 87 Frankenberger M, Pechumer H, Ziegler HH. Interleukin-10 is upregulated in LPS tolerance. *J Inflamm* 1995;**45**:56-63.
- 88 Hesse C, Hanson LA, Wold AE. Interleukin-10 produced by the innate immune system masks in vitro evidence of acquired T-cell immunity to *E. coli*. *Scand J Immunol* 2000;**52**:13-20.
- 89 Warner SJ, Mitchell D, Savage N, *et al.* Dose-dependent reduction of lipopolysaccharide pyrogenicity by polymyxin B. *Biochem Pharmacol* 1985;**34**:3995-8.
- 90 Yang F, de VW, Lee EY, *et al.* Increased nuclear factor-kappaB activation in colitis of interleukin-2-deficient mice. *J Lab Clin Med* 1999;**134**:378-85.
- 91 Klebb G, Autenrieth IB, Haber H, *et al.* Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;**81**:282-6.
- 92 Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998;**42**:2-7.
- 93 DeLong EF, Wickham GS, Pace NR. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells [published erratum appears in *Science* 1989 Sep **22**;245(4924):1312]. *Science* 1989;**243**:1360-3.

- 94 Onderdonk AB, Franklin ML, Cisneros RL. Production of experimental ulcerative colitis in gnotobiotic guinea pigs with simplified microflora. *Infect Immun* 1981;**32**:225-31.
- 95 Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, *et al.* Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;**98**:945-53.
- 96 Poxton IR, Brown R, Sawyerr A, *et al.* Mucosa-associated bacterial flora of the human colon. *J Med Microbiol* 1997;**46**:85-91.
- 97 Schaedler RW. *J Exp Med* 1965;59-66.
- 98 Itoh K, Mitsuoka T. Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. *Lab Anim* 1985; **19**:111-8.
- 99 Selby WS, Janossy G, Bofill M, *et al.* Intestinal lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease: an analysis by immunohistological and cell isolation techniques. *Gut* 1984;**25**:32-40.
- 100 Matsuura T, West GA, Youngman KR, *et al.* Immune activation genes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;**104**:448-58.
- 101 Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995; **3**:171-4.
- 102 Sellon RK, Tonkonogy SL, Grable H, *et al.* Development of spontaneous colitis in IL-10 knockout mice requires normal enteric bacterial flora. *Gastroenterology* 1997;**112**:A1088.
- 103 Dianda L, Hanby AM, Wright NA, *et al.* T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* 1997;**150**:91-7.
- 104 Turunen UM, Farkkila MA, Hakala K, *et al.* Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study [see comments]. *Gastroenterology* 1998;**115**:1072-8.
- 105 Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, *et al.* Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection [see comments]. *Gastroenterology* 1995;**108**:1617-21.
- 106 Goodlad RA, Ratcliffe B, Fordham JP, *et al.* Does dietary fibre stimulate intestinal epithelial cell proliferation in germ free rats? *Gut* 1989;**30**:820-5.
- 107 Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, *et al.* A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 1988;**331**:41-6.
- 108 Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 1988;**107**:1853-62.
- 109 Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, *et al.* Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol* 1999;**65**:349-55.
- 110 Yamazaki R, Hatano H, Aiyama R, *et al.* Diarylheptanoids suppress expression of leukocyte adhesion molecules on human vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2000;**404**:375-85.
- 111 Koizumi M, King N, Lobb R, *et al.* Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;**103**:840-7.

- 112 Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, *et al.* In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. *Lab Invest* 1993;**69**:77-85.
- 113 Jones SC, Banks RE, Haidar A, *et al.* Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;**36**:724-30.
- 114 Nielsen OH, Brynskov J, Vainer B. Increased mucosal concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), sE-selectin, and interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1996;**41**:1780-5.
- 115 Williams M, Butcher EC, Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen. *J Immunol* 1997;**159**:1746-52.
- 116 Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, *et al.* Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *J Immunol* 1997;**158**:2099-106.
- 117 Hesterberg PE, Winsor HD, Briskin MJ, *et al.* Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin alpha 4 beta 7. *Gastroenterology* 1996;**111**:1373-80.
- 118 Meenan J, Spaans J, Grool TA, *et al.* Altered expression of alpha 4 beta 7, a gut homing integrin, by circulating and mucosal T cells in colonic mucosal inflammation. *Gut* 1997;**40**:241-6.
- 119 Bendjelloul F, Maly P, Mandys V, *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) deficiency protects mice against severe forms of experimentally induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000;**119**:57-63.
- 120 Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, *et al.* Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonic administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)). *Clin Exp Immunol* 1999;**117**:462-8.
- 121 Wong PY, Yue G, Yin K, *et al.* Antibodies to intercellular adhesion molecule-1 ameliorate the inflammatory response in acetic acid-induced inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**274**:475-80.
- 122 Vainer B, Nielsen OH. Changed colonic profile of P-selectin, plateket-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2 and ICAM-3 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2000;**121**:242-7.
- 123 Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, *et al.* In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. *Lab Invest* 1993;**69**:77-85.
- 124 Koizumi M, King N, Lobb R, *et al.* Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;**103**:840-7.
- 125 Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, *et al.* Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1997;**158**:566-73.
- 126 Casini RV, Kam L, Chong YJ, *et al.* Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;**154**:2434-40.
- 127 Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, *et al.* Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998;**112**:435-42.

- 128 Casini RV, Kam L, Chong YJ, *et al.* Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;**154**:2434-40.
- 129 Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, *et al.* Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998;**112**:435-42.
- 130 Schreiber S, Heinig T, Panzer U, *et al.* Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease [see comments]. *Gastroenterology* 1995;**108**:21-33.
- 131 Lauw FN, Pajkrt D, Hack CE, *et al.* Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J Immunol* 2000; **165**:2783-9.
- 132 Kuhn R, **Lohler J, Rennick D, et al.** Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;**75**:263-74.
- 133 Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996;**98**:1010-20.
- 134 Herfarth HH, Mohanty SP, Rath HC, *et al.* Interleukin 10 suppresses experimental chronic, granulomatous inflammation induced by bacterial cell wall polymers. *Gut* 1996;**39**:836-45.
- 135 Tomoyose M, Mitsuyama K, Ishida H, *et al.* Role of interleukin-10 in a murine model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998;**33**:435-40.
- 136 Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, *et al.* Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 2000;**118**:1094-105.
- 137 McDonald SA, Palmen MJ, Van RE, *et al.* Characterization of the mucosal cell-mediated immune response in IL-2 knockout mice before and after the onset of colitis. *Immunology* 1997;**91**:73-80.
- 138 Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, *et al.* Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000;**165**:1612-7.
- 139 Ziegler HH, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker [see comments]. *Immunol Today* 1993;**14**:121-5.
- 140 MacDonald TT PS. Bacterial regulation of intestinal immune responses. *Inflamm Bowel Dis* 2000;**6**:116-22.
- 141 Meijssen MA, Brandwein SL, Reinecker HC, *et al.* Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol* 1998;**274**:G472-G479.
- 142 Ciacci C, Mahida YR, Dignass A, *et al.* Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 1993;**92**:527-32.
- 143 Rath HC, Wilson KH, Sartor RB. Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;**67**:2969-74.
- 144 Matsuda H, Fujiyama Y, Andoh A, *et al.* Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;**15**:61-8.
- 145 Bamba T, Matsuda H, Endo M, *et al.* The pathogenic role of *Bacteroides vulgatus* in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;**30 Suppl 8**:45-7.

- 146 Sartor RB. Falk-Symposium 105 "Induction & Modulation of Gastrointestinal Inflammation". 1998;
- 147 Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, *et al.* Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease [see comments]. *Gastroenterology* 1995;**108**:1396-404.
- 148 Walmsley RS, Anthony A, Sim R, *et al.* Absence of Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Klebsiella pneumoniae antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* 1998;**51**:657-61.
- 149 Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, *et al.* Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;**38**:365-75.
- 150 Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, *et al.* Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000;**68**:1542-8.
- 151 Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978;**19**:108-13.
- 152 Darfeuille MA, Neut C, Barnich N, *et al.* Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;**115**:1405-13.
- 153 Schultsz C, Moussa M, van KR, *et al.* Frequency of pathogenic and enteroadherent Escherichia coli in patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Clin Pathol* 1997;**50**:573-9.
- 154 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, *et al.* Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;**354**:635-9.
- 155 Kruis W, Schutz E, Fric P, *et al.* Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;**11**:853-8.
- 156 Geyid A, Fletcher J, Gashe BA, *et al.* Invasion of tissue culture cells by diarrhoeagenic strains of Escherichia coli which lack the enteroinvasive inv gene. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;**14**:15-24.
- 157 Higgins LM, Frankel G, Douce G, *et al.* Citrobacter rodentium infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 1999;**67**:3031-9.
- 158 Ilnyckyj A, Greenberg H, Bernstein CN. Escherichia coli O157:H7 infection mimicking Crohn's disease [published erratum appears in *Gastroenterology* 1997 Jul;113(1):368]. *Gastroenterology* 1997;**112**:995-9.
- 159 Darfeuille MA, Neut C, Barnich N, *et al.* Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;**115**:1405-13.
- 160 Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, *et al.* Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999;**67**:4499-509.
- 161 Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, *et al.* Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000;**68**:1542-8.
- 162 Seibold F, Brandwein S, Simpson S, *et al.* pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol* 1998;**18**:153-60.
- 163 McCall RD, Haskill S, Zimmermann EM, *et al.* Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology* 1994;**106**:960-72.

- 164 Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* 1994;**77**:412-20.
- 165 Segain JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF- κ B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000;**47**:397-403.
- 166 Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, *et al.* Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infect Immun* 1999;**67**:3504-11.
- 167 Sands BE. Novel therapies for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;**28**:323-51.
- 168 Orchard TR, Satsangi J, Van HD, *et al.* Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scand J Immunol* 2000;**51**:10-7.
- 169 Hesterberg PE, Winsor HD, Briskin MJ, *et al.* Rapid resolution of chronic colitis in the cotton-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin alpha 4 beta 7. *Gastroenterology* 1996;**111**:1373-80.3

Lebenslauf

von
Marc Waidmann

Geburtsdatum: 02.08.1970
Geburtsort: Limburg an der Lahn

Schulbildung

1977 – 1990 Grundschule in Hünfelden-Dauborn
 altsprachliches Gymnasium „Tilemannschule“ in Limburg
 a.d. Lahn,
 Abschluss allgemeine Hochschulreife,

Zivildienst

1990-1991 Zivildienst im Rettungswesen beim DRK in Limburg a. d. Lahn
05.1992 Prüfung zum Rettungssanitäter

Universitäre Ausbildung

10.1991 – 04.1996 Pharmaziestudium an der „Johannes Gutenberg Universität“ in Mainz;
 Zweites Staatsexamen
10.1993 - 03.1994 Auslandssemester an der „Université de Bourgogne“ in
 Dijon / Frankreich im Rahmen des Erasmus-Austauschprogrammes
 der Europäischen Union

Berufspraktika

05.1996-10.1996 erste Hälfte des Praktischen Jahres in der „Hofapotheke“ in Meersburg
 am Bodensee
11.1996-04.1997 zweite Hälfte des Praktischen Jahres in der Krankenhausapotheke der
 „Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken“ in Wiesbaden
05.1997 Drittes Staatsexamen und Approbation als Apotheker

Wissenschaftliche Tätigkeit

06.1997 – 09.2000 Arbeit als wissenschaftlicher Angestellter im „Max von Pettenkofer-Institut“ für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorbereitung der Promotion über die „Rolle der bakteriellen Flora in der Kolitis der Interleukin-2 defizienten Maus“ unter der Betreuung von Prof. Dr. I. Autenrieth und Prof. Dr. H.W. Wagner und Präsentation der Resultate auf diversen internationalen und nationalen Kongressen