

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

## **Die Rolle von CD38 in intestinalen Entzündungen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Michael Schneider  
aus Gütersloh

Hamburg 2013

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.08.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Huber**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Schramm**

*„Die medizinische Wissenschaft ist in ihrem innersten Kern und Wesen  
eine sociale Wissenschaft.“*

Rudolf Virchow

Salomon Neumann

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem .....	3
1.1.1.1 Schutzbarrieren .....	3
1.1.1.2 Die Erkennung von Antigenen .....	3
1.1.1.3 Zelluläre Komponenten .....	4
1.1.1.4 Humorale Komponenten .....	6
1.1.2 Das erworbene Immunsystem .....	6
1.1.2.1 Subpopulationen und Funktionen von T-Effektorzellen .....	6
1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen .....	9
1.1.2.3 Immunpathologie .....	10
1.1.3 Mukosale Immunität .....	11
1.1.3.1 Spezielle Anforderungen an das intestinale Immunsystem .....	11
1.1.3.2 Mukosale Toleranz und Hyporesponsivität .....	12
1.1.3.3 Anatomie und Histologie des intestinalen Immunsystems .....	12
1.2 Struktur und Funktion der Glykohydrolase CD38 .....	15
1.2.1 Struktur von CD38 .....	15
1.2.2 Reaktion von CD38 als ADP-Ribosylcyclase .....	16
1.2.3 Funktionen von CD38 .....	18
1.2.3.1 CD38 als B-Zell-Oberflächenmolekül und Korezeptor .....	18
1.2.3.2 CD38 und der Metabolit cADPR .....	19
1.2.3.3 CD38 und ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) .....	20
1.3 Nukleotide in der Immunregulation .....	23
1.3.1 ADP-Ribosylierung: Voraussetzungen und Zielzellen .....	23
1.3.2 Dynamik NAD <sup>+</sup> -regulierter Immunantworten .....	23

---

<b>2.</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Material	26
3.1.1	Laborgeräte	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3	Standard- und Feinchemikalien	27
3.1.4	Mausstämme	28
3.1.5	Enzyme	28
3.1.6	Antikörper	28
3.1.7	Primer	29
3.1.8	Medien und Lösungen	30
3.1.9	Software und Programme	32
3.2	Methoden	32
3.2.1	Anwendung des DSS-Entzündungsmodells	32
3.2.2	Klinisches Assesment	33
3.2.3	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.3.1	RNA-Isolierung	34
3.2.3.2	Mengen- und Qualitätsbestimmung der RNA	35
3.2.3.3	Synthese der cDNA	37
3.2.3.4	Real-Time quantitative PCR	38
3.2.3.5	DNA-Gelelektrophorese	42
3.2.4	Durchflusszytometrische Methoden	43
3.2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	43
3.2.4.2	Aufreinigung der Zellen	44
3.2.4.3	Zählen und Verdünnen der Zellen	45
3.2.4.4	Extrazelluläre Färbung der Zellen	46
3.2.4.5	Stimulation und intrazelluläre Färbung der Zellen	47
3.2.4.6	Messung und Auswertung	47
3.2.5	Histologische Methoden	49
3.2.5.1	Einbettung und Präparatherstellung	49
3.2.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	51
3.2.5.3	Immunhistochemische Färbung	52
3.2.6	Myeloperoxidase-Test	54
3.2.6.1	Enzymatischer Myeloperoxidase-Assay	55
3.2.6.2	Proteinbestimmung mittels BCA	55
3.2.7	Graphische Darstellung und Statistik	56

---

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
4.1	Expression von CD38 auf Lymphozyten und myeloiden Zellen .....	57
4.1.1	Expression von CD38 auf Lymphozyten .....	57
4.1.2	Expression von CD38 auf myeloiden Zellen .....	59
4.2	Die Rolle von CD38 im Entzündungsmodell .....	61
4.2.1	Gewichtsverläufe .....	61
4.2.2	Klinisches Assessment .....	64
4.2.3	Histologischer Score .....	66
4.2.4	Immunhistochemie .....	70
4.2.5	Expression von Zytokinen und Chemokinen in WT- und CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	75
4.2.6	Expression von Zytokinen und Chemokinen in ART2 <sup>-/-</sup> und ART2 <sup>-/-</sup> CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	88
4.2.7	MPO-Nachweis .....	97
4.3	Zellpopulationen in WT- und CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	98
4.3.1	IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	100
4.3.2	IL-17A <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	101
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>103</b>
5.1	Expression von CD38 auf Lymphozyten und myeloiden Zellen .....	104
5.1.1	Expression von CD38 auf Lymphozyten .....	104
5.1.2	Expression von CD38 auf myeloiden Zellen .....	105
5.2	Phänotyp von CD38 <sup>-/-</sup> Tieren bei schwerer intestinaler Entzündung .....	107
5.3	Zellpopulationen in WT- und CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	113
5.4	Fazit und Ausblick .....	115
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>117</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>135</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>136</b>
	<b>Publikation</b> .....	<b>137</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>138</b>

## Zusammenfassung

Nukleotide wie  $\text{NAD}^+$  können bei Zellstress freigesetzt werden, sie besitzen vielfältige Signalfunktionen für das Immunsystem. CD38 spaltet  $\text{NAD}^+$  und synthetisiert Metabolite, die für Chemotaxis und Zellrekrutierung essentiell sind. Gleichzeitig kann extrazelluläres  $\text{NAD}^+$  mittels ART2 und P2X7 die Apoptose von T-Zellen auslösen, ein Vorgang der durch CD38-vermittelten  $\text{NAD}^+$ -Abbau unterdrückt wird. Durch Chemotaxis auf der einen und durch eine Schutzfunktion vor Apoptose auf der anderen Seite könnte CD38 die Immunantwort und Immuntoleranz beeinflussen. Die potentielle immunregulatorische Funktion zusammen mit der erhöhten Expression in der Darmmukosa deuten auf eine Rolle von CD38 bei Entzündungsprozessen im Darm hin. Ziel der Arbeit war es, die Rolle von CD38 in einem Darmentzündungsmodell aufzuklären.

In einer ersten Serie von Analysen konnte gezeigt werden, dass insbesondere Lymphozyten der Darmmukosa CD38 exprimierten. Im Vergleich zu Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten waren hier sowohl der Anteil an CD38-positiven Zellen als auch die Expressionsstärke pro Zelle erhöht. Um die Funktion von CD38 in einer Entzündung zu untersuchen, wurde das DSS-Modell (DSS: Dextransulfat-Natrium) angewendet. Dabei handelt es sich um ein etabliertes Entzündungsmodell für eine Kolitis, deren makroskopisches und histologisches Bild dem chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen entspricht. In diesem Krankheitsmodell wurden schließlich WT-, CD38<sup>-/-</sup>, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren verglichen. CD38<sup>-/-</sup> Tiere präsentierten sich in erheblich besserer Verfassung als WT-Tiere, mit abgeschwächtem Gewichtsverlust, mit besserem klinischen Bild, besseren histopathologischen Score-Werten und verminderter Zellinfiltration in der Darmmukosa. Insgesamt ergaben alle untersuchten Parameter eine abgeschwächte Entzündungspathologie in CD38<sup>-/-</sup> Tieren, verglichen mit den WT-Kontrolltieren. ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere präsentierten sich in diesen Analysen wie WT-Tiere, mit deutlichem Gewichtsverlust sowie auffälligen makroskopischen und mikroskopischen Entzündungszeichen. Die Defizienz von ART2 schien in diesen Experimenten den CD38-Verlust aufzuheben.

In DSS-behandelten Tieren wurde die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine mittels RT-PCR gemessen. CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten für die meisten Zytokine und Chemokine eine schwächere Expression in der Darmmukosa als WT-Tiere, was die Beobachtung der verminderten Entzündungsvorgänge in diesen Tieren bestätigte. Interessanterweise war hier die Folge des CD38-Verlustes unabhängig von ART2: In den ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren fand sich wie in den CD38<sup>-/-</sup> Tieren eine verminderte Expressionen bestimmter Zytokine. ART2<sup>-/-</sup> Tiere verhielten sich dagegen wie WT-Tiere. Schließlich wurde auch die Auswirkung von CD38 auf die Zusammensetzung ver-

schiedener T-Zellpopulationen unter homöostatischen Bedingungen untersucht. In diesen Untersuchungen präsentierten CD38<sup>-/-</sup> Tiere generell niedrigere Frequenzen von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen. Unsere Versuche zeigen, dass das Fehlen von CD38 zu einem abgeschwächten Entzündungsverlauf in der Darmmukosa führt, was durch die CD38-Funktion für die Zellrekrutierung erklärbar ist. Die teilweise Reversibilität der CD38-Defizienz durch die ART2-Defizienz deutet aber auch auf eine Rolle von CD38 im extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsel hin.



## Summary

Nucleotides such as NAD<sup>+</sup> released upon cell injury have various signaling functions for the immune system. By cleaving NAD<sup>+</sup>, CD38 synthesizes metabolites which affect chemokine receptor signaling. Hence, CD38 substantially influences chemotaxis and cell recruitment. Extracellular NAD<sup>+</sup> can also provoke T cell apoptosis via ART2 dependent activation of P2X7. This pathway is restricted by CD38 mediated NAD<sup>+</sup> breakdown. As a regulator of chemotactic responses as well as a protector from NICD (Nucleotide Induced Cell Death), CD38 could have decisive functions in the maintenance of immunity and immune tolerance. The enhanced expression in the intestine in combination with the proposed immunological functions suggests a role for CD38 in inflammatory bowel diseases. The aim of this study was to investigate the function of CD38 in an experimental mouse model for inflammatory bowel diseases.

In the first set of analyses, we could demonstrate that all intestinal leukocyte populations express CD38. Compared to cells isolated from spleen and lymph nodes, proportions of CD38-positive cells as well as the level of CD38 expression on the surface of cells were markedly elevated. In order to investigate the function of CD38 in intestinal inflammation, we applied the DSS colitis model (DSS: dextran sulfate sodium). In this established colitis model, mice develop an intestinal inflammation which shows macroscopic and histologic hallmarks of inflammatory bowel diseases. We compared WT-, CD38<sup>-/-</sup>, ART2<sup>-/-</sup> and ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> mice in the DSS model. In general, CD38<sup>-/-</sup> mice presented with milder clinical conditions. Mice displayed attenuated loss of weight, better clinical and histopathologic scoring, as well as diminished leukocyte infiltration in the gut. Overall, all assessments revealed reduced pathologic processes and fewer signs of severe disease in CD38<sup>-/-</sup> mice compared to control mice. In these experiments, ART2<sup>-/-</sup> and ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> mice presented symptoms of disease similar to WT-mice. These mice exhibited significant loss of weight and macroscopic and microscopic hallmarks of severe inflammation. ART2 deficiency seemed to reverse the effects of CD38 deficiency in these experiments.

Inflammatory cytokines were determined in tissues of DSS treated mice by application of real time PCR. Compared to control mice, CD38<sup>-/-</sup> mice showed markedly reduced mRNA expression levels for most of the analyzed cytokines and chemokines. This observation confirmed the attenuated inflammatory processes in CD38<sup>-/-</sup> mice. Notably, in these analyses consequences of CD38-deficiency were independent of ART2 function: Both ART<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> mice and CD38<sup>-/-</sup> mice had reduced expression levels of several cytokines. In contrast, mRNA expression profiles of ART2<sup>-/-</sup> mice were similar to those in WT mice. Finally the impact of CD38 on the composition of different

T cell populations under homeostatic conditions was investigated. In these analyses, CD38<sup>-/-</sup> mice displayed lower frequencies of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>17 cell populations. In summary, our experiments reveal impaired inflammatory processes in the intestine of CD38<sup>-/-</sup> mice. The results point to impaired inflammatory cell recruitment in the absence of CD38 as a likely explanation for this observation. The partial reversibility of the CD38<sup>-/-</sup> phenotype in ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> mice further suggests a role of CD38 for extracellular NAD<sup>+</sup> metabolism.

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abb. 1:	Balanceakt zwischen immunologischer Homöostase und pathophysiologischen Reaktionen .....	2
Abb. 2:	Aufbau des intestinalen Immunsystems .....	13
Abb. 3:	CD38 als Teil des intestinalen Expressionsmusters .....	14
Abb. 4:	Proteinstruktur der Glykohydrolase CD38 .....	16
Abb. 5:	Abbau von NAD <sup>+</sup> durch CD38 zu cADP-Ribose .....	17
Abb. 6:	NAD <sup>+</sup> -Spaltprodukte ADPR und NAADP <sup>+</sup> .....	17
Abb. 7:	Interaktion von CD38 und ART2 im extrazellulären NAD <sup>+</sup> -Stoffwechsel .....	20
Abb. 8:	Interaktion von CD38 und ART2 mit Auswirkungen auf Zellfunktionen ..	21
Abb. 9:	Untersuchung der isolierten RNA mittels Bioanalyser .....	36
Abb. 10:	Phasen der Real-Time PCR .....	38
Abb. 11:	Temperaturzyklen der Real-Time PCR .....	39
Abb. 12:	Temperaturverlauf der Schmelzkurve .....	40
Abb. 13:	PCR-Produkte in der DNA-Elektrophorese .....	43
Abb. 14:	Eingrenzung von Lymphozyten und Leukozyten .....	48
Abb. 15:	Ausgrenzung der Dubletten .....	48
Abb. 16:	Identifizierung hämatopoetischer Zellen .....	49
Abb. 17:	Prinzip der immunhistochemischen Färbung .....	52
Abb. 18:	Expression von CD38 auf T-Lymphozyten .....	58
Abb. 19:	Expression von CD38 auf myeloiden Zellen .....	60
Abb. 20:	Gewichtsverläufe der Versuchstiere .....	62
Abb. 21:	Gewichtsverläufe in den einzelnen Versuchstiergruppen .....	63
Abb. 22:	Darmlänge gesunder und DSS-behandelter Tiere .....	64
Abb. 23:	Längen/Gewichtsverhältnis gesunder und DSS-behandelter Tiere .....	65
Abb. 24:	Auswertung des klinischen Scorings .....	66
Abb. 25:	Histopathologie der Kolitis in WT- und CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	67
Abb. 26:	Auswertung des histologischen Scorings .....	69
Abb. 27 A:	Immunhistochemische Färbung von Monozyten und Makrophagen, DSS-behandelte Tiere .....	70
Abb. 27 B:	Immunhistochemische Färbung von Monozyten und Makrophagen, gesunde Tiere .....	71
Abb. 28 A:	Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten, DSS-behandelte Tiere .....	72

Abb. 28 B: Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten, gesunde Tiere .....	73
Abb. 29: Expression von TNF $\alpha$ in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere .....	76
Abb. 30: Expression von IL-6 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere .....	78
Abb. 31: Expression von CXCL1 in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere .....	79
Abb. 32: Expression von CXCL2 in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere .....	81
Abb. 33: Expression von CCL2 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere ...	82
Abb. 34: Expression von CXCL10 in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere .....	84
Abb. 35: Expression von IL-17A und IL-23p19 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere .....	85
Abb. 36: Expression von IL-10 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere ....	87
Abb. 37: Expression von TNF $\alpha$ in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere .....	89
Abb. 38: Expression von IL-6 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere .....	90
Abb. 39: Expression von CXCL1 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere .....	91
Abb. 40: Expression von CXCL2 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere .....	92
Abb. 41: Expression von CCL2 im Darm DSS-behandelter Tiere .....	93
Abb. 42: Expression von CXCL10 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere .....	94
Abb. 43: Expression von IL-17A und IL-23p19 im Darm DSS-behandelter Tiere .....	95
Abb. 44: Expression von IL-10 im Darm DSS-behandelter Tiere .....	96
Abb. 45: MPO-Aktivität in Relation zum Gesamtprotein .....	98
Abb. 46: Charakterisierung von T-Zellpopulationen im Gesunden: Identifizierung der Zellen .....	99
Abb. 47: Anteile von IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in WT- und CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	100
Abb. 48: Anteile von IL-17A <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in WT- und CD38 <sup>-/-</sup> Tieren .....	101
Abb. 49: Synopsis der CD38-Funktionen für Zellrekrutierung und extrazellulären NAD <sup>+</sup> -Stoffwechsel .....	112

### Tabellen

Tab. 1: Expression von CD38, ART2 und P2X7 .....	22
Tab. 2: Klinischer Score .....	33
Tab. 3: Programm für die cDNA-Synthese .....	37
Tab. 4: Programm für die Paraffin-Einbettung .....	50
Tab. 5: Histologischer Score .....	51

Tab. 6:	Färbung der Lymphozyten .....	58
Tab. 7:	Färbung myeloider Zellen .....	60
Tab. 8:	Klinischer Score .....	66
Tab. 9:	Histologischer Score .....	68
Tab. 10:	Extrazelluläre Färbung .....	99
Tab. 11:	Intrazelluläre Färbung .....	99

---

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-biotinyliertes Enzym-Komplex
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
cADPR	zyklische ADP-Ribose
CCL	CC-Motiv Chemokin
CCR	CC-Motiv Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CT	Threshold Cycle
CXCL	CXC-Motiv Chemokin
CXCR	CXC-Motiv Chemokin Rezeptor
Cy	Indodicarbocyanin
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DAPI	Diamidinphenylindol
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethyldicarbonat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSS	Dextransulfat Natrium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter
GAPDH	Glyceraldehyd-P-Dehydrogenase
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten

---

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
LPL	Lamina-propria-Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
MAdCAM	Mucosal Vascular Addressin Cellular Adhesion Molecule
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transkriptase
MPO	Myeloperoxidase
NAADP <sup>+</sup>	Nikotinsäure-Adenindinukleotid-Phosphat
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenindinukleotid
NADase	NAD <sup>+</sup> -Glykohydrolase
NICD	Nucleotide Induced Cell Death
NRS	Normales Rattenserum
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol Myristyl Acetat
PP	Peyersche Plaques
PRR	Pattern Recognition Rezeptoren
RIN	RNA-Integritätsindex
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Carboxyrhodamin-N-Hydroxysuccinimide
rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SSC	Sidescatter
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TGF	Transforming Growth Factor
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UNG	Uracil-N-Glykohydrolase
WT	Wildtyp
-/-	homozygote Gendeletion





## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

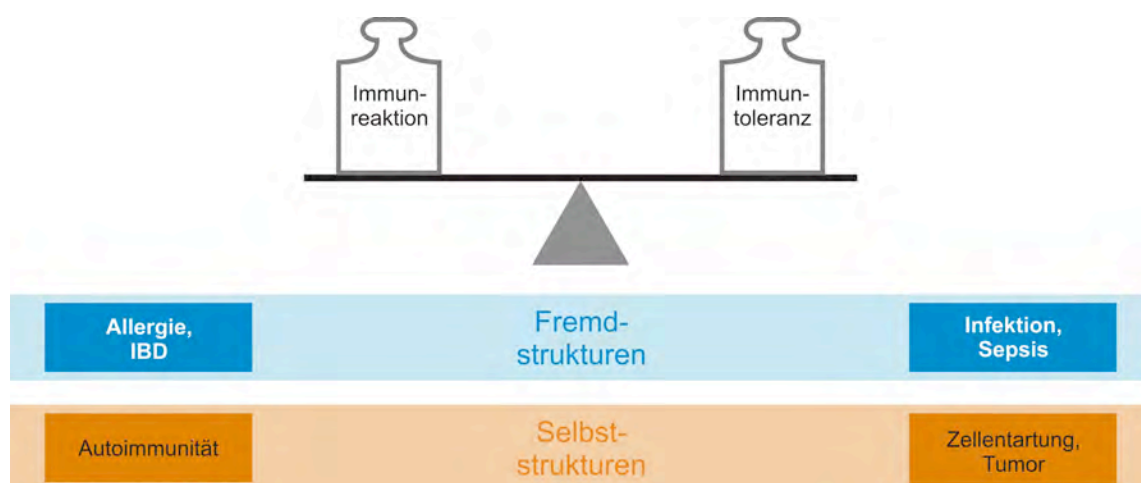
Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Körper vor eindringenden Mikroorganismen, vor entarteten eigenen Zellen sowie vor potentiell toxischen Molekülen zu schützen. Es besteht aus zwei konzeptionell verschiedenen, aber eng miteinander verzahnten Anteilen, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch älter und kommt bereits bei wirbellosen Organismen vor. Beide Systeme greifen im Wesentlichen auf unterschiedliche humorale und zelluläre Mechanismen zurück, kooperieren jedoch eng miteinander. Dies gilt insbesondere für die Abwehrmechanismen des Darms.

Ein fundamentales Prinzip des Immunsystems ist die Eigenschaft, zwischen Selbst- und Fremdstrukturen zu unterscheiden (Klein 1999). Selbststrukturen wurden ursprünglich definiert als alles, was im Genom des Organismus kodiert ist, d.h. sämtliche körpereigenen Zellen und Gewebe. Körperfremde Mikroorganismen zählte man dagegen zu den Fremdstrukturen. Nach klassischer Vorstellung rufen nur Fremdstrukturen eine Immunantwort hervor, Selbststrukturen dagegen grundsätzlich nicht. Allerdings sind die Aufgaben des Immunsystems komplexer, denn wie körpereigene Zellen sollen auch Symbionten oder harmlose Kommensalen sowie Nahrungsantigene keine Immunantwort hervorrufen. Gleichzeitig müssen infizierte oder entartete Körperzellen wie pathogene Mikroorganismen erkannt und entfernt werden. Eine aktuellere Ansicht geht davon aus, dass das Immunsystem daher zusätzlich auf Gefahrensignale, sogenannte Danger-Signals reagiert (Matzinger 1994, Matzinger 2002).

Für die Identifizierung von Fremdstrukturen ist neben der Erkennung des Antigens an sich die parallele Wahrnehmung eines Danger-Signals von großer Bedeutung. Solche Gefahrensignale können konservierte mikrobielle Strukturen, wie z.B. Lipopolysaccharid sein, sie werden dann als Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs) zusammengefasst (Heine und Lien 2003). Auch körpereigene Strukturen können Gefahrensignale vermitteln, sog. Alarmine. Dabei handelt es sich um Moleküle, die intrazellulär lokalisiert sind und die bei Beschädigung der Zellen frei werden. Zur Gruppe der Alarmine zählen neben Hitzeschockproteinen und HMGB1 auch Nukleotide wie ATP und NAD<sup>+</sup> (Gallucci und Matzinger 2001, Adriouch et al. 2012). PAMPs und Alarmine werden unter dem Begriff Damage-associated Molecular Patterns (DAMPs) zusammengefasst. Strukturen, von denen diese Gefahrensignale

ausgehen, werden als Fremdstrukturen wahrgenommen und initiieren schließlich eine Immunantwort (Bianchi 2007, Eberl 2010, Manson et al. 2012).

Eine ideale Immunabwehr beruht auf der Balance zwischen Abwehr und Toleranz. Störungen des Balanceaktes zwischen Immunreaktion und Immuntoleranz führen zur Immunpathologie (Abb. 1). Eine überschießende Reaktion gegen Kommensalen oder harmlose Antigene bildet den wesentlichen pathophysiologischen Prozess bei Erkrankungen wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, der glutensensitiven Enteropathie oder dem Asthma bronchiale (Holt et al. 1999, Braun und Wei 2007). Richtet sich eine Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe, kommt es zu Autoimmunerkrankungen. Eine pathologisch übersteigerte Toleranz dagegen hat die Ausbreitung von Mikroorganismen oder das Überleben infizierter oder mutierter Körperzellen zur Folge. Konsequenzen sind schwere Entzündungen oder bestimmte Tumorerkrankungen (Bouma und Strober 2003, Sansonetti 2004, Bäckhed et al. 2005).



**Abb. 1: Balanceakt zwischen immunologischer Homöostase und pathophysiologischen Reaktionen**

Sowohl überschießende Immunreaktionen als auch eine übersteigerte immunologische Toleranz führen zu pathologischen Zuständen. IBD: Inflammatory Bowel Disease. Abbildung modifiziert nach Renz-Polster und Krautzig (2008).

Die Effektormechanismen vor allem des angeborenen Immunsystems besitzen einen ungerichteten Charakter. Dies führt dazu, dass die meisten Immunreaktionen zu Kollateralschäden an gesunden Zellen und Geweben führen (Medzhitov 2008). Derartige Schäden können in Kauf genommen werden, wenn sie begrenzt bleiben und wenn nach Abschluss der Immunantwort die Möglichkeit zur Ausheilung besteht. Bei chronischen Infektionen können die genannten unerwünschten und destruktiven Nebenef-

efekte der Entzündung überwiegen. Daher verfügt das Immunsystem über differenzierte regulatorische Mechanismen, um sich bei chronischen Infektionen selbst zu begrenzen und Gewebeschäden zu minimieren (Mege et al. 2006). Im Darm ist das Gleichgewicht zwischen Immunreaktion und Immuntoleranz aufgrund des mikrobiologischen Umfelds besonders wichtig. Daher verfügt das intestinale Immunsystem über spezielle Regulationsmechanismen, zu denen möglicherweise auch die Expression von CD38 auf T-Zellen gehört.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

#### 1.1.1.1 Schutzbarrieren

Als Körperoberfläche besitzt die intestinale Mukosa wichtige immunologische Funktionen. Das mukosale Epithel ist von einer gelähnlichen Schleimschicht bedeckt, in der sich zahlreiche Mucinproteine befinden. Diese stark glycosylierten Proteine, im Dünndarm vor allem MUC2, werden als Polymere sezerniert und besitzen eine netzartige Struktur. Sie gewährleisten die Stabilität der Schleimschicht und erschweren die Anheftung von Bakterien an das Epithel. MUC2-Defekte führen bei Mäusen zur Entwicklung einer der Colitis ulcerosa ähnlichen Entzündung. Zusammen mit der Epithelschicht und den Tight junctions, bestehend aus Adhäsionskontakten und Schlussleisten, entsteht eine dichte Barriere in der Darmmukosa (Johansson et al. 2008, Heazlewood et al. 2008, Garrett et al. 2010).

#### 1.1.1.2 Die Erkennung von Antigenen

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, konservierte mikrobielle Strukturen wie PAMPs zu erkennen (Delves und Roitt 2000a). Zur Antigenerkennung tragen die Zellen des angeborenen Immunsystems sogenannte Pattern Recognition Rezeptoren (PRR). Diese Rezeptoren sind keimbahnkodiert; sie werden im Verlauf der Immunantwort nicht verändert. Das angeborene Immunsystem bildet daher auch kein immunologisches Gedächtnis (Janeway 1989). Die wichtigsten Rezeptoren sind die TOLL-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like Receptors oder TLR), NOD- und NOD-ähnliche Proteine (Nucleotide Binding Oligomerization Domain) sowie C-Typ Lektin-Rezeptoren (Janeway und Medzhitov 2002).

TLRs reagieren auf konservierte mikrobielle Strukturen, so wird z.B. Lipopolysaccharid von TLR4 oder Flagellin von TLR5 erkannt. Zu den C-Typ Lektin-Rezeptoren gehören z.B. Mannoserezeptoren. Diese Rezeptoren haben Domänen zur Erkennung von Koh-

lenhydratstrukturen, die z.B. von bakteriellen Zellwandbestandteilen stammen (Beutler 2004). Die Proteine der NOD-Familie fungieren als intrazelluläre Pattern Recognition Rezeptoren. Diese Proteine sind insbesondere für die intestinale Mukosa wichtig. NOD1 erkennt ein für Peptidoglycan spezifisches Dipeptid, welches ein Abbauprodukt Gram-negativer Bakterien ist. NOD1 ist in Epithelzellen, aber auch in professionellen Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen exprimiert. NOD2 bindet Muramyl-Dipeptid, ebenfalls ein Abbauprodukt von Proteoglycanen. Dieser Rezeptor liegt u.a. in Paneth-Zellen vor, die auf eine Aktivierung hin Defensine bilden (Masumoto et al. 2006, Kufer et al. 2006). Die Aktivierung von Pattern Recognition Rezeptoren führt zur Synthese verschiedener inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie in professionellen APZ zur Aktivierung und Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 (Greenwald et al. 2005).

### 1.1.1.3 Zelluläre Komponenten

#### Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Zellen der Erstantwort. Sie bilden mit etwa 65% die größte Subpopulation der Granulozyten, zu denen auch Eosinophile und Basophile gezählt werden. Neutrophile Granulozyten werden über bestimmte Chemokine, vor allem CXCL1, 2, 3, 4, 8, 12, Leukotriene (LTB<sub>4</sub>), Komplementspaltprodukte (C3a, C5a) und weitere Mediatoren an den Ort der Entzündung rekrutiert (Murphy et al. 2008). Dort können sie Mikroorganismen entweder phagozytieren und lysosomal abbauen oder die Erreger durch Exozytose der lysosomalen Granula im extrazellulären Umfeld vernichten. Da die Effektormechanismen wie lysosomale Enzyme, Chlor- und Sauerstoffradikale ungerichtet funktionieren, werden dabei auch Schäden an umliegenden gesunden Zellen und Geweben verursacht (Segal 2005, Dale et al. 2008).

#### Makrophagen

Makrophagen besitzen wichtige Funktionen im Rahmen des Abbaus von Mikroorganismen und der Antigenpräsentation. Sie stellen – zusammen mit den DCs – ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Makrophagen leiten sich von den Monozyten her, die nach Verlassen des Knochenmarks zunächst im Blut zirkulieren und anschließend in unterschiedlichen Geweben sesshaft werden. Werden Makrophagen mit Mikroorganismen konfrontiert, können sie diese z.B. mittels C-Typ Lektin-Rezeptoren, Komplementrezeptoren oder Fc-Rezeptoren binden, anschließend phagozytieren und lysosomal abbauen. Für einige Pathogene, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, ist die antibakterielle Kapazität ruhender Makrophagen unzureichend.

Erst nach Aktivierung durch  $T_H1$ -Zellen sind sie in der Lage, diese Pathogene zu vernichten (Kaufmann 2002). Durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen tragen Makrophagen zur Rekrutierung verschiedener Zellen zum Ort der Entzündung sowie zur Aktivierung dieser Zellen bei (Geissmann et al. 2010). Auf zirkulierenden humanen Monozyten ist CD38 exprimiert (Zilber et al. 2000).

### Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind darauf spezialisiert, Antigene zu prozessieren, anschließend zu präsentieren und schließlich die adaptive Immunantwort einzuleiten. DCs finden sich bevorzugt an Körperoberflächen, d.h. in der Epidermis der Haut oder in der Lamina propria der intestinalen Mukosa. Nach Antigenaufnahme und Prozessierung in Anwesenheit der erwähnten Danger-Signals wandern DCs in die drainierenden Lymphknoten. Dort aktivieren sie durch die Präsentation von Antigen und die gleichzeitige Expression von kostimulatorischen Molekülen naive T-Zellen. Durch die Sekretion von Zytokinen wie z.B. IL-12 oder IL-23 sind sie auch an der Differenzierung von T-Zellen beteiligt. Dadurch sind DCs in der Lage, T-Zellantworten zu initiieren und zu polarisieren (Kapsenberg 2003, Steinman und Banchereau 2007, Varol et al. 2010).

### NK-Zellen

NK-Zellen sind zytotoxische Lymphozyten; sie erkennen gestresste Zellen, aber auch solche, die sich durch eine fehlende MHC-I-Expression der Kontrolle durch  $CD8^+$  T-Zellen entziehen. Über Fc-Rezeptoren werden auch antikörpermarkierte Zellen erkannt. Die Erkennung von Körperzellen durch NK-Zellen kann dann zur Lyse derselben führen. NK-Zellen sind daneben wichtige Produzenten von Zytokinen wie z.B. von  $IFN\gamma$  (Orange und Ballas 2006).

### $\gamma\delta$ T-Zellen

Diese T-Zellen besetzen eine Sonderstellung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen tragen diese Zellen einen alternativen T-Zellrezeptor (TZR), der aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette besteht, und normalerweise keinen Korezeptor wie CD4 oder CD8. Eine Ausnahme sind sogenannte unkonventionelle  $CD8^+$  T-Zellen, die in der Lamina propria der intestinalen Mukosa vorkommen und die den  $CD8\alpha\alpha$ -Korezeptor zusammen mit dem  $\gamma\delta$ TZR tragen können. Weitere Rezeptoren der  $\gamma\delta$ T-Zellen sind solche, die auch auf NK-Zellen exprimiert werden, wie z.B. NKG2D. Die Funktion von  $\gamma\delta$ T-Zellen ist unklar. Sie erkennen vor allem konservierte Antigene von beschädigten oder stressexponierten Zellen. Diskutiert wird eine Immunsurveillance-Funktion im Rahmen einer frühen Immunantwort (Carding und Egan 2002, Bonneville et al. 2010).

#### 1.1.1.4 Humorale Komponenten

Wichtige humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Defensine, daneben auch das Komplementsystem und inflammatorische Zytokine. Defensine spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der immunologischen Homöostase im Darm (Ramasundara et al. 2009). Man unterscheidet  $\alpha$ -Defensine, die vor allem von Paneth-Körnerzellen des Dünndarms synthetisiert werden, und  $\beta$ -Defensine, die von Epithelzellen und Plasmazellen im Kolonepithel gebildet werden. Defensine sind anionische Proteine, die an bakterielle Oberflächen binden und Bakterien töten. Sie begrenzen effektiv die Stimulierung und Aktivierung subepithelial gelegener, angeborener Immunmechanismen durch intestinale Bakterien. Defensine können die Freisetzung verschiedener Zytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$  stimulieren (Yang et al. 2002, Zasloff 2003).

#### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Die zentralen Komponenten des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Zellen sowie Antikörper als lösliche Produkte der B-Zellen. T- und B-Zellen stammen wie alle Leukozyten von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Während B-Lymphozyten im Knochenmark zu naiven B-Zellen heranreifen, finden bei T-Lymphozyten die entscheidenden Reifungsschritte im Thymus statt. Hier kommt es zur somatischen Rekombination, in der die antigenerkennenden Bereiche der TZR-Ketten durch die Kombination verschiedener Genfragmente hergestellt werden. Durch diese Kombination wird eine sehr hohe Diversität des TZR erreicht. Um Autoreaktivität zu vermeiden, durchlaufen T-Zellen dann eine positive Selektion (Apoptose bei fehlender Affinität zu eigenen MHC-Molekülen) und eine negative Selektion (Apoptose bei hoher Affinität zu Selbstantigen-MHC-Komplexen). Durch diese Schritte wird die zentrale Toleranz von T-Zellen erreicht. Prinzipiell sollten keine autoreaktiven Zellen den Thymus verlassen; man weiß allerdings, dass eine gewisse Anzahl autoreaktiver Zellen trotzdem in peripheren Immungeweben vorliegt. Hier greifen dann Mechanismen der peripheren Toleranz (Kap 1.1.2.3). Neben der Reifung von konventionellen T-Zellen, die entweder CD4-positiv oder CD8-positiv sind, entstehen im Thymus auch doppelt negative CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen, die mehrheitlich den  $\gamma\delta$ TZR tragen (Delves und Roitt 2000b, O'Brien et al. 2001).

##### 1.1.2.1 Subpopulationen und Funktionen von T-Effektorzellen

Die Effektormechanismen der T-Zell-Subpopulationen sind vielfältig. CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermitteln in erster Linie direkte Zytotoxizität gegenüber Zielzellen, synthetisieren aber auch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  zur Aktivierung von Makrophagen sowie weitere Zytokine. Bei

---

CD4<sup>+</sup> T-Zellen steht die Hilfsfunktion für andere Zellen wie Makrophagen oder B-Zellen im Vordergrund, aber auch diese Zellen besitzen z.T. zytotoxische Eigenschaften. CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden unter dem Begriff T-Helferzellen zusammengefasst (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17). T-Zellen, die Immunreaktionen aktiv unterdrücken, werden unter dem Begriff regulatorische T-Zellen subsumiert (T<sub>reg</sub>, T<sub>r</sub>1, T<sub>H</sub>3). Zu erwähnen sind außerdem die NKT-Zellen. Diese exprimieren neben T-Zell-Charakteristika wie dem TZR und CD3 auch NK-Rezeptoren. NKT-Zellen zeigen vielfältige Funktionen im Rahmen angeborener und adaptiver Immunantworten (Bendelac et al. 2007).

### Konventionelle CD8<sup>+</sup> T-Zellen: Zytotoxische Zellen

Zytotoxische Zellen zirkulieren durch sekundäre lymphatische Organe. Sie können aktiviert werden, wenn sie auf professionelle APZ treffen, die Antigene auf MHC-Rezeptoren präsentieren und gleichzeitig CD80/86 exprimieren. Aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferieren unter IL-2-Stimulation und können anschließend Effektorfunktionen wahrnehmen. Findet die primäre Aktivierung in Abwesenheit kostimulatorischer Signale statt, z.B. durch eine nicht-professionelle APZ, führt dies zu einer Inaktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zelle. Dieser Mechanismus verhindert die Aktivierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen und dient dadurch der peripheren Toleranz. Zu den Effektormolekülen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zählen Perforine, die Ca<sup>2+</sup>-abhängig zu einem Kanal in der Membran der Zielzelle polymerisieren, und Granzyme, die nach Eintritt in das Zytoplasma Prokaspasen aktivieren und die Apoptose auslösen. Ferner können CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Apoptose über CD95L (FAS-L) auslösen (Podack 1995).

### Unkonventionelle CD8<sup>+</sup> T-Zellen: CD8 $\alpha\alpha$ T-Zellen

In der intestinalen Mukosa kommen zahlreiche unkonventionelle T-Zellen vor. Diese Zellen bilden unter den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) der Maus die größte Population. Sie sind durch die Expression des unkonventionellen CD8 $\alpha\alpha$ -Korezeptors charakterisiert. Diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren entweder den  $\alpha\beta$ TZR oder den  $\gamma\delta$ TZR und binden nicht an MHC-I. Die Funktion der Zellen ist kaum verstanden, möglicherweise dienen sie der Akutantwort gegen Pathogene oder der Abwehr entarteter Zellen. Diskutiert wird eine pathophysiologische Rolle bei der glutensensitiven Enteropathie (Johansson-Lindbom und Agace 2007, Abadie et al. 2012).

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen rezirkulieren mittels CD62L und CCR7 durch sekundäre lymphatische Gewebe. Bei Erkennung des passenden Antigens auf einer professionellen APZ in Gegenwart kostimulatorischer Signale wird die T<sub>H</sub>-Zelle aktiv und proliferiert. Sie

---

zeigt initial einen  $T_H0$ -Subtyp, der abhängig vom Zytokinmilieu unterschiedliche Differenzierungswege einschlagen kann (Abbas et al. 1996, Harrington et al. 2005).

### CD4<sup>+</sup> $T_H1$ -Zellen

Unter dem Einfluss von IL-12 und IL-18 differenzieren die  $T_H0$ -Zellen zum  $T_H1$ -Subtyp. Diese Differenzierung wird durch IL-4 und IL-10 gehemmt.  $T_H1$ -Zellen haben eine wichtige Funktion bei der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene. So verfügt z.B. *Mycobacterium tuberculosis* über Escape-Mechanismen, die den lysosomalen Abbau phagozytierter Bakterien effektiv verhindern. Nicht-aktivierte Makrophagen sind außerstande, diese Mykobakterien intrazellulär abzubauen. Als wichtige Effektor-mechanismen exprimieren  $T_H1$ -Zellen  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  und CD154: Diese Moleküle wirken synergistisch bei der Aktivierung von Makrophagen, welche im hochaktivierten Zustand schließlich Mykobakterien abbauen können. Mittels Sekretion von IL-12 und IL-18 unterstützen Makrophagen und DCs wiederum die  $T_H1$ -Differenzierung (Mosmann et al. 1986, Kaufmann 2002, Schneider et al. 2010).

### CD4<sup>+</sup> $T_H2$ -Zellen

$T_H2$ -Zellen dienen vor allem der Abwehr von Parasiten. Eine  $T_H2$ -polarisierte Antwort wird durch Parasiten-Antigene und Allergene induziert. Auf Ebene der Zytokine wird die Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen durch IL-4 induziert sowie durch  $IFN\gamma$  unterdrückt.  $T_H2$ -Zellen stimulieren die Hämatopoese (mittels IL-3, „multi-CSF“), stimulieren B-Zellen zur Synthese von IgE und IgG1 (IL-4 und IL-13) und fördern eine Differenzierung der Eosinophilen (IL-5). Sie wirken hemmend auf die  $T_H1$ -Differenzierung (IL-4) und hemmend auf die Synthese bestimmter inflammatorischer Zytokine und stimulierend auf die Synthese muzinösen Schleimes (beides Effekte von IL-13). Zusammengefasst induzieren die  $T_H2$ -Zytokine antiparasitäre und IgE-vermittelte allergische Immunantworten (Coffman und Carty 1986, Couper et al. 2008, Paul und Zhu 2010).

### CD4<sup>+</sup> $T_H17$ -Zellen

Das  $T_H1/T_H2$ -Modell kann viele Phänomene der adaptiven Immunität wie Entzündungen und Allergien erklären, hat sich aber für einige Mechanismen der Autoimmunität und Immunpathologie als unzulänglich erwiesen. Kürzlich wurde mit den  $T_H17$ -Zellen ein neuer  $T_H$ -Subtyp charakterisiert, der zumindest für einen Teil der bisher nicht verstandenen Mechanismen verantwortlich ist.  $T_H17$ -Zellen initiieren und verstärken die Abwehr extrazellulärer Pathogene, die durch eine  $T_H1$  oder  $T_H2$  polarisierte Immunantwort nicht beherrscht werden können. Wegen ihres proinflammatorischen Potenzials wird für  $T_H17$ -Zellen sowie für die Zytokine IL-17A und IL-23 eine



---

Beteiligung an zahlreichen Immunpathologien diskutiert, so z.B. auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Maloy 2008, Ito et al. 2008, Weaver et al. 2007).

Ein wichtiges Effektorzytokin von  $T_H17$ -Zellen ist IL-17A, es induziert in Fibroblasten und Epithelzellen die Bildung von IL-6, CXCL2, CXCL8, G-CSF, GM-CSF und stimuliert somit Neubildung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich synthetisieren  $T_H17$ -Zellen IL-17F, IL-22 und  $TNF\alpha$ . IL-22 vereint pro- und antiinflammatorische Eigenschaften; die wichtigsten bekannten Funktionen sind die Induktion mukosaler Wundheilung und die Aufrechterhaltung mukosaler Integrität. Dies geschieht insbesondere durch die Induktion von  $\beta$ -Defensinen in Epithelzellen (Ouyang und Valdez 2008, Bettelli et al. 2008, Aujla und Kolls 2009).

Die Differenzierung von  $T_H17$ -Zellen lässt sich wie folgt zusammenfassen: IL-6 und  $TGF\beta$  induzieren initial die Entwicklung von der naiven  $CD4^+$  T-Zelle hin zum  $T_H17$ -Vorläufer. Die darauf folgende Expression von IL-21 und IL-21-Rezeptoren ermöglicht eine autokrine Verstärkungsschleife, die zur Induktion des Transkriptionsfaktors  $ROR\gamma_t$  führt. Unter dessen Einfluss wird schließlich der IL-23-Rezeptor exprimiert und IL-23, sezerniert vor allem von DCs, kann anschließend die  $T_H17$ -Linie zur vollen Differenzierung bringen sowie die Differenzierung stabilisieren. Wie zwischen  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen besteht eine reziproke Beziehung zwischen diesen beiden  $T_H$ -Subtypen auf der einen und den  $T_H17$ -Zellen auf der anderen Seite:  $IFN\gamma$ , IL-4 und IL-12 hemmen jeweils die Differenzierung hin zum  $T_H17$ -Phänotypen (McGeachy und Cua 2008, Manel et al. 2008, Korn et al. 2009).

Das zur Differenzierung der  $T_H17$ -Zellen erforderliche Zytokin IL-23 ist ein Heterodimer und besteht aus den Untereinheiten p40 und p19. IL-12 ist ebenfalls ein Heterodimer und enthält neben der p35-Untereinheit ebenfalls die p40-Untereinheit. IL-23 und IL-12 greifen demnach auf eine identische Untereinheit zurück, bringen aber völlig unterschiedliche und antagonistische  $T_H$ -Subtypen zur Differenzierung. Experimentelle Zugänge zur Bestimmung des Zytokins IL-23 müssen daher auf die spezifische p19-Untereinheit abzielen (Maloy und Kullberg 2008).

### 1.1.2.2 Regulatorische T-Zellen

Innerhalb der Lymphozyten existieren mehrere Subgruppen, die Immunreaktionen aktiv unterdrücken können. Von diesen sind die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ -Zellen) am besten bekannt.  $T_{reg}$ -Zellen verhindern unangemessene angeborene oder adaptive Immunantworten. Sie sind formal eine Subpopulation der  $CD4^+$  T-Zellen und durch die

---

Expression von CD25 und des Transkriptionsfaktors Foxp3 charakterisiert (Sakaguchi et al. 1995, Hori et al. 2003, Feuerer et al. 2009, Josefowicz und Rudensky 2009).

T<sub>reg</sub>-Zellen spielen bei der Gewährleistung von Selbsttoleranz eine nichtredundante Rolle. Sie verhindern eine durch autoimmune Prozesse oder überschießende Immunantworten gegen Pathogene ausgelöste Gewebeschädigung und tragen im Darm wesentlich zur immunologischen Homöostase bei (Barnes und Powrie 2009, Izcue et al. 2009). Ihr Fehlen oder ihre Fehlfunktion führt zu inadäquaten Immunantworten gegen Selbst- und Fremdstrukturen, resultierend in Autoimmunerkrankungen, Allergie und Immunpathologie (Abb. 1). T<sub>reg</sub>-Zellen unterdrücken die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion – vor allem die Zytokinsynthese – vieler Zellen des Immunsystems, wie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und APZ (Shevach 2009, Sakaguchi et al. 2010). Zusätzlich zu T<sub>reg</sub>-Zellen existieren weitere Foxp3-negative regulatorische T-Zellen, dazu gehören T<sub>r1</sub>- und T<sub>H3</sub>-Zellen. Auf T<sub>reg</sub>-Zellen ist neben CD4 und CD25 auch CD38 in hohem Ausmaß exprimiert. Außerdem existiert eine CD8-positive Zellpopulation, die CD38 exprimiert und suppressive Aktivitäten zeigt (Patton et al. 2011, Bahri et al. 2012).

### 1.1.2.3 Immunpathologie

Mit dem gesamten Repertoire an Zellen und humoralen Effektoren stehen dem Immunsystem äußerst wirksame Mechanismen gegen unterschiedlichste Infektionserreger zur Verfügung, die allerdings auch körpereigene Zellen, Gewebe und Organe schädigen können (Kap. 1.1). Kollateralschäden durch Immunreaktionen können für den Gesamtorganismus gefährlicher sein als eine Infektion an sich; überschießende oder fehlgeleitete Immunreaktionen stellen daher eine ebenso ernste Bedrohung für den Organismus dar wie Pathogene selbst. Folglich sind immunregulatorische Mechanismen von ebenso lebensnotwendiger Bedeutung wie Abwehrmechanismen selbst (Sakaguchi et al. 2008, Littman und Rudensky 2010).

Die Idee, dass das Immunsystem Reaktionen gegen Selbststrukturen zu vermeiden versucht, geht auf Paul Ehrlich zurück (Ehrlich und Morgenroth 1901, Josefowicz und Rudensky 2009). Eine regulatorische Strategie besteht darin, autoreaktive T-Zellen möglichst schon während der Entwicklung im Thymus auszusortieren (Zentrale Toleranz). Es stehen aber auch verschiedene Mechanismen zur Verfügung, mit denen periphere Immunantworten, insbesondere auch T-Zellantworten, unterdrückt werden können (Periphere Toleranz). Hierzu zählen z.B. die begrenzte Bereitstellung von kostimulatorischen Molekülen, aber auch inhibierende Rezeptoren und die aktive Suppression durch regulatorische Zellen (Kap. 1.1.2.1). Auch die Hyporesponsivität

des Darmimmunsystems dient der Vermeidung von Immunpathologien. In der Darmmukosa existieren Mechanismen, die eine Immunantwort gegen Fremddantigene der Nahrungsmittel oder gegen harmlose Kommensalen, mit denen das Immunsystem permanent konfrontiert ist, unterdrücken. Dies wird durch diverse Regulationsmechanismen realisiert. In diesem Zusammenhang wird auch eine regulatorische Rolle für extrazelluläre Nukleotide wie NAD<sup>+</sup> und ATP diskutiert (Junger 2011, Adriouch et al. 2012).

### 1.1.3 Mukosale Immunität

#### 1.1.3.1 Spezielle Anforderungen an das intestinale Immunsystem

Der Darm enthält eine Vielzahl an Bakterien, die etwa 1000 verschiedenen Spezies zugeordnet werden können und im Kolon eine Dichte von  $10^{12}$  Mikroorganismen pro Milliliter erreichen. Ihre Gesamtheit wird als das intestinale Mikrobiom bezeichnet. Mit diesen apathogenen Mikroorganismen wird der Darm bereits kurz nach Geburt besiedelt (Savage 1977, Honda und Takeda 2009). Die Interaktion zwischen Mikrobiom und Wirtsorganismus kann für beide Organismen profitabel sein (Symbiose), sie kann ohne beiderseitige Vorteile sein (Kommensalen) oder zu Lasten des Wirtsorganismus gehen (Pathogene und Parasiten). Allgemein profitieren die Bakterien von der stabilen, energie- und nährstoffreichen Umgebung. Die Symbionten beteiligen sich mit Enzymen, die dem menschlichen Organismus fehlen, am Verdau der Nahrung. Außerdem liefern sie mit ihren Stoffwechselprodukten für den Wirtsorganismus essentielle Moleküle wie z.B. kurzkettige Fettsäuren oder Vitamine (Bäckhed et al. 2005, Macpherson und Harris 2004).

Die lebenswichtige Aufgabe des Darmes ist an ein funktionierendes Darmepithel gebunden. Diese Resorptionsfläche bildet eine sehr große Grenzfläche des Körpers mit der Außenwelt und hat unmittelbaren Kontakt zu dem Mikrobiom und zahlreichen Nahrungsantigenen. Eine Immunantwort gegen diese große Anzahl von Antigenen hätte schwerste Entzündungen und einen Zusammenbruch der Resorptionsfähigkeit des Epithels zur Folge. Die Herausforderung für das intestinale Immunsystem besteht darin, pathogene Mikroorganismen und deren Toxine abzuwehren, gleichzeitig aber symbiotische Mikroorganismen und Nahrungsantigene zu tolerieren. Zu schwache Immunantworten führen zur Einwanderung von Bakterien und zur Infektion des Darmgewebes, überschießende Immunreaktionen führen zur Immunpathologie mit kollateraler Gewebeerstörung, was in der Pathophysiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen eine Rolle spielt (Abb. 1, Hooper und Gordon 2001, MacDonald und Monteleone 2005, Friedman und Blumberg 2012).

### 1.1.3.2 Mukosale Toleranz und Hyporesponsivität

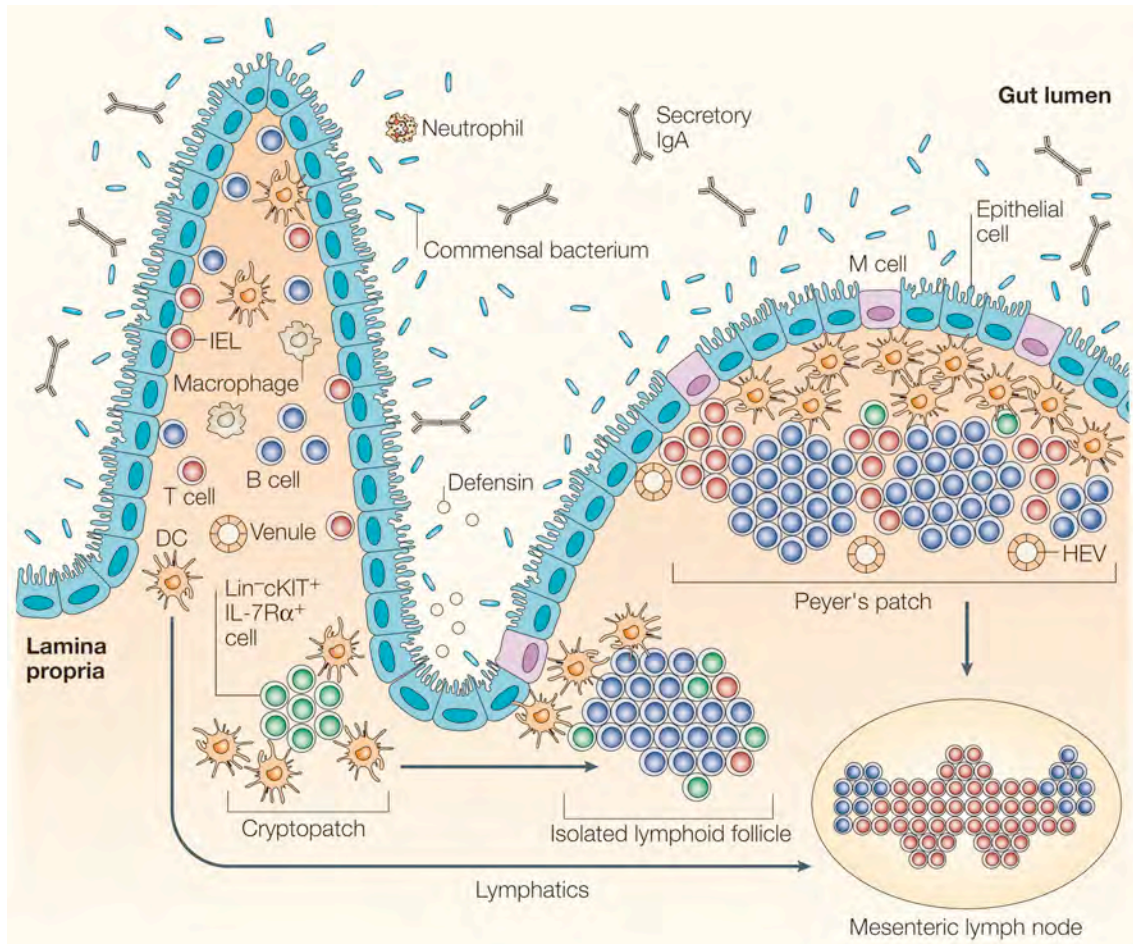
Eine Voraussetzung der mukosalen Toleranz ist zum Ersten die strikte Trennung von Bakterien und Pattern Recognition Rezeptoren der Lamina propria. Dazu dienen die muköse Schleimschicht mit Muzinproteinen, IgA und Defensinen auf dem Epithel, sowie die dichten Schlussleisten des Epithels selbst (Johansen et al. 1999, Duerkop et al. 2009). Weiterhin sind die PRR so angeordnet, dass sie von Kommensalen isoliert sind, solange sich diese physiologisch im Lumen befinden. TLR5 wird von den Epithelzellen basolateral exprimiert, NOD1 befindet sich intrazellulär und die PRR phagozytierender Zellen befinden sich in der Lamina propria, die zusätzlich zur Schleimschicht und den epithelialen Schlussleisten noch durch eine Basalmembran abgeschirmt ist. Zum Zweiten besitzt das Darmimmunsystem besondere regulatorische Mechanismen, so dass eine Reaktion gegenüber Antigenen nur abgeschwächt erfolgt. Zahlreiche Mechanismen wurden beschrieben, die die Signaltransduktion von TLR-Rezeptoren auf Zellen im Darm drosseln. Ein Beispiel ist der NF $\kappa$ B-Antagonist A20, der in Darmzellen verstärkt exprimiert wird (Lee et al. 2000, Masumoto et al. 2006). Polymorphismen von A20, wie auch von NOD2, IL-23R oder IL-10, sowie Funktionsstörungen der intestinalen Barriere sind neben der intestinalen Flora wichtige Einflussfaktoren bei der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (Xavier und Podolsky 2007, Abraham und Cho 2009, Kaser et al. 2010). Auch CD38 könnte in diesem Zusammenhang eine regulatorische Funktion ausüben.

### 1.1.3.3 Anatomie und Histologie des intestinalen Immunsystems

Das intestinale Epithel im Dünndarm der Maus enthält eine große Anzahl von Lymphozyten, die zu 80% CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind. Diese lassen sich hauptsächlich drei Subgruppen zuordnen: Konventionelle zytotoxische T-Zellen mit dem CD8 $\alpha\beta$ -Korezeptor und unkonventionelle mit dem CD8 $\alpha\alpha$ -Korezeptor. Letztere tragen etwa zur Hälfte entweder den  $\alpha\beta$ - und den  $\gamma\delta$ TZR. Daneben kommen  $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Korezeptor vor (Cheroutre 2004). Rund 20% der intraepithelialen Lymphozyten sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

In der Lamina propria dagegen sind über zwei Drittel aller Lymphozyten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Weiterhin finden sich hier Makrophagen, DCs, Plasmazellen und Mastzellen. In die Mukosa sind organisierte lymphatische Strukturen eingebettet, die zusammengefasst als Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) bezeichnet werden. Solche MALT-Strukturen sind z.B. isolierte Follikel (Solitärfollikel) oder Peyersche Plaques (PP, Abb. 2). Peyersche Plaques sind Aggregate vieler Solitärfollikel, die sich unter einem Domareal befinden. Hier gelangen Antigene mittels M-Zell-vermittelter Transzytose in das Gewebe der Lamina propria (Jang et al. 2004). Sowohl Peyersche

Plaques als auch Solitärfokkel besitzen B-Zell-Keimzentren, aber nur Peyersche Plaques beinhalten T-Zell-Regionen und hochendotheliale Venolen. Für die Funktion der Solitärfokkel wird eine T-Zell-unabhängige B-Zellaktivierung diskutiert.

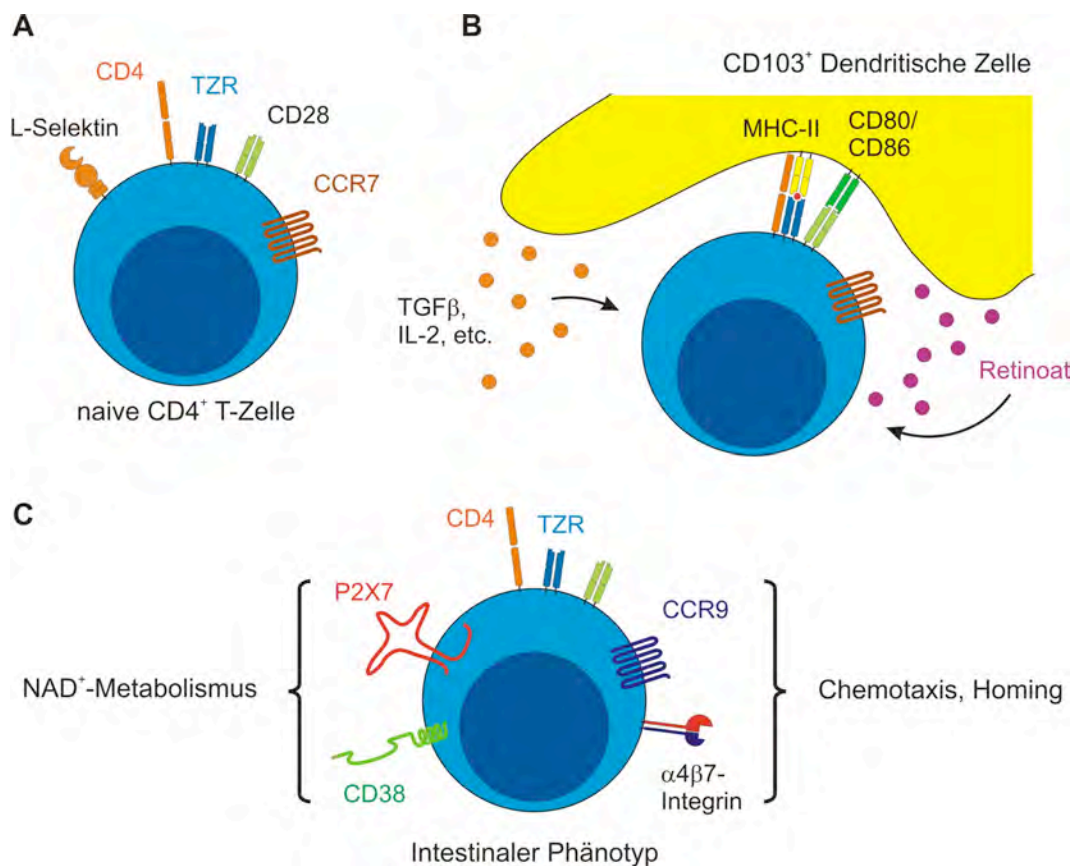


**Abb. 2: Aufbau des intestinalen Immunsystems**

Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) sind zu 80%  $CD8^+$  T-Zellen, Lymphozyten der Lamina propria sind zu zwei Dritteln  $CD4^+$  T-Zellen. In den mesenterialen Lymphknoten findet die Prä-gung der Lymphozyten v.a. durch  $CD103^+$  DCs statt. Abbildung modifiziert aus Eberl (2005).

Aus Zotten, Solitärfokkeln und PPs führen afferente Lymphgefäße in die mesenterialen Lymphknoten, in denen APZ, vor allem  $CD103^+$  DCs den T-Zellen ihre Antigene präsentieren. Während der T-Zellaktivierung in den mesenterialen Lymphknoten wird sichergestellt, dass die hier aktivierten Lymphozyten nach Verlassen dieser Lymphknoten in die Mukosa des Darms einwandern, in der das Antigen detektiert wurde (Iwasaki 2007). Die intestinale Mukosa beherbergt weiterhin eine große Anzahl regulatorischer und IL-10-synthetisierender Lymphozyten (Uhlig et al. 2006, Kamanaka et al. 2006, Maynard und Weaver 2009).

Die gewebespezifische Prägung von Lymphozyten erfolgt in mesenterialen Lymphknoten unter Einfluss von Retinoat. Dieses Vitamin-A-Derivat entsteht durch Oxidation des Aldehyds Retinal durch die Retinal-Dehydrogenase (Duyster 2000). Intestinale DCs weisen ein hohes Expressionslevel dieses Enzymes auf. Die DCs synthetisieren daher in großem Umfang Retinoat und stellen dieses, neben den klassischen Liganden und Zytokinen zur T-Zell-Aktivierung, bei der Prägung naiver T-Zellen bereit (Abb. 3).



**Abb. 3: CD38 als Teil des intestinalen Expressionsmusters**

Schematische Darstellung der Prägung einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle. **A:** Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren u.a. CCR7 und L-Selektin, womit sie in Lymphknoten gelangen. **B:** CD103<sup>+</sup> DCs in den mesenterialen Lymphknoten bilden Retinoat. Dieses induziert bei der Aktivierung der T-Zelle die Expression von Rezeptoren, die für die Funktion im Darm wichtig sind. **C:** Dazu gehören neben dem Chemokinrezeptor CCR9 und dem Integrin α4β7 auch NAD<sup>+</sup>-metabolisierende Enzyme wie CD38, ART2 und P2X7. Symbole wurden z.T. übernommen von Murphy et al. (2008).

Retinoat induziert in den naiven T-Zellen die Expression des α4β7-Integrins und des Chemokinrezeptors CCR9. Der Ligand des α4β7-Integrins ist das Adressin MAdCAM1, welches sich auf den Kapillaren der intestinalen Mukosa befindet (Lefrançois und

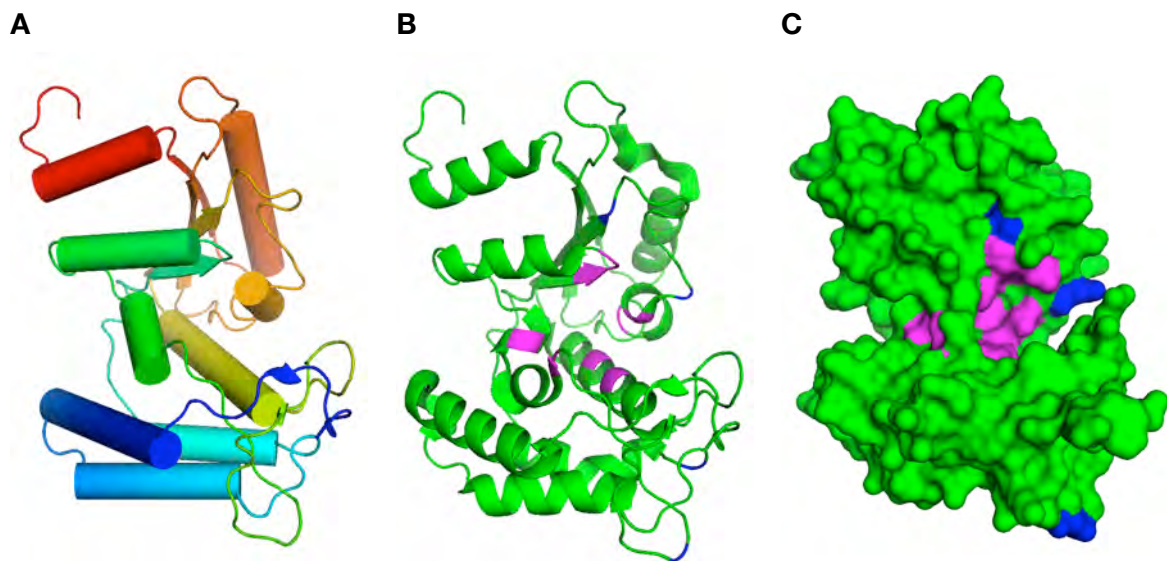
Puddington 2006). CCL25 ist ein darmspezifisches, homöostatisches Chemokin, welches über CCR9 reife Lymphozyten in die intestinale Mukosa rekrutiert.  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 sind Teil eines darmspezifischen Expressionsprofils; sie ermöglichen eine an das Zielgewebe angepasste Funktion (Iwata et al. 2004). Zu diesem Expressionsprofil gehören auch die nukleotidmetabolisierenden Enzyme (Abb. 3 C).

## 1.2 Struktur und Funktion der Glykohydrolase CD38

### 1.2.1 Struktur von CD38

CD38 ist der Hauptvertreter einer Enzymfamilie, die  $\text{NAD}^+$  spaltet. Diese Enzyme sind entwicklungsgeschichtlich von Weichtieren wie der Meeresschnecke *Aplysia californica* bis zum Wirbeltierorganismus hochkonserviert (States et al. 1992). Sie unterscheiden sich von anderen  $\text{NAD}^+$ -spaltenden Enzymen durch die Fähigkeit, den Metaboliten cyclo-ADP-Ribose (cADPR) herzustellen. cADPR und weitere  $\text{NAD}^+$ -Metabolite fungieren als  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende Second Messenger (Howard et al. 1993, De Flora et al. 2004, Lund 2006). Neben den  $\text{NAD}^+$ -Metaboliten besitzt auch das Substrat  $\text{NAD}^+$  selbst Signalfunktionen, so dass der CD38-vermittelte Abbau von  $\text{NAD}^+$  mehrere Signalwege beeinflusst (Deaglio und Robson 2011). Neben der Rolle als  $\text{NAD}^+$ -Glykohydrolase hat CD38 auch nichtenzymatische Funktionen als membranständiger Rezeptor (Deaglio et al. 2001).

CD38 ist ein Typ II Transmembranprotein von 45 kDa Größe. Es besitzt eine kurze N-terminale intrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine lange extrazelluläre Domäne, die an vier Stellen N-glycosyliert ist und in der sich das aktive Zentrum befindet (Abb. 4, Lund et al. 1998, Liu et al. 2005). CD38 existiert auch in anderer Membranorientierung, als Typ III Transmembranprotein mit zytoplasmatischer Enzymaktivität (Zhao et al. 2012).



**Abb. 4: Proteinstruktur der Glykohydrolase CD38**

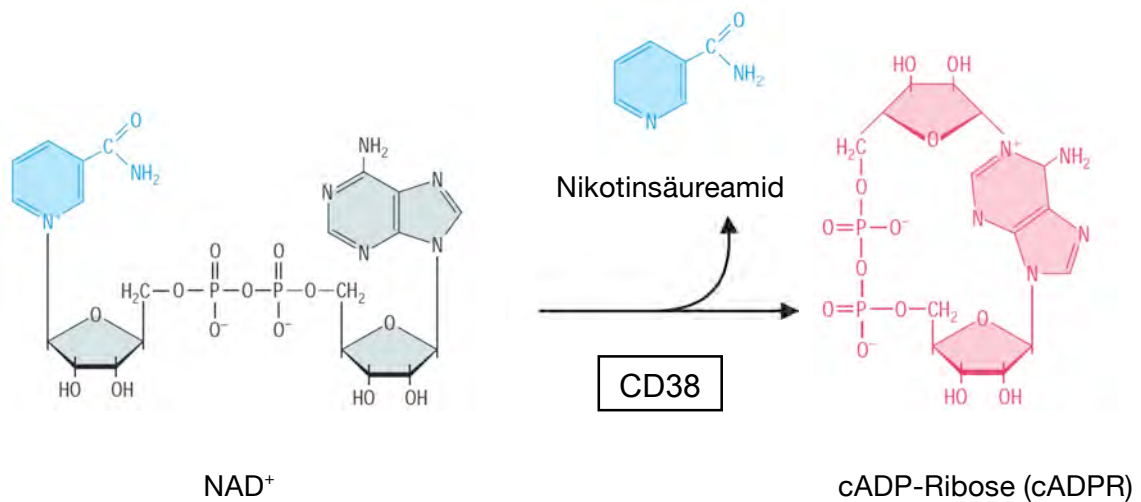
Dargestellt ist die extrazelluläre Domäne des humanen CD38-Moleküls. **A:** Vereinfachte Cartoon-Darstellung, Veranschaulichung der Struktur durch den Farbverlauf vom N- (blau) zum C-Terminus (rot). **B** und **C:** Darstellung der  $\text{NAD}^+$ -Bindungsstellen (magenta) und Glycosylierungsstellen (blau) als Cartoon- und Oberflächendarstellung. Die Abbildungen wurden mit PyMOL auf Basis der Strukturdaten von Liu et al. (2005) erstellt.

CD38 ist auf B-Zellen hoch exprimiert. Die meisten T-Zellpopulationen hingegen zeigen eine deutlich schwächere Expression von CD38. Auf Lymphozyten ist CD38 meistens in Lipid Rafts integriert. Neben Lymphozyten können auch myeloide Zellen CD38 exprimieren, darunter insbesondere Makrophagen und Granulozyten (Tab. 1, Cockayne et al. 1998, Malavasi et al. 2008).

### 1.2.2 Reaktion von CD38 als ADP-Ribosylcyclase

CD38 kann  $\text{NAD}^+$  zu verschiedenen Produkten umsetzen. Den Reaktionen ist gemeinsam, dass zunächst der Nikotinsäurerest vom  $\text{NAD}^+$  abgespalten wird. Das Produkt ADP-Ribose (ADPR, Abb. 6) bildet den größten Anteil der durch CD38 synthetisierten  $\text{NAD}^+$ -Metabolite. Weiterhin kann das freie C5-Atom der Ribose mit dem N1-Atom des Puringerüsts N-glykosidisch zum Produkt cADPR verbunden werden (Abb. 5). Da CD38 auch eine cADPR-Hydrolaseaktivität besitzt, kann es cADPR zu ADPR spalten. Der größte Anteil der ADPR entsteht allerdings direkt, ohne den Umweg über cADPR (Bertheliet et al. 1998, Lee et al. 1999).

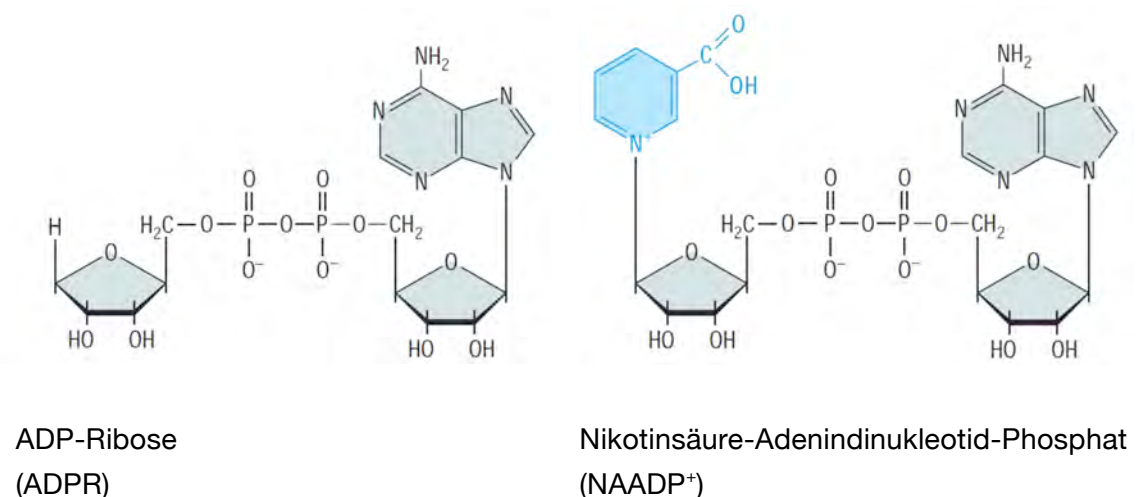




**Abb. 5: Abbau von NAD<sup>+</sup> durch CD38 zu cADP-Ribose**

Dargestellt ist die CD38-katalysierte Spaltung von NAD<sup>+</sup> zu cADP-Ribose und einer Nikotinsäureamidgruppe. Abbildung modifiziert aus Löffler (2003).

Unter sauren Reaktionsbedingungen kann vom NAD<sup>+</sup>-Molekül die Amidgruppe von der Nikotinsäureamidgruppe abgespalten werden, dabei entsteht Nikotinsäure-Adenindinukleotid-Phosphat (NAADP<sup>+</sup>, Abb. 6). Sämtliche Produkte sind potente Ca<sup>2+</sup>-mobilisierende Second Messenger (Lund 2006). cADPR ist ein Ligand des Ryanodinrezeptors und löst einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aus (Guse 1999, Lee 2001).



**Abb. 6: NAD<sup>+</sup>-Spaltprodukte ADPR und NAADP<sup>+</sup>**

ADP-Ribose ist anteilmäßig das Hauptprodukt der NAD<sup>+</sup>-Spaltung. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen kann auch NAADP<sup>+</sup> entstehen. Abbildung modifiziert aus Löffler (2003).

---

ADPR vermittelt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch Aktivierung des membranständigen TRPM2-Kanals. Hohe intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verstärken diese Funktion der ADPR, so dass cADPR als  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisator eine Kofunktion für die Aktivierung des TRPM2-Kanals durch ADPR besitzt. Diese Aktivierung des TRPM2-Kanals ist unabhängig von klassischen,  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Second Messengern wie Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ , Lee et al. 1999, Clapham 2007).

Da die Rezeptoren der extrazellulär gebildeten  $\text{NAD}^+$ -Metabolite intrazellulär liegen, müssen diese die Zellmembran durchqueren. Dieser Vorgang konnte mittels bromierter  $\text{NAD}^+$ -Derivate nachgewiesen werden, die von CD38 in bromierte cADPR umgesetzt wurden und intrazellulär die cADPR-Bindungsstellen kompetitiv hemmten. Der genaue Mechanismus der Aufnahme von Nucleotiden ist allerdings unklar. Diskutiert wird der Transport durch phosphorylierte Connexin 43-Hemikanäle und durch CD38-Dimere, was zumindest für Fibroblasten experimentell nachgewiesen werden konnte (De Flora et al. 1997, De Flora et al. 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CD38 auch als Typ III Transmembranprotein mit zytoplasmatischer Enzymaktivität existiert, und dass CD38 möglicherweise die Konformation wechseln kann. Ob und inwieweit dies zur Generierung intrazellulärer  $\text{NAD}^+$ -Metabolite und zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaling beiträgt ist allerdings unklar (Bruzzone et al. 2001, Zhao et al. 2012).

Neben CD38 existiert mit CD157 eine weitere  $\text{NAD}^+$ -Glykohydrolase. Sie ist ein GPI-verankertes Ektoenzym (GPI: Glycosylphosphatidylinositol, Hirata et al. 1994, Deaglio und Malavasi 2006). Die Expression erfolgt vor allem während der B-Zell-Ontogenese im Knochenmark, daher stammt auch der Name „bone marrow stromal cell surface molecule“ oder BST-1 (Ishihara und Hirano 2000).

### 1.2.3 Funktionen von CD38

#### 1.2.3.1 CD38 als B-Zell-Oberflächenmolekül und Korezeptor

CD38 ist mit dem B-Zell-Rezeptorkomplex assoziiert. Im klinischen Kontext dient CD38 der Klassifikation Chronisch Lymphatischer Leukämien. Hohe CD38-Expressionen gehen mit schnellerer Progression einher, was u.a. auf eine funktionelle Interaktion mit der Kinase ZAP-70 zurückzuführen ist. Über den CD38-ZAP-70-Weg werden proliferative und antiapoptotische Effekte vermittelt (Deaglio et al. 2006, Malavasi et al. 2011). Eine Kreuzvernetzung von mehreren CD38-Molekülen oder von CD38 mit dem B-Zell-Rezeptor führt zur Proliferation naiver B-Zellen. Diese Funktion als B-Zell-Korezeptor ist unabhängig von der enzymatischen CD38-Funktion (Lund et al. 1996, Schuber und Lund 2004). CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigen abgeschwächte humorale Immunant-

---

worten. Dies wird aber insbesondere auf die in CD38<sup>-/-</sup> Tieren beeinträchtigte Migration von DCs in sekundäre lymphatische Organe zurückgeführt (Höpken und Lipp 2004). Durch eine verminderte T-Zellaktivierung ist auch die T-Zellhilfe für B-Zellen eingeschränkt (Lund et al. 1995, Cockayne et al. 1998). CD38 besitzt auch nicht-enzymatische Funktionen. U.a. interagiert CD38 mit dem endothelialen Rezeptor CD31; dieser besitzt eine wichtige Funktion bei der Transmigration von Leukozyten (Horenstein et al. 1998, Mamdouh et al. 2003). Darüber hinaus gibt es Hinweise für bestimmte CD38-Funktionen im Rahmen endokriner Regelkreise (Jin et al. 2007).

### 1.2.3.2 CD38 und der Metabolit cADPR

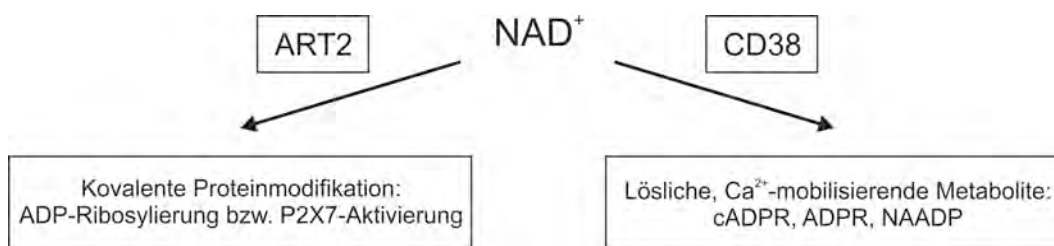
Der CD38-Metabolit cADPR ist von großer Bedeutung für die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren und die Migration von Leukozyten. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit Second-Messenger-Systemen assoziiert sind. Einer dieser Signaltransduktionswege führt über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Freisetzung von IP<sub>3</sub>, welches ionotrope IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums öffnet und damit einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in das Zytoplasma auslöst (Berridge 1993). Dieses Ca<sup>2+</sup>-Signal kann durch NAD<sup>+</sup>-Metabolite unterstützt und verstärkt werden.

Für die Signaltransduktion bestimmter Chemokinrezeptoren sind NAD<sup>+</sup>-Metabolite unentbehrlich. Dies trifft u.a. für die Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR7 und CXCR4 zu (Murdoch und Finn 2000). Weiterhin sind die Pattern Recognition Rezeptoren FPR1 und FPR2 (Formyl Peptid Rezeptor 1 und 2) von diesen Metaboliten abhängig. Eine verminderte Signaltransduktion der Rezeptoren für CCL19, CCL21 und CXCL12 führt zu einer reduzierten Einwanderung von DCs in Lymphknoten. Die Folge ist eine verminderte Aktivierung von naiven T-Zellen und eine abgeschwächte humorale und zelluläre Immunantwort (Partida-Sánchez et al. 2004, Partida-Sánchez et al. 2007). In erster Linie auf diese CD38-Funktion für Chemotaxis sind die Beobachtungen zurückzuführen, dass CD38<sup>-/-</sup> Mäuse nur eingeschränkt in der Lage sind, Immunantworten gegen eine Vielzahl von Pathogenen wie Streptokokken, Mykobakterien oder pathogene Amöben einzuleiten (Partida-Sánchez et al. 2001, Viegas et al. 2007, Estrada-Figueroa et al. 2011).

CD38 und seine Metabolite spielen auch in nicht-hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle als Ca<sup>2+</sup>-Mobilisatoren. Weitere CD38-abhängige physiologische Funktionen sind z.B. die Auslösung des Ca<sup>2+</sup>-Signals in glatten Muskelzellen der Atemwege, möglicherweise auch in pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Deshpande et al. 2004, Johnson et al. 2006).

### 1.2.3.3 CD38 und ADP-Ribosyltransferasen (ARTs)

In der Funktion als NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase konkurriert CD38 mit anderen NAD<sup>+</sup>-metabolisierenden Enzymen um das Substrat (Abb. 7). Zu diesen Enzymen gehört eine Familie von mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs). Diese kommen in membran-gebundener und löslicher Form vor. Lösliche ARTs ähneln in ihrer Proteinstruktur und in den von ihnen katalysierten Reaktionen bestimmten prokaryotischen Toxinen. So ist z.B. das von *Corynebacterium diphtheriae* synthetisierte Diphtherietoxin eine prokaryotische ART. Eukaryotische ARTs sind häufig GPI-verankerte Ektoenzyme (Althaus und Richter 1987, Madshus und Stenmark 1992, Koch-Nolte et al. 1996). Das Genom der Maus beinhaltet sechs Mitglieder dieser Enzymfamilie, ART1 bis ART5. Von ART2 existieren die Formen ART2.1 und ART2.2 (Glowacki et al. 2002). Im Gegensatz zu CD38 entstehen in ART-katalysierten Reaktionen keine löslichen Metabolite, vom Nikotinsäureamidrest abgesehen. ARTs katalysieren die kovalente Bindung der ADP-Ribose v.a. an Argininreste verschiedener Membranproteine (Koch-Nolte et al. 2006).

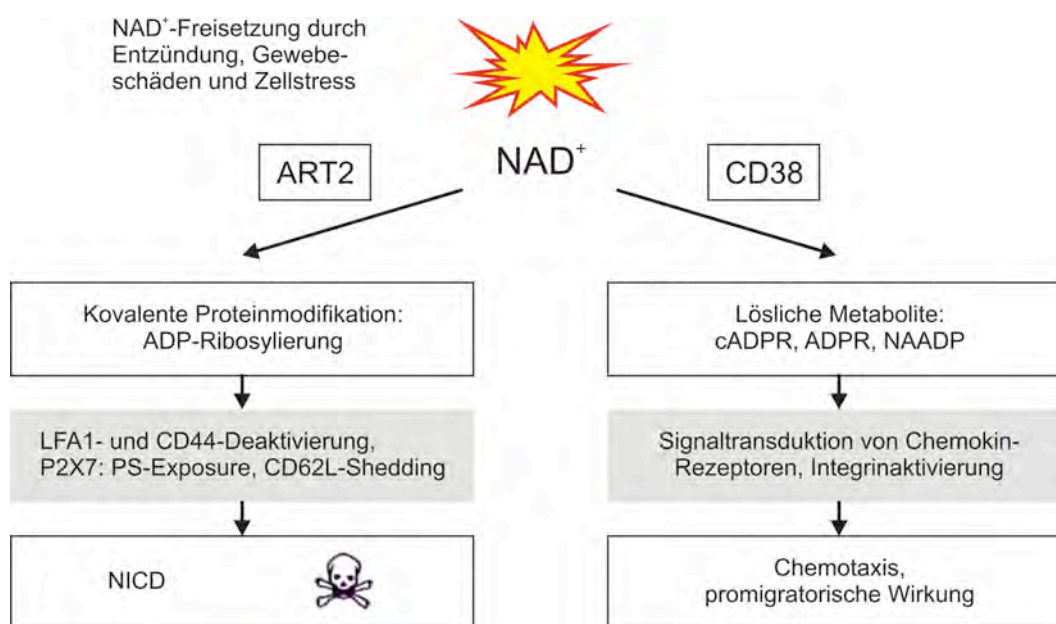


**Abb 7: Interaktion von CD38 und ART2 im extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsel**

CD38 und ART2 konkurrieren um das Substrat NAD<sup>+</sup>.

ART2.1 wird vorwiegend auf aktivierten Makrophagen und DCs exprimiert, während ART2.2 insbesondere auf naiven T-Zellen, auf regulatorischen T-Zellen und weiteren T-Zellpopulationen vorkommt (Tab. 1). Auf aktivierten T-Zellen wird ART2.2 durch Proteasen abgespalten (Wang et al. 1997, Koch-Nolte et al. 1999, Kahl et al. 2000, Aswad et al. 2005). ART2.2 ribosyliert zahlreiche Oberflächenproteine, die für die Aktivierung, Funktion und Migration von T-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören unter anderem CD8, CD45, die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und CD44 sowie der Kationenkanal und Purinrezeptor P2X7 (Nemoto et al. 1996, Okamoto et al. 1998). Die ADP-Ribosylierung kann Eigenschaften von Zielproteinen verändern. Konsequenzen können eine funktionelle Inaktivierung sein, wie z.B. im Fall von CD44 und LFA-1, oder eine Aktivierung wie im Fall des Purinrezeptors P2X7. Die Aktivierung dieses Rezeptors hat weitreichende Auswirkungen auf die Zellfunktion (Abb. 8, Seman et al. 2004, Salmi und Jalkanen 2005, Schwarz et al. 2009).

Der Purinrezeptor P2X7 gehört zur Familie der P2X-Rezeptoren; dies sind unselektive Kationenkanäle in der Zellmembran. Es existieren sieben Unterformen von P2X1 bis P2X7. Sie werden in den meisten Geweben von Wirbeltieren exprimiert (Tab. 1, Di Virgilio et al. 1998, North 2002). Wird der Ionenkanal P2X7 auf T-Zellen ADP-ribosyliert, führt dies zunächst zur Öffnung und zu einem Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Einstrom sowie einem K<sup>+</sup>-Ausstrom. Weitere Folgen sind die Abspaltung von CD62L, die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran sowie die Ausbildung großer Membranporen vermutlich durch das Membranprotein Pannexin-1 (Pelegrin und Surprenant 2006, Scheuplein et al. 2009). Diese Ereignisse münden schließlich in die Apoptose der Zelle (Abb. 8, Schwarz 2009).



**Abb 8: Interaktion von CD38 und ART2 mit Auswirkungen auf Zellfunktionen**

Ein extrazellulärer NAD<sup>+</sup>-Anstieg kann durch Entzündung, Zellstress etc. ausgelöst werden. Die Folge ist eine ART2-abhängige ADP-Ribosylierung von Membranproteinen sowie die vermehrte Synthese intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-mobilisierender Agonisten. Die ADP-Ribosylierung von P2X7 führt zu Apoptose, die intrazellulären NAD<sup>+</sup>-Metabolite ermöglichen dagegen Chemotaxis und Zellmigration. PS (hier): Phosphatidylserin, LFA: Lymphocyte Function-associated Antigen. Abbildung angelehnt an Salmi und Jakanen (2005).

Durch diesen Prozess kann extrazelluläres NAD<sup>+</sup> über ART2 und P2X7 die Apoptose von T-Zellen auslösen (Nucleotide Induced Cell Death bzw. NICD, Adriouch et al. 2001, Seman et al. 2003, Kawamura et al. 2005). Bei Makrophagen hingegen kann die Aktivierung von P2X7 eine Aktivierung der Caspase 1 bewirken, was eine Spaltung

von Pro-IL-1 $\beta$  zum proinflammatorischem IL-1 $\beta$  sowie die Freisetzung von IL-1 $\beta$  zur Folge hat (Ferrari et al. 2006, Hong et al. 2009).

Auf vielen Immunzellen der Maus sind ART und P2X7 koexprimiert (Tab. 1). Diese Koexpression führt zum Erwerb eines speziellen Regulationsmechanismus. CD38 begrenzt die extrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration und limitiert somit auch die ART-vermittelte ADP-Ribosylierung. Da die ADP-Ribosylierung zur Apoptose führen kann, ist CD38 möglicherweise in der Lage, in die Regulation der Apoptose von T-Zellen und damit in T-Zell-Antworten einzugreifen (Krebs et al. 2005).

**Tab. 1: Expression von CD38, ART2 und P2X7**

Dargestellt ist die Expression in der Maus. Die Expression im Menschen ist nicht identisch, z.B. ist ART2 beim Menschen ein Pseudogen und wird nicht exprimiert.

CD38	ART2	P2X7
<ul style="list-style-type: none"> <li>- hoch exprimiert auf B-Zellen</li> <li>- gering exprimiert auf T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, DCs, Granulozyten</li> </ul> <p>(Cockayne et al. 1998, Malavasi et al. 2008)</p>	<p><i>ART2.1</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- auf Makrophagen (nur BALB/c-Mäuse)</li> </ul> <p><i>ART2.2</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- auf naiven T-Zellen</li> <li>- hoch exprimiert auf CD8 T-Zellen</li> </ul> <p>(Kanaitsuka et al. 1997, Koch-Nolte et al. 1999, Glowacki et al. 2002)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in nahezu allen Geweben von Wirbeltieren exprimiert</li> <li>- hoch exprimiert auf Lymphozyten, besonders CD8<math>\alpha\beta</math> und CD8<math>\alpha\alpha</math> T-Zellen</li> </ul> <p>(North 2002, Heiss et al. 2008)</p>

NAD<sup>+</sup> kann neben CD38 und CD157 auch durch andere Enzyme wie die Ekto-Nukleotidpyrophosphatase/phosphodiesterase CD203 abgebaut werden. Dabei entsteht AMP, welches seinerseits durch CD73 zu Adenosin gespalten wird. AMP und Adenosin besitzen ebenfalls Signalfunktionen für das Immunsystem: So kann z.B. Adenosin die Funktion von T-Effektorzellen hemmen. Somit erscheinen die parakrinen Signalfunktionen von NAD<sup>+</sup> als vielschichtige Mechanismen, die durch Kooperation zahlreicher extrazellulärer nukleotidmetabolisierender Enzyme realisiert werden (Stefan et al. 2005, Deaglio et al. 2007, Haskó et al. 2008, Deaglio und Robson 2011).

---

## 1.3 Nukleotide in der Immunregulation

### 1.3.1 ADP-Ribosylierung: Voraussetzungen und Zielzellen

Die extrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentration ist unter homöostatischen Bedingungen relativ niedrig. Da sich die Enzyme CD38 und ART2 ebenfalls extrazellulär befinden, ist die Verfügbarkeit des Substrates NAD<sup>+</sup> entscheidend für ihre biologische Bedeutung (Seman et al. 2004). Der Großteil des NAD<sup>+</sup> befindet sich unter physiologischen Bedingungen im Zytoplasma und in den Mitochondrien. Die Plasmakonzentration von NAD<sup>+</sup> beträgt in Säugetieren etwa 0,25 µM, die intrazelluläre Konzentration wird mit 60 - 100 µM angegeben (O'Reilly und Niven 2003, Adriouch et al. 2007, Koch-Nolte et al. 2011). Im Rahmen von Zellschädigung oder Entzündungsvorgängen kann NAD<sup>+</sup> freigesetzt werden. Zellschäden, z.B. in Folge von Ischämie, oxidativem Stress oder Entzündungen, können zu erhöhter Permeabilität der Zellmembran für Nukleotide führen. Dies geschieht entweder durch Connexine, deren Permeabilität durch Zellstress ansteigt, oder durch Desintegration der Zellmembran bei nekrotischen Vorgängen (Bruzzone et al. 2001, Koch-Nolte et al. 2011). Ein extrazellulärer NAD<sup>+</sup>-Konzentrationsanstieg kann dem Immunsystem Hinweise auf Zellstress oder Gewebeschädigung geben, extrazelluläres NAD<sup>+</sup> kann daher als Alarmin interpretiert werden (La Sala et al. 2003, Haag et al. 2007). Über die ART2- und P2X7-vermittelte Apoptose können extrazelluläre Nukleotide selektiv die Apoptose von T-Zellen auslösen. Dieser Vorgang wird von CD38 durch NAD<sup>+</sup>-Abbau funktionell antagonisiert.

Insbesondere Zellen, die ART2.2 und P2X7 in hohem Maße exprimieren, sind empfindlich für den NICD. Dazu gehören T<sub>reg</sub>-Zellen, NKT-Zellen und naive T-Zellen. Aktivierte T-Zellen spalten ART2.2 von der Oberfläche ab und sind resistent gegenüber extrazellulären Nukleotiden (Kahl et al. 2000).

### 1.3.2 Dynamik NAD<sup>+</sup>-regulierter Immunantworten

Im Darm sind ruhende T-Effektorzellen aufgrund des Expressionsprofils empfindlich gegenüber NAD<sup>+</sup> (Adriouch et al. 2001, Haag et al. 2002). T-Effektorzellen der Darmmukosa werden mit Immunpathologien in Verbindung gebracht (Maynard und Weaver 2009). Es besteht die Möglichkeit, dass autoreaktive T-Zellen oder solche T-Zellen, die präsentierte Nahrungsantigene oder Bestandteile der Darmflora erkennen, aktiviert werden. Durch ein lokales Zytokinmilieu könnten außerdem Lymphozyten mit suboptimaler TZR-Affinität Aktivierung erfahren. Diese Zellen tragen nicht zur Abwehrleistung bei, sind aber möglicherweise an immunpathologischen Prozessen beteiligt (Haag et al. 2007). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit naiver T-Zellen gegenüber NAD<sup>+</sup> ergäbe

---

sich durch den NICD eine Möglichkeit, Immunpathologien zu begrenzen. Durch NAD<sup>+</sup>-Abbau hätte CD38 in diesem Kontext eine proinflammatorische Rolle.

T<sub>reg</sub>-Zellen sind aufgrund ihres Expressionsprofils, welches auch ART2 und P2X7 umfasst, empfindlich gegenüber NICD (Aswad et al. 2005). Durch die Abschaltung antiinflammatorischer T<sub>reg</sub>-Zellen stellt der NICD hier einen proinflammatorischen Vorgang dar. CD38 schützt T<sub>reg</sub>-Zellen vor der Apoptose und erhält deren immunsuppressive Aktivitäten (Pandiyani et al. 2007). Diese Schutzfunktion für T<sub>reg</sub>-Zellen könnte erklären, dass manche Autoimmunerkrankungen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren schwerer als in WT-Tieren verlaufen. Bei lpr/lpr-Mäusen, die eine FAS-Mutation tragen, wurden in CD38<sup>-/-</sup> Tieren eine beschleunigte Entwicklung und schwerere Verläufe einer Lupus-ähnlichen Erkrankung beobachtet. Die antiinflammatorische CD38-Teilfunktion würde auch erklären, warum CD38<sup>-/-</sup> Tiere auf dem suszeptiblen Maushintergrund NOD schneller einen Typ-I-Diabetes entwickeln als entsprechende WT-Tiere. Der schnellere Krankheitsverlauf konnte durch einen gleichzeitigen ART2-Knockout aufgehoben werden. CD38<sup>-/-</sup> NOD Mäuse zeigten auch eine verminderte Anzahl an T<sub>reg</sub>-Zellen. Diese Reduktion wurde durch den gleichzeitigen Knockout von ART2 ebenfalls kompensiert (Chen et al. 2006a). Für eine *in vivo*-Relevanz der Interaktion zwischen NAD<sup>+</sup> und den T<sub>reg</sub>-Zellen spricht auch, dass in P2X7<sup>-/-</sup> Tieren erhöhte relative und absolute Zahlen von T<sub>reg</sub>-Zellen gefunden wurden (Aswad et al. 2005). T-Zellen in ART2<sup>-/-</sup> Tieren sind komplett resistent gegen NICD und teilweise resistent gegen eine NAD<sup>+</sup>-induzierte Hemmung der Proliferation (Ohlrogge et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CD38 diverse Funktionen für Zellen des Immunsystems hat. Beobachtungen wie die erhöhte Suszeptibilität von CD38<sup>-/-</sup> Tieren gegenüber Infektionen verschiedenster Pathogene lassen sich durch die CD38-Funktionen im Ca<sup>2+</sup>-Signalling, insbesondere im Zusammenhang mit der Chemotaxis hinreichend erklären. In CD38-abhängigen Autoimmunmodellen wird die Defizienz von CD38 z.T. durch eine ART2-Defizienz aufgehoben (Aswad et al. 2005, Chen et al. 2006b). Dies ist ein Hinweis auf eine Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Funktion und deutet auf eine Rolle von CD38 im extrazellulären Purinstoffwechsel hin. Über die Begrenzung der proapoptotischen NAD<sup>+</sup>-Funktion könnte CD38 in das Gleichgewicht zwischen Immunreaktion und Immuntoleranz eingreifen (Abb. 1).



## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Nukleotide wie  $\text{NAD}^+$  können im Verlauf von Entzündungen durch Gewebeschäden oder Zellstress freigesetzt werden. Extrazellulär besitzen sie dann Signalfunktionen für das Immunsystem. Die Glykohydrolase CD38 spielt eine Rolle für das Überleben von T-Zellen und für die Rekrutierung insbesondere myeloider Zellen. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass CD38 zusammen mit weiteren nukleotidmetabolisierenden Enzymen auf Darmlymphozyten hoch exprimiert ist. Diese Beobachtung, die auf eine mögliche darmspezifische Funktion hinweist, sollte zunächst in detaillierten Analysen bestätigt werden. Dafür wurden Leukozyten aus Darm, Milz und Lymphknoten aus WT-Tieren und CD38<sup>-/-</sup> Kontrolltieren durchflusszytometrisch analysiert.

Die Funktion von CD38 auf T-Zellen der Darmmukosa ist unklar. Darmspezifisches Expressionsmuster und die Funktion von CD38 legen nahe, dass CD38 eine Bedeutung im Verlauf intestinaler Entzündungen oder Infektionen hat, und möglicherweise an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Immunreaktion und Immuntoleranz beteiligt ist. Zur Beantwortung dieser Frage sollten WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere in einem Darmentzündungsmodell untersucht werden. Hierfür wurde das DSS-Kolitismodell (DSS: Dextransulfat-Natrium) angewendet. Dabei handelt es sich um ein etabliertes Entzündungsmodell für eine Kolitis, deren makroskopisches und histologisches Bild dem chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen entspricht. In diesen Experimenten sollten insbesondere der klinische Verlauf, makroskopische und mikroskopische Entzündungszeichen sowie die Expression von Zytokinen und Chemokinen untersucht werden. Um die Rolle von CD38 im extrazellulären Nukleotidstoffwechsel zu erfassen, galt es außerdem ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere in die Analyse einzubeziehen. Schließlich sollte die Funktion von CD38 unter homöostatischen Bedingungen untersucht werden. Dafür war die durchflusszytometrische Analyse polyklonal-stimulierter T-Zellen gesunder WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere vorgesehen.

Die Untersuchung der CD38-Funktion erfolgte insgesamt mit dem Ziel, zu einem umfassenderen Verständnis pathophysiologischer Vorgänge des intestinalen Immunsystems zu gelangen. Grundsätzlich ist CD38 dabei auch als pharmakologische Zielstruktur denkbar. Im Hinblick auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen bedeutet dies letztlich die Möglichkeit zur Entwicklung neuer und kausal wirksamer Therapien.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Laborgeräte

BD FACS Canto II	BD Beckton Dickinson, Heidelberg
StepOnePlus Real Time PCR	Applied Biosystems, Foster City
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Bioanalyzer 2010	Agilent Technologies, Santa Clara
Heraeus Laminar flow bench	Heraeus, Hanau
QIAGEN TissueLyser	Qiagen, Venlo
MIRAX Scan	Carl Zeiss, Jena
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Waltham
Branson Digital Sonifier	Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Gelkammer	Biometra, Göttingen
Shandon Citadel 1000	GMI, Ramsey

Bei den weiteren, hier nicht aufgeführten Laborgeräten (Zentrifugen, Thermoblock, Magnetrührer, etc.) handelt es sich um Standardlaborgeräte.

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
PCR-Röhrchen	Falcon (BD), Heidelberg
96-Well Platten	Applied Biosystems, Foster City
Optisch klare Folie	Applied Biosystems, Foster City
Tungsten Carbide Beads, 3 mm	Qiagen, Venlo
Stainless Steel Beads, 5 mm	Qiagen, Venlo

Die Standardlabormaterialien (z.B. Plastikpipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsröhrchen und Zellkulturschalen) stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickhausen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

### 3.1.3 Standard- und Feinchemikalien

Agarose Electrophoresis Grade	Novex Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Dextran Sulfat Sodium, 36.000 – 50.000 g/mol	MP Biomedicals, Eschwege
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Molecular Probes, Karlsruhe
Fermentas O'RangeRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas, Burlington
Fermentas Loading Dye	Fermentas, Burlington
Fetale Calv Serum (FCS)	PAA, Pasching
First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gentamycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Hexadecyltrimethylammonium Bromid (HTAB)	Merck, Darmstadt
Hexamer-Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
$\beta$ 2-Mercaptoethanol	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Normales Rattenserum (NRS)	Jackson ImmunoResearch, Baltimore
O-Dianisidin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis
Paraplast Extra	Kendall, Mansfield
Percoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Phorbol Myristat Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Phosphat Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse OUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
TAE-Puffer (50x)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin

Sonstige Standardchemikalien stammen von den Herstellern Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (St. Louis).

### 3.1.4 Mäusstämme

C57BL/6J	Mäusstamm vom Jackson Laboratory, Bar Harbor
ART2-/-	Institut für Immunologie, UKE, zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Koch-Nolte, Hamburg (Ohlrogge et al. 2002)
CD38-/-	Institut für Immunologie, UKE, zur Verfügung gestellt durch Prof. F. Lund, Rochester (Cockayne et al. 1998)
ART2-/-CD38-/-	Kreuzung von ART2-/- und CD38-/-, durchgeführt im Institut für Immunologie, UKE

Die Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums gezüchtet. Alle Tierversuche wurden in den Räumlichkeiten der zentralen Versuchstierhaltung durchgeführt. Die Tierhaltung und die Durchführung der Versuche sowie sämtlicher weiterer Tätigkeiten erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz.

### 3.1.5 Enzyme

MMLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
JumpStart Taq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich, St. Louis
Taq-Man AmpErase UNG	Applied Biosystems, Foster City
Desoxyribonuklease I	Sigma-Aldrich, St. Louis
Kollagenase D	Roche, Mannheim
Kollagenase VIII	Sigma-Aldrich, St. Louis
Protease 24	Sigma-Aldrich, St. Louis
Biotin-Alkalische Phosphatase	Vector Laboratories, Burlington

### 3.1.6 Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD4	PE-Cy7	RPA-T4	eBioscience, San Diego
CD8 $\alpha$	PE-Cy7	53-6,7	eBioscience, San Diego

CD8 $\alpha$	Cy5	169	Institut für Immunologie, UKE
CD8 $\beta$	PE	53-5,8	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45	PerCP	30-F11	BD Pharmingen, Heidelberg
CD11b	PE	M1/70	BD Pharmingen, Heidelberg
F4/80	APC	F4/80	eBioscience, San Diego
Ly6G	PerCP-Cy5.5	1A8	BD Pharmingen, Heidelberg
CD38	FITC	90	BD Pharmingen, Heidelberg
Gr-1	Pacific blue	RB6	Institut für Immunologie, UKE
IFN $\gamma$	FITC	XMG1.2	eBioscience, San Diego
IL-17A	PE	TC11-18H10.1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD16/CD32	(purified)	2.4G4	Institut für Immunologie, UKE
Ly6G	(purified)	NIMP-R14	Hycult, Uden
F4/80	(purified)	BM8	BMA Biomedicals, Augst
Mac-2	(purified)	M3/38	Cedarlane, Burlington
Anti-Rat-Fc	Biotin	Esel, polyklonal	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA

### 3.1.7 Primer

Name		Sequenz
18S	forward	CAC GGC CGG TAC AGT GAA AC
18S	reverse	AGA GGA GCG AGC GAC CAA A
GAPDH	forward	CCT CGT CCC GTA GAC AAA ATG
GAPDH	reverse	TCT CCA CTT TGC CAC TGC AA
CXCL1	forward	GCA CCC AAA CCG AAG TCA TAG
CXCL1	reverse	CAA GGG AGC TTC AGG GTC AA
CXCL2	forward	CAC TGC GCC CAG ACA GAA
CXCL2	reverse	CAG GGT CAA GGC AAA CTT TTT G
CXCL10	forward	GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT
CXCL10	reverse	TGC AGC GGA CCG TCC TT

---

CCL2	forward	GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA
CCL2	reverse	CCT ACT CAT TGG GAT CAT CTT GCT
TNF $\alpha$	forward	AAA TGG CCT CCC TCT CAT CAG T
TNF $\alpha$	reverse	GCT TGT CAC TCG AAT TTT GAG AAG
IL-6	forward	TGG GAA ATC GTG GAA ATG AGA
IL-6	reverse	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
IL-10	forward	GCT GCG GAC TGC CTT CAG
IL-10	reverse	AGG AGT CGG TTA GCA GTA TGT TGT C
IL-17	forward	CAG GGA GAG CTT CAT CTG TGT CT
IL-17	reverse	CGC TGC TGC CTT CAC TGT AG
IL-23p19	forward	ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GA
IL-23p19	reverse	CGG ATC CTT TGC AAG CAG AA

---

Dargestellt sind die Sequenzen der Primer in 5'-3'-Richtung. Die Primer für IL-17A wurden bei Applied Biosystems (Foster City) bestellt. Diese wurden in einer gebrauchsfertigen Lösung zusammen mit dem FAM-markierten Oligonukleotid und dem passiven Fluoreszenzfarbstoff ROX geliefert. Die übrigen Primer stammen von Invitrogen (Karlsruhe). Sie wurden auf eine 100  $\mu$ M Lösung verdünnt und als Stock eingefroren. Für den PCR-Ansatz wurde eine Verdünnung von 1  $\mu$ M verwendet.

### 3.1.8 Medien und Lösungen

---

Bezeichnung	Menge	Komponenten
DSS-Wasser	3 g 100 ml	DSS ad H <sub>2</sub> O
RMPI komplett	500 ml 25 ml 5 ml 500 $\mu$ l 500 $\mu$ l	RMPI 1640 FCS 100x Glutamin 1000x Gentamycin (Stock 50 mM) 1000x $\beta$ 2-Mercaptoethanol (Stock 50 mM)

Kollagenaseverdau-Lösung	20 ml	RPMI komplett
	5 µg	Kollagenase D
	5 µg	Kollagenase VIII
	40 µl	DNase I
Percoll Gradient	70 %	Percoll Separating Solution
	30 %	RPMI komplett
	40 %	Percoll Separating Solution
	60 %	RPMI komplett
Erylysepuffer	8,25 g	NH <sub>4</sub> Cl
	1 g	KHCO <sub>3</sub>
	0,037 g	EDTA
	1 l	Aqua dest.
Saponinpuffer	0,1 %	Saponin
	0,3 %	BSA
		in PBS
MPO Working Buffer		
Lösung A	13,9 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	500 ml	H <sub>2</sub> O
Lösung B	17,4 g	Dikaliumhydrogenphosphat
	500 ml	H <sub>2</sub> O
Stocklösung	87,7 ml	Lösung A
	12,3 ml	Lösung B
	100 ml	Aqua dest.
Working Buffer	50 ml	Stocklösung
	50 ml	Aqua dest.
Working Buffer mit HTAB	50 ml	Stocklösung
	50 ml	Aqua dest.
	1,824 g	HTAB

---

Substratlösung	50 ml	Stocklösung
	50 ml	Aqua dest.
	1,7 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	16,7 mg	O-Dianisidin Dihydrochlorid
Eosinlösung	1 g	Eosin
	100 ml	Aqua dest.

---

### 3.1.9 Software und Programme

Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems, San Jose
Corel Draw X3	Corel Corporation, Ottawa
FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla
MIRAX Scan Software	Carl Zeiss, Jena
PyMOL	Schrödinger, Inc., München
StepOnePlus Applied Biosystems	Applied Biosystems, Foster City

Bei den sonstigen, hier nicht aufgeführten Programmen (Microsoft Excel, etc.) handelt es sich um Standardprogramme.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anwendung des DSS-Entzündungsmodells

Für die experimentelle Kolitis wurde das DSS-Modell verwendet. Dextransulfate sind Schwefelsäure-Halbester des Dextrans und als Natriumsalz gut wasserlöslich. Sie zeigen ab einer Molmasse > 20.000 g/mol eine toxische Wirkung auf das Darmepithel (Mark et al. 1986, Falbe und Regitz 1997). Die Verabreichung von hochmolekularem DSS im Trinkwasser führt zur Entwicklung einer Kolitis. Diese experimentelle Kolitis wird auch als Barrier-Disruption-Entzündungsmodell bezeichnet, da sie durch eine Störung der intestinalen Barrierefunktion und einen inflammatorischen Stimulus induziert wird (Okayasu et al. 1990). Eine Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion führt zur Konfrontation des intestinalen Immunsystems mit Symbionten und Kommensalen des Darmlumens. Dies hat initial eine Aktivierung von Makrophagen und DCs zur Folge, deren freigesetzte Zytokine Granulozyten und später auch Lymphozyten rekrutieren (Strober et al. 2002). Die Effektormechanismen und Zytokine der



Leukozyten unterhalten und verstärken entzündliche Prozesse, die die Funktion der Enterozyten massiv beeinträchtigen. Mangel und Dysfunktion dieser resorbierenden Zellen verursachen eine Malabsorption von Nahrungssubstraten und Flüssigkeit, was zur Diarrhoe und zur raschen Abmagerung der Tiere führt. Makroskopische Zeichen sind ein Gewichtsverlust der Tiere und die Morphologie der entzündeten Organe (Elson et al. 2005).

Für die Versuche wurde folgendes Protokoll angewendet: Das Trinkwasser wurde zu Versuchsbeginn durch 3% DSS-Wasser ausgetauscht. Fünf Tage später erfolgte die Umstellung von DSS-Wasser wieder auf normales Trinkwasser. Die Überwachung der Gewichte der Versuchstiere erfolgte täglich. Das Gewicht wurde in Gramm gemessen und auf eine Nachkommastelle gerundet. Ab Tag 4 ist eine Gewichtsabnahme nachweisbar. Ab dem 7. Tag tritt normalerweise eine Besserung ein, allerdings wurden in Vorversuchen auch schwerere Verläufe beobachtet, bei denen die Tiere über 25% des Gewichtes verloren.

### 3.2.2 Klinisches Assessment

#### Klinischer Score

Mittels eines klinischen Scores wurde das Ausmaß entzündlicher Vorgänge makroskopisch erfasst. Dazu wurde ein bewährtes Scoring-Schema in modifizierter Weise verwendet (Cooper et al. 1993). Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf Blutauflagerung oder -beimengung der Stuhl-Pellets sowie auf deren Konsistenz gelegt (Tab. 2). Die pathologischen Veränderungen wurden zwar nicht in einem verblindeten Verfahren erfasst, trotzdem erlaubt diese Bewertung eine orientierende Übersicht über das Entzündungsgeschehen.

**Tab. 2: Klinischer Score**

Bewertungsschlüssel für klinischen Score.

Grading	Score
Normal geformte Pellets, kein Blut	1
Weiche Pellets	2
Weiche Pellets mit Blutbeimengung	3
Keine Pellets, blutiger Stuhl	4
Keine Pellets, massive rektale Blutung	5

### Messung der Darmlänge

Ein weiterer Parameter für die Schwere der Entzündung ist die Länge des Kolons (Okayasu et al. 1990). Entzündungsvorgänge und Regeneration im Gewebe führen zu einer morphologischen Verkürzung des Darmes. In den vorliegenden Experimenten wurde daher bei der Organentnahme die Länge des Kolons gemessen. Zusätzlich wurde das Ausgangsgewicht der Tiere berücksichtigt, da bei größeren Tieren die Organe größer entwickelt sind bzw. das Kolon dementsprechend länger ausfällt. Analog zum klinischen Score erlaubte diese Messung eine orientierende Aussage über das Entzündungsgeschehen. Die Darstellung erfolgte als Mittelwert und Standardabweichung der Darmlänge sowie des Quotienten Darmlänge/Gewicht.

### 3.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 RNA-Isolierung

Eine klassische Methode zur Isolierung und Aufreinigung von RNA ist die von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebene Extraktion mittels Phenol und Chloroform. Das Trennverfahren basiert darauf, dass Nukleinsäuren und Proteine unterschiedliche Löslichkeiten in einer wässrigen Phenol/Chloroform-Emulsion besitzen. Durch Zentrifugation kommt es zur Auftrennung der Phasen und somit der Makromoleküle. Als Denaturierungsmittel fungiert das chaotrope Guanidinhydrochlorid; es löst Wasserstoffbrückenbindungen und führt zur Denaturierung aller Proteine respektive sämtlicher Ribonukleasen. Für die Aufreinigung wurde das Trizol-Reagent von Invitrogen verwendet, welches die genannten Bestandteile mit Ausnahme von Chloroform bereits enthält.

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und unmittelbar in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, welches bereits 300 µl Trizol-Reagent und eine Wolfram-Hartmetallkugel enthielt. Sofort nach Zufügen des Gewebes wurde das Röhrchen sicher verschlossen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Durchführung der RNA-Isolation erfolgte im -80°C-Schrank.

Die eigentliche RNA-Isolierung begann mit dem mechanischen Aufschluss des Gewebes. Zeitnah nach Entnahme aus dem -80°C-Schrank und damit während des Antauens wurden die Gewebeproben im TissueLyser für 4 min bei einer Frequenz von 30/s lysiert. Hierfür war die schon vorher zugegebene Hartmetallkugel erforderlich. Das homogene Gemisch wurde mit Trizol auf 1000 µl aufgefüllt und für 5 min bei 25°C

zur Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform, Schütteln der Röhrchen sowie einer erneuten Inkubation für 2,5 min bei 25°C erfolgte der erste Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 rpm. Hierbei kam es zur Phasentrennung, wobei sich die Proteine in der unteren, organischen Phase und die RNA in der oberen, wässrigen Phase anreicherten. Die DNA befand sich hauptsächlich in der Interphase.

Für die Fällung wurde der Überstand abgenommen, mit 500 µl Isopropanol versehen und für 10 min bei 25°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm fand sich am Boden die ausgefallene RNA als Pellet. Zum Waschen dieser Pellets wurde nach dem Zentrifugationsschritt der Überstand entfernt und 1000 µl Ethanol 75% hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 7 min bei 10500 rpm konzentrierte sich die RNA wiederum in einem Pellet. Der Überstand wurde entfernt, das RNA-Pellet für etwa 3 min an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser mit 5% RNase OUT aufgenommen. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

Bei diesem Verfahren wird die gesamte RNA isoliert, wozu insbesondere die rRNA, tRNA, mRNA und hnRNA gehören. Die zur Fraktion der rRNA gehörende 18S RNA ist ein Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit. Sie wird praktisch unabhängig von äußeren Umständen exprimiert. Daher diente sie als sog. Housekeeping-Gene als interner Standard bei der quantitativen Real-Time PCR.

### 3.2.3.2 Mengen- und Qualitätsbestimmung der RNA

#### Mengenbestimmung durch OD

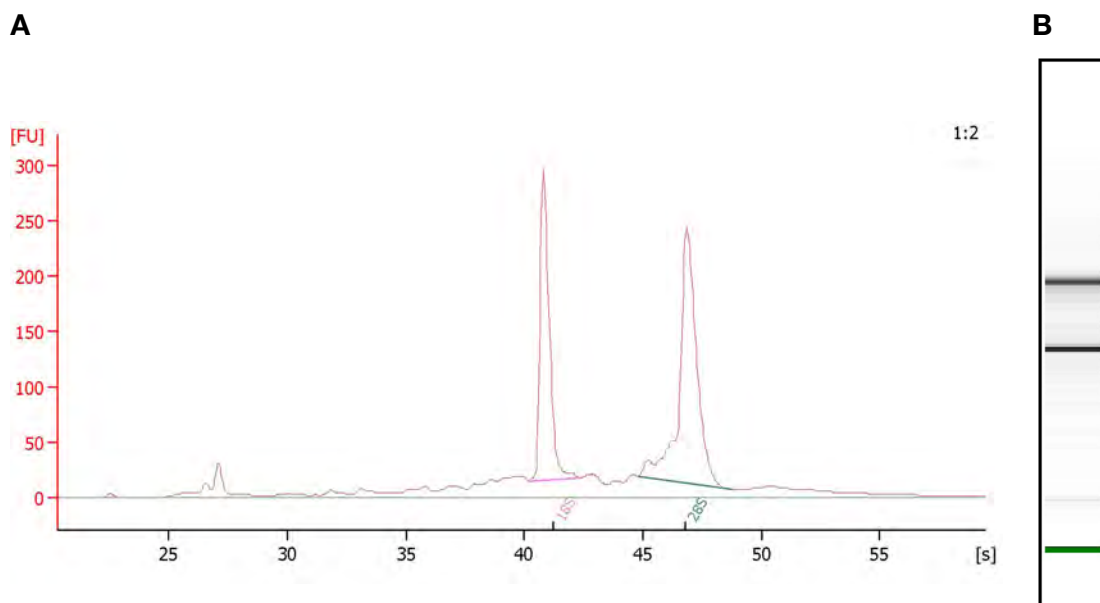
Für die Synthese der cDNA ist eine genau definierte Menge an RNA erforderlich. Durch geringe Unterschiede der eingangs verwendeten Organmasse, aber auch durch Eigenarten der Extraktions- und Fällungsvorgänge unterliegt die Menge an isolierter RNA einigen Schwankungen. Diese machen eine quantitative Bestimmung und eine entsprechende Verdünnung erforderlich.

Die Menge an RNA wurde nach dem Prinzip der Photometrie mittels Nanodrop bestimmt. Durch Messung der optischen Dichte wird über das Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration errechnet. Zu Beginn wurde eine Referenzprobe gemessen und gleich Null gesetzt. Diese Referenzprobe bestand aus dem Lösungsmedium, in welchem die RNA in den einzelnen Proben gelöst war. Hierbei handelte es sich um DEPC-Wasser mit dem Ribonukleaseinhibitor RNase out im Verhältnis 20:1. Die Reinheit kann über

den Quotienten 260/280 nm abgeschätzt werden. Ein Verhältnis von  $\sim 1,8$  wird als reine DNA, ein Verhältnis von  $\sim 2$  als reine RNA angesehen. Wenn der Quotient erheblich geringer ist, könnte dies ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol sein, da diese Verbindungen v.a. Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren.

### Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyzer

Bei der photometrischen Messung wird die untersuchte RNA nur quantitativ erfasst. Zu Beginn der Versuchsreihe war es daher erforderlich, auch die Größe und damit die Intaktheit der isolierten RNA zu bestimmen. Ein hohes Ausmaß an RNA-Degradation beeinträchtigt die Qualität der zu synthetisierenden cDNA und damit die der Real-Time PCR. Um die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde die RNA mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 untersucht (Abb. 9).



**Abb. 9: Untersuchung der isolierten RNA mittels Bioanalyzer**

**A:** Im Elektrophoreogramm ist die RNA der Größe nach von links nach rechts aufsteigend aufgetrennt. Deutlich erkennbar sind die Peaks der 18S und 28S RNA. RNA-Degradationsprodukte und Fragmente würde man wegen der geringeren Größe links von den Peaks erwarten.  
**B:** Dieselbe Auftrennung als gel-ähnliches Bild. Nur die Peaks der 18S und 28S RNA sind abzugrenzen. Der RIN-Wert dieser Beispielprobe ist 8,8: Die RNA ist als intakt anzusehen.

Im Analysegerät wird die RNA auf einem Chip elektrophoretisch aufgetrennt und das Ergebnis mittels laserinduzierter Fluoreszenz ausgelesen. Die Darstellung erfolgt sowohl als Elektrophoreogramm als auch als gel-ähnliches Bild (Abb. 9). Das quantitative Maß für die Integrität der isolierten RNA ist der RNA-Integritätsindex oder

RIN. Dieser wird über einen Algorithmus errechnet und ermöglicht eine Klassifikation der RNA anhand einer Skala von 1 bis 10, wobei 1 für eine vollständig degradierte RNA steht und 10 für eine komplett intakte RNA steht. Der Algorithmus verwendet geometrische Eigenschaften des Elektrophoreogramms wie z.B. das Integral der Peaks der 18S und 28S RNA (Abb. 9). Zu Beginn der Experimente wurden sämtliche RNA-Proben mit diesem Verfahren analysiert, um das Protokoll der RNA-Aufreinigung zu optimieren, bis regelmäßig ein RIN > 8 erreicht wurde. Bei späteren Experimenten wurde die RNA nur noch stichprobenartig mit dieser Methode überprüft.

### 3.2.3.3 Synthese der cDNA

Mit der Synthese der cDNA entsteht ein Template der RNA für die PCR. Das Umschreiben wurde mit der MMLV-Reversen Transkriptase durchgeführt. Für den Reaktionsansatz der reversen Transkription waren 200 ng RNA in 2 µl Volumen vorgesehen. Als Primer dienten Random-Hexamer-Primer.

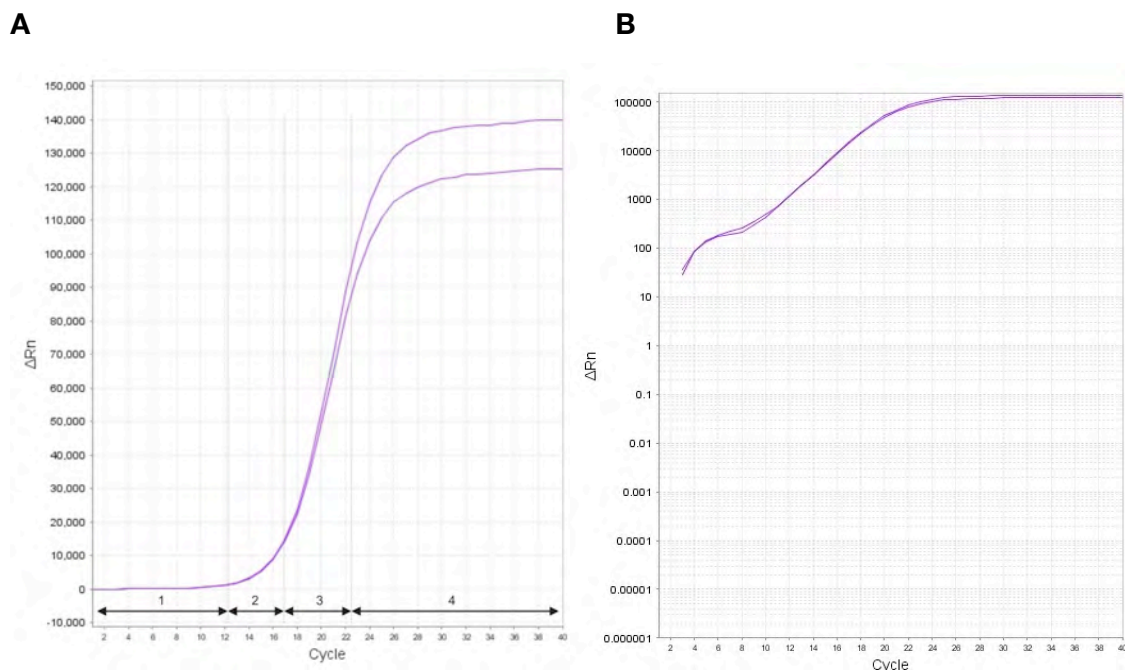
**Tab. 3: Programme für die cDNA-Synthese**

Programm 1: Inkubation		Programm 2: cDNA-Synthese	
5 min	65°C	50 min	37°C
∞	4°C	15 min	70°C
		∞	4°C

Die isolierte RNA wurde hierzu auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt. Aus dem Verhältnis zwischen der gegebenen und der angestrebten RNA-Konzentration ergab sich das Verdünnungsverhältnis. Die RNA wurde mit RNase-freiem, DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Im ersten Schritt wurden je 2 µl RNA mit 10 µl Mastermix Nr. 1 vermischt. Dieser enthielt in DEPC-Wasser gelöste dNTPs und Random-Hexamer-Primer. Die Proben wurden für 5 min bei 65°C inkubiert; dieser Schritt erfolgte im Thermocycler (Tab. 3). Anschließend wurde Mastermix Nr. 2 zugefügt, der neben First-Strand-Buffer und DTT die MMLV-Reverse Transkriptase enthielt. Anschließend erfolgte der eigentliche Syntheseschritt im Thermocycler (Tab. 3). Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.2.3.4 Real-Time quantitative PCR

Die Real-Time quantitative PCR ist die zurzeit präziseste Methode zur Bestimmung der Kopienzahl spezifischer cDNA-Moleküle; sie basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion. Der entscheidende Unterschied zur klassischen quantitativen PCR besteht darin, dass hier keine absoluten Mengen an PCR-Produkt als Endkonzentration gemessen werden. Stattdessen nutzt man die Kinetik der PCR-Reaktion aus. Dazu wird in Echtzeit – nach jedem PCR-Zyklus – die DNA Menge mittels geeigneter Fluoreszenzsysteme erfasst (Mülhardt 2009).

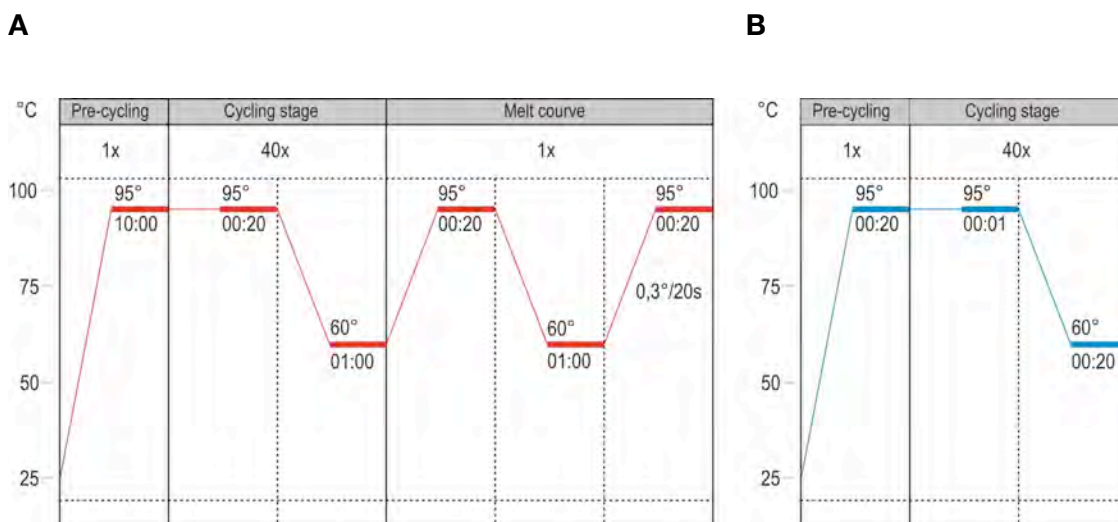


**Abb. 10: Phasen der Real-Time PCR**

Die PCR durchläuft vier verschiedene Phasen unterschiedlicher Effizienz bezüglich der Nukleinsäure-Amplifikation. **A:** Lineare Darstellung des Amplifikation Plot: **1. Baseline-Phase:** Zu Beginn findet eine nahezu exponentielle Amplifikation statt, allerdings liegen Nukleotidsubstrate, Template und Enzyme noch in suboptimalen Verhältnissen zueinander vor. Aufgrund der geringen Menge an doppelsträngiger DNA ändert sich die Fluoreszenz kaum und bleibt unter dem Detektionslimit des Thermocyclers. **2. Exponentielle Phase:** Genügend Substrate liegen jetzt vor. Pro Zyklus wird jedes einzelne Template verdoppelt. Die Menge des PCR-Produkts steigt demnach mit dem Exponenten 2. Die Exponentielle Phase dauert etwa drei bis sieben Zyklen. Die Fluoreszenz hebt sich deutlich vom Hintergrund ab. **3. Lineare Phase:** Einer steigenden Menge an DNA steht ein sich verringernder Pool an Substraten gegenüber. Pyrophosphat und Monophosphatnukleotide führen zur Produkthemmung. Es findet zwar weiterhin Amplifikation statt, allerdings kann jetzt pro Zyklus nicht mehr jeder DNA-Einzelstrang verdoppelt werden. Statt mit dem Exponenten 2 steigt die Fluoreszenz jetzt linear. **4. Plateau-Phase:** Zum Ende sind die Substrate verbraucht. Die Aktivität der Taq-Polymerase ist erschöpft. Es findet keine Amplifikation statt. Die Menge an Doppelstrang-DNA verändert sich kaum, die

SYBR-Green-Fluoreszenz bleibt nahezu konstant. **B:** Logarithmische Darstellung des Amplification Plot. Diese Darstellung ermöglicht die geometrische Bestimmung der exponentiellen Phase; sie entspricht den Zyklen, in denen die Steigung der Kurve genau 1 ist.

Zur Bestimmung der Menge an cDNA-Template wurde gemäß  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Zykluszahl verwendet, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals vom Hintergrund abhebt. Dies ist der sogenannte Threshold-Cycle-Wert oder CT-Wert (Auswertung s.u.). Bei der Real-Time quantitativen PCR wird nicht das gesamte Transkript z.B. eines Chemokins amplifiziert. Das von den Primern eingegrenzte Amplifikat hat eine Länge von 90 - 120 bp, die Primer selbst haben eine Länge von etwa 20 bp. Aufgrund der Kürze des Amplifikats entfällt der separate Elongationsschritt in der PCR (Abb. 11).



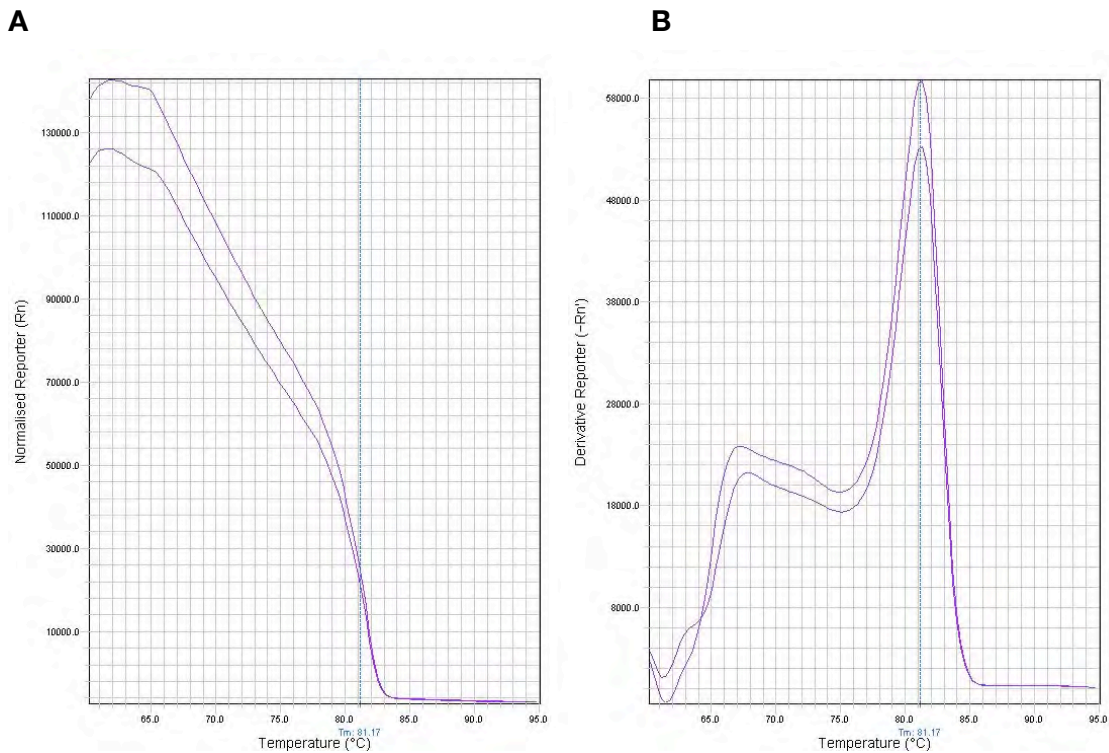
**Abb. 11: Temperaturzyklen der Real-Time PCR**

Der Pre-cycling-Schritt dient dazu, die DNA-Polymerase zu aktivieren. Diese ist bei Raumtemperatur durch einen spezifischen Antikörper blockiert, um eine vorzeitige Aktivität zu verhindern. Aufgrund der Kürze des Amplifikats entfällt der Elongationsschritt im Temperaturverlauf. **A:** Bei der Verwendung von SYBR-Green wird zum Ausschluss von Fehlamplifikationen im Anschluss an die eigentliche PCR eine Schmelzkurve ermittelt. **B:** Taq-Man-Sonden ermöglichen einen hochspezifischen Nachweis des Amplifikats, die Schmelzkurve entfällt.

### Quantifizierung mittels SYBR-Green

Die einfachste DNA-Nachweismethode beruht auf unspezifischen Farbstoffen wie z.B. Ethidiumbromid oder SYBR-Green, die sich in den Doppelstrang integrieren. Diese Farbstoffe färben Doppelstrang-DNA sehr sensitiv an, können aber korrektes Amplifikat und Fehlamplifikate nicht unterscheiden. Das Problem wird teilweise gelöst durch

die Schmelzkurve, eine nach den Amplifikationszyklen laufende Temperaturkurve. Im Längenbereich der Amplifikate haben die DNA-Fragmente einen von der Größe und vom AT-CG-Verhältnis abhängigen spezifischen Schmelzpunkt. Für die Messung der Schmelzkurve wird die Temperatur langsam erhöht, im benutzten Verfahren von 60 auf 95°C um 0,3°C pro 20 Sekunden. Die Trennung des Doppelstranges führt zur Abdissoziation des gebundenen SYBR-Green, d.h. zur Abnahme der Fluoreszenz.



**Abb. 12: Temperaturverlauf der der Schmelzkurve**

**A:** Die mit steigender Temperatur abfallende Fluoreszenz repräsentiert die sukzessive Freisetzung von SYBR-Green aus der schmelzenden Doppelstrang-DNA. Bei der Temperatur des maximalen Fluoreszenzabfalles schmilzt ein großer Teil der gesamten DNA annähernd zur gleichen Zeit; dabei handelt es sich um das in großer Menge vorliegende PCR-Amplifikat. **B:** Die Ableitung der Schmelzkurve. Das Amplifikat wird durch ein Maximum repräsentiert. Fehl-amplifikate schmelzen aufgrund unterschiedlicher Größe und AT-CG-Verhältnis bei anderen Temperaturen, ergeben damit ein oder mehrere zusätzliche Maxima in der Schmelzkurve.

An der Stelle des stärksten Abfalls der Kurve geht ein großer Anteil des SYBR-Green nahezu zeitgleich aus dem gebundenen in den nicht-fluoreszierenden freien Zustand über (Abb. 12). Bei dieser Temperatur dissoziiert demgemäß ein Großteil der synthetisierten Amplifikate. Für jede Fraktion spezifischer Fragmente ergibt sich somit ein steiler Abfall der Kurve; die Ableitung der Schmelzkurve sollte also so viele Maxima



besitzen wie sich unterschiedliche DNA-Fragmente in der Probe befinden. Allerdings kann die Schmelzkurve bei ungünstiger Konstellation von Fragmentgröße und AT-CG-Anteil der PCR-Produkte diese nicht sicher unterscheiden. Um Spezifität der PCR sicher zu stellen, erfolgte deshalb bei der erstmaligen Benutzung neuer Primer eine DNA-Gelelektrophorese (s.u.).

### Die Quantifizierung mittels Taq-Man-Sonde

Bei diesem als Taq-Man-System bezeichneten Verfahren enthält der Ansatz neben den FW- und REV-Primern ein zusätzliches Oligonukleotid, welches komplementär zu einer Sequenz zwischen den erstgenannten Primern ist. Es trägt am 5'-Ende einen Reporter (hier FAM, Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende einen nichtfluoreszierenden Quencher sowie eine MGB (Major Groove Binding Site), der die Schmelztemperatur des Oligonukleotids vergrößert bzw. kurze Primer-Längen ermöglicht.

Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, hydrolysiert aber ausschließlich am Target hybridisierte Oligonukleotide. Der Abbau des Oligonukleotids trennt den Reporter vom Quencher, was zum Anstieg der FAM-Fluoreszenz führt. Diese wiederum kann nur gemessen werden, wenn das Target komplementär zur Taq-Man Sonde ist. Je mehr Amplifikat entsteht, desto größere Mengen von freiem Reporter entstehen. Vorteil dieser Technologie ist, dass der Anstieg der FAM-Fluoreszenz hochspezifisch für den Abbau der Sonde ist, unspezifische Amplifikation wird praktisch nicht gemessen. Somit entfällt auch die Schmelzkurve (Abb. 11). Zur Feststellung der eingesetzten Menge der Taq-Man-Sonde im Reaktionsansatz wird eine passive Referenz verwendet. Dabei handelt es sich um den Farbstoff ROX, der nicht mit Nukleinsäuren interagiert.

### Durchführung der PCR

Für die SYBR-Green-Methode wurde für jedes Zytokin ein Mastermix hergestellt. In diesem befinden sich SYBR-Green Reagent mit Taq-Polymerase und Nukleotiden, FW- und REV-Primer. In jedes PCR-Well wurde nun 11,5 µl Mastermix vorgelegt, danach 2 µl der entsprechenden cDNA zugefügt. Bei Taq-Man-Sonden (in dieser Arbeit zum Nachweis der IL-17A mRNA) wurde pro Well 10 µl Master-Mix vorgelegt, dann 9 µl cDNA und schließlich 1 µl des Taq-Man-Reaktionsgemischs, welches neben den Primern für IL-17A auch noch das Reporter-Oligonukleotid enthält. Nach Versiegelung mit optisch klarer Folie wurde die PCR-Platte für 90 s bei 1200 rpm zentrifugiert.

### Auswertung nach $\Delta\Delta CT$

Bei der Auswertung nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode wird die Expression eines sog. Housekeeping-Gens in Relation gesetzt zur gesuchten Expression des Gens von Interesse, hier z.B.  $TNF\alpha$ . Die konstante und aktivierungsunabhängige Expression z.B. der 18S RNA erlaubt eine quantitative Aussage über ein Gen, was in Relation dazu in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird. Die Differenz zwischen CT-Wert des Housekeeping-Gens und des gesuchten Gens gibt an, um wie viele Zyklen das gesuchte Gen später als das Housekeeping-Gen in die exponentielle Phase der Amplifikation überging; es handelt sich um den  $\Delta CT$ -Wert.

$$CT_{18S} - CT_{target} = \Delta CT$$

$\Delta CT$  ist ein Maß für die relative Expression des Target-Gens und kann z.B. mit der Expression in anderen Proben verglichen werden. Da pro Zyklus eine Verdopplung des DNA-Templates stattfindet, entspricht der Term  $\Delta CT$  als Exponent zur Basis 2 dem Expressionsunterschied der untersuchten Gene. Möchte man zwei Versuchstiere hinsichtlich der Expression eines Targets vergleichen, so gelingt dies über die Differenz der  $\Delta CT$ -Werte.  $\Delta\Delta CT$  ermöglicht eine Aussage über die Expression eines Targets in behandelten (treated) vs. in nicht-behandelten Tieren (naive).

$$\Delta CT_{naive} - \Delta CT_{treated} = \Delta\Delta CT$$

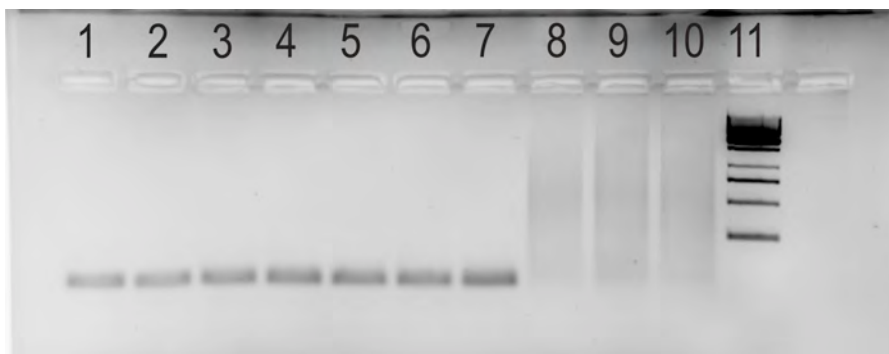
In gleicher Weise kann man über den Exponenten  $\Delta\Delta CT$  zur Basis 2 die relative Expression des Targets in behandelten vs. in nicht-behandelten Tieren ermitteln. In dieser Arbeit wird die Expression meistens als  $\Delta CT$ -Wert angegeben.

#### 3.2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Für aussagekräftige Ergebnisse der Real Time PCR müssen mögliche Fehlamplifikationen ausgeschlossen werden, da jede Art doppelsträngiger DNA unspezifisch vom Farbstoff SYBR-Green angefärbt wird und photometrisch erfasst wird. Der Vermeidung solcher Fehler dient primär die Schmelzkurve, die routinemäßig nach jedem PCR-Lauf stattfindet und durch die ermittelt wird, wie viele unterschiedliche Amplifikate entstanden sind. Da allerdings die Schmelzkurve nicht nur nach Größe, sondern auch nach AT-CG-Anteil auf trennt, können bei ungünstiger Konstellation von Länge und Basenanteil Fehlamplifikate unentdeckt bleiben. Daher wurde zumindest einmal für jeden Primer das entstehende Amplifikat im Gellauf kontrolliert. Bei der hier erwarteten Länge der Amplifikate von 80 - 120 Basenpaaren war ein 2%iges

Agarosegel erforderlich. Hierfür wurden 2 g Agarose eingewogen, 100 ml TAE-Puffer hinzugegeben und die Lösung aufgeköcht. In den Gelträger wurden 10 µl Ethidiumbromid (EtBr) gegeben und anschließend das Gel hineingegossen.

Die DNA wurde mit 6-fachem Probenpuffer versetzt, auf 12 µl DNA kamen 2 µl Probenpuffer. Anschließend wurden die Proben auf die Spuren aufgetragen. In einer zusätzlichen Spur lief der Größenmarker Fermentas O'RangeRuler 100bp DNA Standard. Der Gellauf erfolgte bei 130 V für ca. 20 min. Durch das zugegebene EtBr konnte anschließend die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Abb. 13).



**Abb. 13: PCR-Produkte in der DNA-Elektrophorese**

Auf die Spuren 1 - 7 wurden cDNA-Proben nach Ablauf der PCR aufgetragen. Da nur ein Amplifikat vorliegt, ergab sich jeweils eine einzelne Bande. Vor der PCR besteht die cDNA aus einem Gemisch verschieden großer DNA-Fragmente. Entsprechende Proben liefen in den Spuren 8 - 10. Hier zeigten sich keine Banden. Der DNA-Größenmarker lief in Spur 11.

### 3.2.4 Durchflusszytometrische Methoden

#### 3.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie erreicht man die Analyse einer großen Anzahl von Zellen. Hierbei wird eine Suspension der zu untersuchenden Zellen kontinuierlich in einen Strom schnell fließender Trägerflüssigkeit injiziert, was zu einer linearen Anordnung der einzelnen Zellen führt. In dieser Formation fließen diese durch die Messzellen, in denen sie von einem oder mehreren Laserstrahlen definierter Wellenlänge erfasst werden. Das gestreute Licht ermöglicht Aussagen über die Beschaffenheit der Zellen. Das Vorwärtsstreuung (Forwardscatter) entspricht der Lichtbrechung durch die Zelle und hängt von der Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreuung (Sidescatter) wird im rechten Winkel zum Laserlicht und zur Bewegungsrichtung der Zellen registriert und entspricht der inneren Komplexität bzw. Granularität der Zelle. Neben diesen zwei

Parametern bestehen noch weitere Möglichkeiten der Analyse. So kann z.B. die Expression von Zelloberflächenmolekülen durch Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper nachgewiesen werden. Dabei kann zum einen der Anteil exprimierender Zellen in einer Population, zum anderen auch die relative Expression auf Einzelzellen ermittelt werden. Alternativ zu Fluorochromen können auch Proteine wie z.B. GFP oder intrazelluläre Farbstoffe wie DAPI erfasst werden.

Das gestreute Licht wird mittels Photodetektoren erfasst. Während des Durchlaufs einer Zelle durch den Laserstrahl werden zeitlich aufeinanderfolgend ca. 30 einzelne Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Deren Auftragung auf die Zeitachse ergibt eine Kurve, die den Durchlauf der Zelle repräsentiert. Zur Auswertung kann nun das Integral der Kurve (Signal A, z.B. FSC-A) oder die Höhe (z.B. FSC-H) herangezogen werden.

### 3.2.4.2 Aufreinigung der Zellen

#### Aufreinigung von intraepithelialen Lymphozyten

Nach der Entnahme wurde der Darm in eine Glasflasche mit 20 ml RPMI gegeben und 30 min im Wasserbad bei 37°C mittels Magnetrührer gerührt. Hierdurch und durch anschließendes kurzes Schütteln der Flasche lösten sich die IEL aus dem Gewebe. Das Medium wurde durch ein Sieb gegossen, der Darm noch zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und die 40 ml schließlich über einen 70 µm-Zellfilter in ein 50 ml-Röhrchen gegeben. Für die Aufreinigung der Lamina-propria-Lymphozyten (LPL) wurden die Gewebereste des Darmes weiterverarbeitet (s. Aufreinigung der LPL).

Die Zellsuspension im Röhrchen wurde 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert, dann der Überstand über dem Zellpellet abgegossen oder abpipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Isolation der Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurde das Pellet in 5 ml einer 40%igen Percoll-Lösung in RPMI resuspendiert; mit dieser Suspension wurden 3 ml einer vorbereiteten 70%igen Percoll-Lösung in RPMI, angesetzt in einem 15 ml-Röhrchen, vorsichtig überschichtet.

Dieses Röhrchen wurde 20 min bei 2000 rpm zentrifugiert, mit kleinstmöglicher Beschleunigung beim An- und Auslaufen des Rotors. Dadurch wurde gewährleistet, dass kaum Verzögerungskräfte auftraten und die getrennten Phasen sich nicht vermischten. Nach Entfernung des Überstandes, welcher tote Zellen und Trümmer enthielt, konnte die Interphase gewonnen werden, in der die Lymphozyten meistens als dünner weißer Ring sichtbar waren. Die Zellen in der Interphase wurden in ein neues 50 ml-Röhrchen

überführt, mit PBS aufgefüllt und erneut 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet auf Eis gestellt und war damit bereit für Färbung und Fixierung.

#### Aufreinigung der Lymphozyten der Lamina propria

Das restliche Darmgewebe aus der Aufreinigung der IEL wurde zerschnitten, in 20 ml des Ansatzes für Kollagenaseverdau (s. 3.1.8 Medien und Lösungen) gegeben und für 45 min erneut im 37°C Wasserbad gerührt. Schließlich wurde der Inhalt durch ein Sieb in eine Petrischale gegossen, die Gewebereste mit 25 ml PBS gewaschen und anschließend die Suspension aus der Schale durch den 70 µm-Zellfilter in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Gradientenzentrifugation wurde nur in einem Teil der Experimente durchgeführt. Auf sie wurde insbesondere dann verzichtet, wenn neben Lymphozyten auch Monozyten und Granulozyten aus den LPL isoliert werden sollten. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1100 rpm wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet auf Eis gelagert.

#### Aufreinigung von Zellen aus der Milz

Nach Organentnahme wurde die Milz mit 5 ml PBS auf ein Sieb in eine Petrischale gegeben. Es folgte die Homogenisierung des Organs mit einem Spritzenstempel. Stempel und Sieb wurden anschließend mit 10 ml PBS gespült und die Zellsuspension durch einen 70 µm-Zellfilter in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Dieses wurde 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 ml Erylysepuffer zum Pellet. Nach 3-minütiger Inkubation wurde das Röhrchen mit 12 ml PBS 0,2% BSA aufgefüllt, für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

#### Aufreinigung von Zellen aus Lymphknoten

Nach Organentnahme wurden die Lymphknoten in ein Röhrchen mit PBS gegeben, anschließend mit dem Spritzenstempel zerkleinert und nach Zugabe von 10 ml PBS über den 70 µm-Zellfilter in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Es folgten die Zentrifugation der Suspension für 5 min bei 1100 rpm und die Entfernung des Überstandes. Das Zellpellet wurde anschließend resuspendiert und zum Zählen verdünnt.

#### 3.2.4.3 Zählen und Verdünnen der Zellen

Zur Färbung wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet. Er dringt in lebende Zellen nicht ein, welche aufgrund des negativen Färbeverhaltens und der Morphologie unter dem Mikroskop identifiziert werden können.

Für die Durchführung der Färbung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt und anschließend 10 µl der gefärbten Suspension auf die Neubauer-Zählkammer übertragen. Nun wurden die Zellen pro Großquadrat ausgezählt und danach der Durchschnitt aus mindestens zwei Großquadraten berechnet ( $\bar{n}$  Großquadrat). In die Rechnung gehen außerdem der Kammerfaktor und die Verdünnung ein.

$$\bar{n} \text{ Großquadrat} \times 10 \times 10^4 = \text{Zellen / ml}$$

#### 3.2.4.4 Extrazelluläre Färbung der Zellen

Die Zellen wurden in den FACS-Röhrchen gefärbt. Dieser Vorgang umfasste zunächst die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und dann die eigentliche Färbung mit den fluorochromkonjugierten Antikörpern. Bei Zellen aus dem Darm wurde die angestrebte Zellzahl von  $2 \times 10^6$  pro Messung nicht immer erreicht. Gleichwohl wurde immer dieselbe Menge an Fluorochrom gekoppelten Antikörpern verwendet. Alle Waschschriffe wurden mit eisgekühltem PBS durchgeführt.

Zunächst wurde die Blocklösung angesetzt. Dazu wurden je 1 µl normales Rattenserum (NRS) und 0,5 µl Fc-Block Antikörper in 20 µl PBS pro Probe gegeben. Rattenserum enthält etwa 10 mg/ml Immunglobuline. Diese Antikörper blockieren unspezifische Bindungsstellen. Der Fc-Block ist ein Antikörper, der die Fc-Bindungsstellen der Fc-Rezeptoren CD16 und CD32 bindet und blockiert. Fluorochromgekoppelte Antikörper können daher nicht unspezifisch über ihren Fc-Teil gebunden werden.

Nach 5 min wurde dann die Färbung hinzugegeben. Der Färbeansatz bestand aus den in PBS verdünnten fluorochromgekoppelten Antikörpern. Pro Ansatz wurden dabei 50 µl PBS eingesetzt und je nach Fluoreszenzintensität des Fluorochroms und Expressionsstärke der anzufärbenden Struktur 1 µl oder 0,5 µl fluorochromgekoppelter Antikörper.

Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend gemessen. Bei Bedarf erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 200 µl 1% Paraformaldehyd (PFA).

#### 3.2.4.5 Stimulation und intrazelluläre Färbung der Zellen

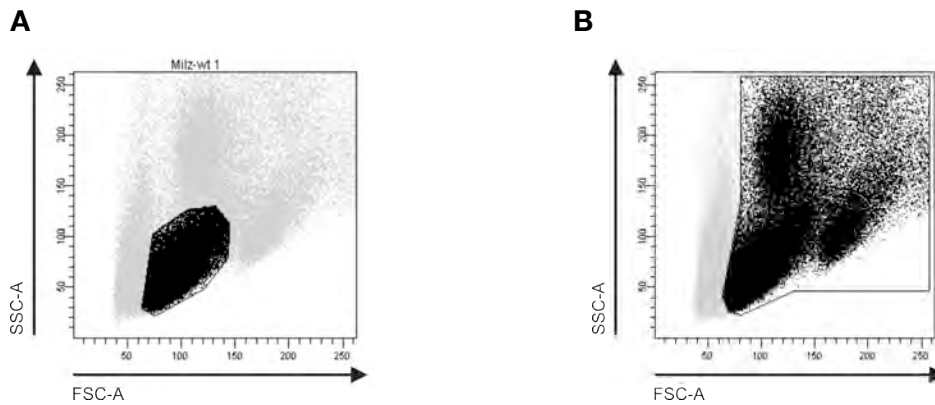
Die Stimulation von Lymphozyten dient der Charakterisierung des Zytokinprofils und der Zuordnung zu bestimmten T-Zellsubpopulationen. Die polyklonale Stimulation aller Lymphozyten induziert die Synthese und Sekretion von Zytokinen, deren Muster für bestimmte T-Zellsubpopulationen kennzeichnend ist.

Für jede Zellprobe wurde jeweils ein Ansatz mit PMA und Ionomycin sowie ein Ansatz ohne Stimulation inkubiert. Die Kultur erfolgte in 1 ml komplettem RPMI für 4 h bei 37°C. Nach 30 min wurden pro Ansatz 10 µg Brefeldin A (BFA) hinzugefügt. BFA ist ein Zellgift, welches den Golgi-Apparat inaktiviert; dadurch werden die synthetisierten Proteine nicht durch Exozytose abgegeben, sondern reichern sich intrazellulär an und können dort spezifisch nachgewiesen werden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Stimulationsansätze mit PBS aufgefüllt, für 5 min mit 1100 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Danach wurden die Zellen im Pellet gefärbt, zunächst extrazellulär wie beschrieben.

Vor der intrazellulären Färbung erfolgte in 200 µl PBS 2% PFA für 15 min die Fixierung der Zellen. Danach wurden die Zellen mit PBS 2% BSA gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgt in Saponinpuffer. Saponin ist ein mildes Detergens, das die Membranpermeabilität erhöht und den Zutritt der fluorochromgekoppelten Antikörper erlaubt. Zuerst wurden die Zellen mit dem Fc-Block in Saponinpuffer inkubiert (0,5 µl Fc-Block auf 20 µl Saponinpuffer). Nach 5 min erfolgte die intrazelluläre Färbung mit den gewünschten Antikörpern pro Ansatz in 50 µl Saponinpuffer. Die Färbung wurde 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen wiederum in PBS gewaschen und bei Bedarf mit 200 µl PBS 1% PFA fixiert.

#### 3.2.4.6 Messung und Auswertung

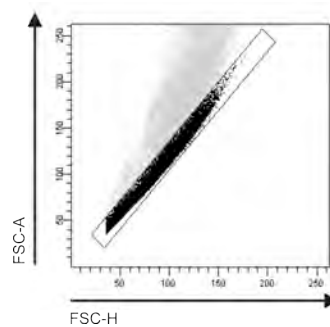
Die Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Programm FACS Diva. Die Messergebnisse wurden entweder eindimensional als Histogramm oder zweidimensional als Dot Plot dargestellt. Durch das Setzen sog. Regionen ließen sich Zellpopulationen im Dot Plot eingrenzen und Aussagen auf bestimmte Teilpopulationen beschränken. Eingegrenzte Zellpopulationen konnten in zusätzlichen Dot Plots auf weitere Eigenschaften untersucht werden. In der angewendeten Auswertungs-Strategie wurden die Zellen als erstes bezüglich Forward- und Sidescatter (FSC/SSC), d.h. nach Größe und Granularität dargestellt. Diese Ansicht erlaubte eine orientierende Differenzierung von Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und toten Zellen (Abb. 14). Nun konnten entweder nur Lymphozyten oder alle Leukozyten separat weiter analysiert werden.



**Abb. 14: Eingrenzung von Lymphozyten und Leukozyten**

Zu sehen sind die nach Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) aufgetrennten Zellen. In **A** umgrenzt die Region nur die Lymphozyten, in **B** die gesamten lebenden Leukozyten.

Bei vitalen Einzelzellen korrelieren deren Signale im FSC-A/FSC-H-Diagramm eng, d.h. die Zellen liegen annähernd auf einer Linie. Komplexe aus zwei oder mehreren aneinander haftenden Zellen sowie tote Zellen führen zu falschen Messergebnissen und sollen daher von der Analyse ausgeschlossen werden. Diese Komplexe wurden mit Hilfe der Dubletten-Region aussortiert (Abb. 15). Die Schnittmenge von FSC/SSC-Region und Einzelzellen-Region bestand somit v.a. aus lebenden Einzelzellen.



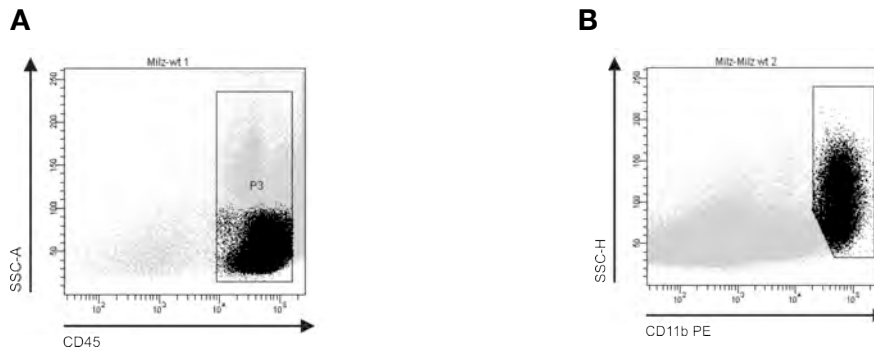
**Abb. 15: Ausgrenzung der Dubletten**

Die Zellen sind nach Höhe (FSC-H) und Fläche (FSC-A) des Signals aufgetrennt. In der Region befinden sich etwa 90% der Zellen.

Kennzeichnend für hämatopoetische Zellen ist die Expression der Rezeptortyrosinphosphatase CD45. Der verwendete monoklonale Antikörper erkennt alle Isoformen von CD45. Da die Zellpopulationen im Bezug auf alle hämatopoetischen Zellen angegeben wurden, wurde auf die lebenden Einzelzellen eine CD45-Region gelegt. CD11b ist die  $\alpha$ -Untereinheit eines Integrins und bildet mit CD18 als  $\beta$ -Untereinheit das  $\alpha\text{M}\beta 2$ -Integrin. Dieses ist auf allen Zellen der myeloischen Reihe exprimiert. Zur Dar-



stellung der Granulozyten und Monozyten wurde der CD45-Region eine zusätzliche CD11b-Region nachgeschaltet (Abb. 16). Anhand der prozentual ermittelten Subpopulationen und der in der Zählkammer gezählten Zellen wurden schließlich die absoluten Zellzahlen für verschiedene Zellpopulationen errechnet.



**Abb. 16: Identifizierung hämatopoetischer Zellen**

Alle hämatopoetischen Zellen exprimieren eine Isoform von CD45. **A:** In der CD45-positiven Population lassen sich bereits mehrere Subpopulationen abgrenzen. **B:** Eingrenzung myeloider Zellen mittels CD11b.

### 3.2.5 Histologische Methoden

#### 3.2.5.1 Einbettung und Präparatherstellung

Histologische Untersuchungen geben Aufschluss über pathologische Veränderungen wie Infiltration von Leukozyten oder Veränderungen der Gewebearchitektur. Mit den Methoden der Immunhistochemie ist darüber hinaus der spezifische Nachweis von Oberflächenantigenen möglich; dies erlaubt die Erkennung spezifischer Zellen sowie deren Verteilung im Gewebe.

Eine wichtige Voraussetzung ist die Fixierung der Gewebeprobe. Sie hält das Gewebe in möglichst naturgetreuem Zustand, verhindert Autolyse, härtet das Material und tötet Mikroorganismen ab. Allerdings werden durch die Fixierung Proteine vernetzt, was zum Umbau der natürlichen Struktur führt. Es ergibt sich ein sog. Äquivalenzbild mit konstanten Charakteristika, mit denen sich verlässlich arbeiten lässt.

Die Präparatherstellung begann mit der Immersionsfixierung der Gewebeproben in 3 ml 4%igem Formaldehyd. Nach einer Lagerung von 24 h bei 4°C wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen. Für die nun folgende Paraffin-Einbettung wurden die gewaschenen Proben jeweils in Einbettkassetten gebracht. Der anschließende Durch-

lauf der Kassetten durch die Tauchbäder der aufsteigenden Alkoholreihe, der Klärmedien sowie die des flüssigen Paraffins fand vollautomatisch mithilfe des Gewebeeinbettautomaten Shandon Citadel 1000 statt (Tab. 4).

**Tab. 4: Programm für die Paraffin-Einbettung**

Der Durchlauf der Einbettkassetten durch die Tauchbäder erfolgte mittels Gewebeeinbettautomaten.

Stufe	Dauer [h:min]	Lösung
1	2:30 h	Ethanol, 60%
2	1:00 h	Ethanol, 70%
3	1:00 h	Ethanol, 96%
4	1:00 h	Ethanol, 96%
5	1:00 h	Ethanol, 100%
6	1:00 h	Ethanol, 100%
7	1:30 h	Ethanol, 100%
8	1:00 h	Xylol
9	1:00 h	Xylol
10	1:30 h	Xylol
11	1:00 h	Paraffin I
12	1:30 h	Paraffin II

Die Alkoholreihe diente der Entwässerung der Präparate. Damit wurden sowohl die wässrige Fixierlösung als auch Überreste des Gewebewassers entfernt. Xylol diente der Klärung; in diesem Reagenz sind sowohl Alkohol als auch Paraffin löslich. Nun wurde das Gewebe mit verflüssigtem Paraffin bei 58°C durchtränkt. Zuvor wassergefüllte Räume wurden jetzt durch das Einbettmedium ausgefüllt. Anschließend wurde an der Gießstation die Probe mittels Gussform in einen Paraffinblock gegossen. Nach vollständigem Erkalten konnten von diesem Paraffinquader mittels Mikrotom dünne Schnitte angefertigt werden. Sowohl für die reine H.E.-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) als auch für die Immunhistochemie wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt.

Die Gewebeschnitte wurden auf Glasobjektträger gebracht. Vor der H.E.-Färbung war eine Herauslösung des Paraffins mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe erforderlich, da die Färbekomponenten wasserlöslich sind. Nach dem Färbvorgang wurde das Präparat eingedeckt. In dieser Arbeit kam die H.E.-Färbung entweder als alleinige Färbung oder als Übersichtsfärbung in Ergänzung zur Immunhistochemie zur Anwendung.

### 3.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Kombination aus Hämatoxylin-Färbung und Eosin-Gegenfärbung ist eine Standardfärbung in der Histologie. Der aus Hämatoxylin und Alaun hergestellte Farbstoff Hämalaun färbt Zellkerne, zytoplasmatische Organellen und Strukturen, die reich an rauem endoplasmatischem Retikulum sind, blau-violett an. Der saure Farbstoff Eosin färbt andere zytoplasmatische Bestandteile sowie faserige extrazelluläre Komponenten rot an (Riedelsheimer und Welsch 2012).

Nach Entparaffinisierung wurden die Präparate für 1 min in Hämalaun gegeben und danach sofort für 10 min in Leitungswasser gewaschen. Bei der anschließenden Differenzierung mittels saurer Alkohollösung (HCl-Ethanol) wurde unspezifisch gebundenes Hämalaun entfernt. Die Anhebung des pH-Wertes mittels 2-minütiger Spülung stoppte diesen Prozess. Es folgte die Gegenfärbung mit 0,5 % wässriger Eosinlösung für ca. 20 s. Durch zweimalige, kurze Spülung wurde anschließend das Eosin entfernt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 96% EtOH, 3x 100% EtOH) wurde das Präparat wieder vollständig entwässert und anschließend mittels Xylol geklärt. Danach erfolgte die Eindeckung des Präparates.

### Auswertung H.E.-gefärbter Schnitte

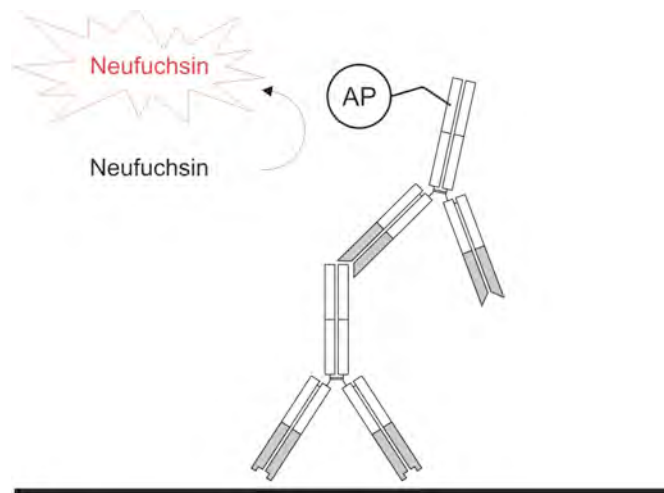
Die Befundung der H.E.-gefärbten Schnitte erfolgte anhand eines Scoring-Systems. Dabei wurde die Pathomorphologie des Gewebes anhand der Beschaffenheit von Epithelien und Krypten beurteilt (Cooper et al. 1993). Je nach Ausprägung der Entzündungszeichen wurden diese Merkmale anhand einer Skala von 1 bis 5 bewertet. Die Summe der Einzelwerte ergab einen Scoring-Wert zwischen 2 (gesunder Darm) und 10 (maximal ausgeprägte Schädigung, Tab. 5).

**Tab. 5: Histologischer Score**

Epithel	Score	Krypten	Score
Normale Morphologie	1	Kein Infiltrat	1
Verlust von Becherzellen	2	Infiltrat im Bereich der Krypten	2
Verlust von Becherzellen (große Arealen)	3	Infiltrat erreicht die Muscularis mucosae	3
Verlust von Krypten	4	Verdickung der Mukosa	4
Verlust von Krypten (große Areale)	5	Infiltrat in der Submukosa	5

### 3.2.5.3 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie ist eine Spezialfärbung, bei der im Gewebeschnitt mittels Antikörpern ein definiertes Antigen nachgewiesen werden kann. Der erste Schritt ist die Inkubation mit einem Primärantikörper, der spezifisch für das gesuchte Antigen ist. An den Fc-Teil des Antikörpers kann nun ein biotinylierter Sekundärantikörper binden, welcher über Avidin ein biotinlyiertes Enzym trägt (Abb. 17). Das Enzym kann ein zugegebenes Substrat, in den durchgeführten Versuchen das Neufuchsin, umsetzen und durch einen Farbumschlag die Detektion ermöglichen.



#### Abb. 17: Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Die Primärantikörper sind imstande, in Gewebeschnitten ihr Epitop zu binden. Durch zusätzliche Bindung eines Biotin-Sekundärantikörpers sowie eines Komplexes aus Avidin und biotinlyierter alkalischer Phosphatase (AP) kann eine Farbreaktion zum Nachweis des Epitops erfolgen (schematisiert gezeigt). Durch mehrfache Biotinylierung des Sekundärantikörpers können viele Avidine binden, was die Detektion nur schwach exprimierter Antigene ermöglicht.

In den nachfolgend vorgestellten Versuchen wurden Primärantikörper gegen Mac2, F4/80 und Ly6G verwendet. Zur Übersicht wurden die Präparate zusätzlich H.E.-gefärbt. Dadurch konnten die spezifisch nachgewiesenen Antigene einer bestimmten Gewebelokalisation und -struktur zugeordnet werden.

#### Immunhistochemische Färbung: Ly6G

Ly6G ist ein GPI-verankertes Membranprotein und eine Isoform des myeloiden Differenzierungsantigens Gr-1 (Daley et al. 2008). Der hier verwendete Antikörper NIMP-R14 erkennt Ly6G, welches vorwiegend auf Granulozyten exprimiert ist.

Zunächst wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe und Xylol deparaffiniert sowie für 5 min unter fließendem Wasser gewaschen. Eine Freilegung der Epitope erfolgte durch Inkubation mit der Protease 24 für 15 min bei 37°C. Gestoppt wurde die Reaktion anschließend mit 100% Ethanol. Anschließend erfolgte für 5 min unter fließendem Wasser der erste Waschschrift der Probe. Zur Blockierung freier unspezifischer Bindungsstellen wurde das Gewebe für 30 min mit 5% Pferdeserum (PS) in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörper-Ansatzes in 5% PS in PBS. Die Inkubation wurde bei 4°C für 24 h durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte zunächst ein Waschschrift für 5 min unter fließendem Wasser. Dann wurde mit dem Zweitantikörper, Biotin-anti-Ratte-Fc, für 30 min inkubiert.

Für die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde der Avidin-biotinyliertes-Enzym-Komplex-Ansatz (ABC-Ansatz) hergestellt. Für diesen Ansatz wurden Avidin und die biotinylierte Alkalische Phosphatase (AP) zusammengegeben und 1:200 in Tris-Puffer (TBS) verdünnt. Nach sorgfältiger Mischung und 30-minütiger Inkubation wurde dieser Ansatz auf den Objektträger gegeben dieser für 1 h inkubiert. Durch die ABC-Methode werden biotinylierte Antikörper sehr sensitiv detektiert, da diese über Avidin drei Enzymmoleküle binden können. In einem folgenden Waschschrift wurden ungebundene Avidin- und Biotinkomplexe entfernt.

Die Farbentwicklung erfolgte durch die Zugabe des Substrats Neufuchsin und 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Die AP überführte den Farbstoff durch Dephosphorylierung in die leuchtend rote Form. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei geeigneter Färbeintensität wurde die Reaktion durch Waschen unter fließendem Wasser und Ansäuerung mittels HCl-Wasser gestoppt. Nach erneutem Waschen für 5 min unter fließendem Wasser erfolgte die Kernfärbung mittels Hämalaun. Anschließend wurde das Präparat eingedeckt.

#### Immunhistochemische Färbung: F4/80

Mit der immunhistochemischen Detektion des Antigens F4/80 durch den Antikörper BM8 werden murine Monozyten und Makrophagen dargestellt (Schaller et al. 2002). Die Färbung begann mit der Deparaffinierung in absteigender Alkoholreihe und Antigendemaskierung. Diese erfolgte durch Behandlung mit Trypsin für 10 min bei 37°C. Danach wurden die Proben kurz in 100% Alkohol getaucht und unter fließendem Wasser abgespült. Dann wurden die Proben für 5 min in TBS pH 7,4 getaucht und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 5% PS in TBS blockiert. Die Zugabe des Primärantikörpers erfolgte in einer 1:300 Verdünnung in 5% PS in TBS, anschließend wurden die Proben 24 h inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei der oben beschriebenen Waschschriffe von jeweils 5 min. Anschließend wurden die Prä-

parate mit einem biotinylierten Esel-anti-Ratte-Fc-Antikörper in TBS für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift, durchgeführt wie oben.

Während der Inkubation des Sekundärantikörpers wurde, wie oben beschrieben, der ABC-Ansatz hergestellt und nach dem Waschschrift für eine 30-minütige Inkubation hinzugegeben. Es folgte ein Waschschrift der Präparate in TBS. Die anschließende Farbreaktion, Kernfärbung und zuletzt die Einbettung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Durch die F4/80-Färbung erscheinen Makrophagen membranär und zytoplasmatisch rot gefärbt, die Zellkerne sind blau dargestellt.

### Immunhistochemische Färbung: Mac2

Galectin 3, mit anderem Namen Mac2, ist ein Lektin, welches von inflammatorischen Makrophagen synthetisiert und sezerniert wird (Cherayil et al. 1990). Mac2 wird in geringem Umfang auch von anderen Zellen im Gewebe exprimiert. Für die Mac2-Färbung wurden die Präparate nach Deparaffinierung und Rehydrierung zunächst in Citratpuffer bei pH 6,1 für 25 min gekocht. Der Citratpuffer wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und die Präparate je zweimal für je 5 min in Aqua dest. bzw. PBS gewaschen. Das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mittels 1:20 verdünntem PS in PBS für 30 min bei RT. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper in einer 1:1000 Verdünnung in 1:20 PS in PBS für 24 h bei 4°C inkubiert. Danach folgten zunächst drei jeweils 5-minütige Waschschriffe in PBS. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in 1:20 PBS für eine 30-minütige Inkubation hinzugegeben. Es schlossen sich drei jeweils 5-minütige Waschschriffe an, bevor der vorbereitete Avidin-AP-Komplex hinzu gegeben wurde. Die Farbentwicklung mittels Neufuchsin, Kernfärbung und Eindeckung erfolgte wie bei der F4/80-Färbung.

### 3.2.6 Myeloperoxidase-Test

Der Myeloperoxidase-Test (MPO-Test) liefert ein quantitatives Maß für die Infiltration von Granulozyten. Neutrophile Granulozyten exprimieren spezifisch das Enzym Myeloperoxidase, welches sich in den primären (azurophilen) Granula befindet. Beim MPO-Assay wird die Aktivität der Myeloperoxidase durch Umsatz eines Redox-indikators photometrisch bestimmt. Die gemessene enzymatische Aktivität korreliert mit der Enzymmenge und ist somit ein Maß für die Invasion der Granulozyten in das untersuchte Gewebe. Um Schwankungen in der Menge des eingesetzten Gewebes auszugleichen, wurde die MPO Aktivität auf die eingesetzte Proteinmenge standardisiert. Deshalb wurde parallel zur MPO-Messung der Proteingehalt im Lysat bestimmt und aus der gemessenen MPO-Aktivität und Proteinmenge ein Quotient gebildet. Der Quotient wurde als Maß für die Infiltration neutrophiler Granulozyten verwendet.

### 3.2.6.1 Enzymatischer Myeloperoxidase-Assay

Zunächst wurde ein 1 cm langes Stück aus der Mitte des Kolons herausgeschnitten, in PBS gewaschen und in ein vorbereitetes 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits 300 µl MPO-Puffer (s. 3.1.8 Medien und Lösungen) und ein 5 mm-Edelstahl-Bead vorgelegt waren. Die Proben wurden umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und erst vor der Homogenisierung durch den Tissuelyser kurz angetaut. Anschließend wurden die Proben 5 min mit einer Frequenz von 30/s lysiert.

Das Lysat wurde mit MPO-Puffer (s. 3.1.8 Medien und Lösungen) auf 1 ml aufgefüllt und bei 10000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes und Re-suspension des Pellets mit 300 µl MPO-Puffer + HTAB erfolgte der zweite Lyseschnitt im Tissuelyser. Anschließend wurden 700 µl MPO-Puffer hinzugefügt, das Lysat gemischt und mittels Ultraschall für 20 s lysiert. Schließlich erfolgte ein weiterer Lyse-schritt: Ein dreimaliger Zyklus, bestehend aus Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei Raumtemperatur. Nach erneuter Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 min wurde der Überstand entnommen. Dieser enthielt nun sowohl Plasmaproteine als auch membranassoziierte Proteine wie die Myeloperoxidase.

Die photometrische Messung erfolgte bei 460 nm. Da die MPO-Substratlösung (s. 3.1.8 Medien und Lösungen) neben dem MPO-Substrat  $H_2O_2$  auch den Redox-indikator O-Dianisidin enthielt, wurde sie erst unmittelbar vor der Messung mit dem Überstand in einem Verhältnis von 9:1 gemischt. Praktisch wurde so vorgegangen, dass zu Beginn der Messung 900 µl der reinen MPO-Substratlösung gemessen und dieser Wert gleich null gesetzt wurde. Sofort nach Zugabe von 100 µl des Überstandes begann die Reaktion und damit der Farbumschlag. Dieser wurde durch Messungen im Abstand von 30 s erfasst. Als Maß für die MPO-Aktivität wurde die Steigung der Absorptionskurve über die Zeit verwendet.

### 3.2.6.2 Proteinbestimmungen mittels BCA

Dieser Test beruht auf der Biuret-Reaktion. Einwertige Kupferionen bilden mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex, welcher Licht der Wellenlänge 540 nm absorbiert. Die einwertigen Kupferionen entstehen durch Reduktion von zweiwertigen Kupferionen in alkalischem Milieu in Anwesenheit von Proteinen. Die Reaktion ist dabei direkt von der Proteinkonzentration abhängig.

Für die Analysen wurde der BCA-Test von Thermo Scientific verwendet. Der Probenansatz erfolgte in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Zunächst wurde mittels mitgelieferter

Rinderalbumin-Stocklösung (BSA, Bovine Serum Albumine) eine Standardreihe angefertigt. Anschließend wurden von den zu messenden Proben jeweils 10 µl in die aufeinander folgenden Wells gegeben. Dann wurde ein Reaktionsmix aus 50 Teilen Reagenz A (Lauge) und 1 Teil Reagenz B (Kupfer-II-Sulfat) hergestellt. Von diesem Reaktionsmix wurden 200 µl zu den einzelnen Proben hinzu gegeben. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert und danach gemessen. Für jeden Wert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### 3.2.7 Graphische Darstellung und Statistik

Die Abbildungen und Diagramme wurden mit Corel Draw X3 und GraphPad Prism 4.0 erstellt, einzelne Abbildungen auch mit StepOnePlus (Diagramme zur RT-PCR) und PyMOL (Proteindarstellungen). Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 4.0 und Excel. Für die Auswertung des klinischen Assessments, des histologischen Scorings und der Ergebnisse der Real-Time PCR wurde aufgrund der nichtparametrischen Werteverteilung der Mann-Whitney-Test angewendet. Dabei erfolgte zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test die Überprüfung, ob signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben bestanden. Wenn dies der Fall war, wurde durch Anwendung des Mann-Whitney-Tests ermittelt, zwischen welchen Versuchsgruppen die Unterschiede Signifikanz erreichten (Bortz und Schuster 2010). Die p-Werte der zu vergleichenden Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism 4.0 berechnet, ein p-Wert > 0,05 wurde als signifikanter Unterschied angesehen.



---

## 4. Ergebnisse

Das Ergebniskapitel dieser Dissertation gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Teil wurde die gewebespezifische Expression von CD38 untersucht. Dafür wurden Lymphozyten und myeloide Zellen aus den Kompartimenten Milz, Lymphknoten und Darm durchflusszytometrisch analysiert. CD38 konnte als Teil des darmspezifischen Phänotyps verifiziert werden. Ein Schwerpunkt unserer Versuche lag auf der Anwendung des DSS-Entzündungsmodells (DSS: Dextransulfat-Natrium). In diesem Krankheitsmodell wurden WT-, CD38<sup>-/-</sup>, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere verglichen. Die Ergebnisse der DSS-Kolitis-Experimente werden im zweiten Abschnitt vorgestellt. Hier wurden auffällige Unterschiede zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet. Das klinische Erscheinungsbild, die Gewichtsanalyse und die Auswertung histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen zeigten ein vermindertes Entzündungsgeschehen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren. Als weitere Korrelate der Darmentzündung wurden die Expressionslevel inflammatorischer und chemotaktischer Zytokine untersucht. Zur Kontrolle dienten jeweils unbehandelte WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere. Im letzten Abschnitt wurde der Einfluss von CD38 auf T-Zellpopulationen unter homöostatischen Bedingungen untersucht. In diesen Versuchen wurden Lymphozyten aus gesunden WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren stimuliert und die Zytokinproduktion durchflusszytometrisch analysiert. Es ergaben sich Hinweise, dass CD38 bereits unter homöostatischen Bedingungen Einfluss auf die Zusammensetzung von T-Zellpopulationen hat.

### 4.1 Expression von CD38 auf Lymphozyten und myeloiden Zellen

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass CD38 auf Lymphozyten im Darm, verglichen mit Lymphozyten der Milz oder aus anderen Kompartimenten, hoch exprimiert ist. Dies sollte zunächst bestätigt werden. Dafür wurde die Expression von CD38 auf Lymphozyten und auf myeloiden Zellen aus der Milz, den mesenterialen Lymphknoten und dem Kolonepithel untersucht.

#### 4.1.1 Expression von CD38 auf Lymphozyten

Zur Untersuchung der CD38-Expression auf Lymphozyten wurden Zellen aus gesunden C57BL/6J-Tieren verwendet. Die Organe wurden entnommen, die Lymphozyten wie beschrieben aufgereinigt und gefärbt (Tab. 6).

Tab. 6: Färbung der Lymphozyten

Antigen	Fluorochrom
CD4	APC-eFluor780
CD8 $\alpha$	PE-Cy7
CD8 $\beta$	PE
CD38	FITC
CD45	PerCP

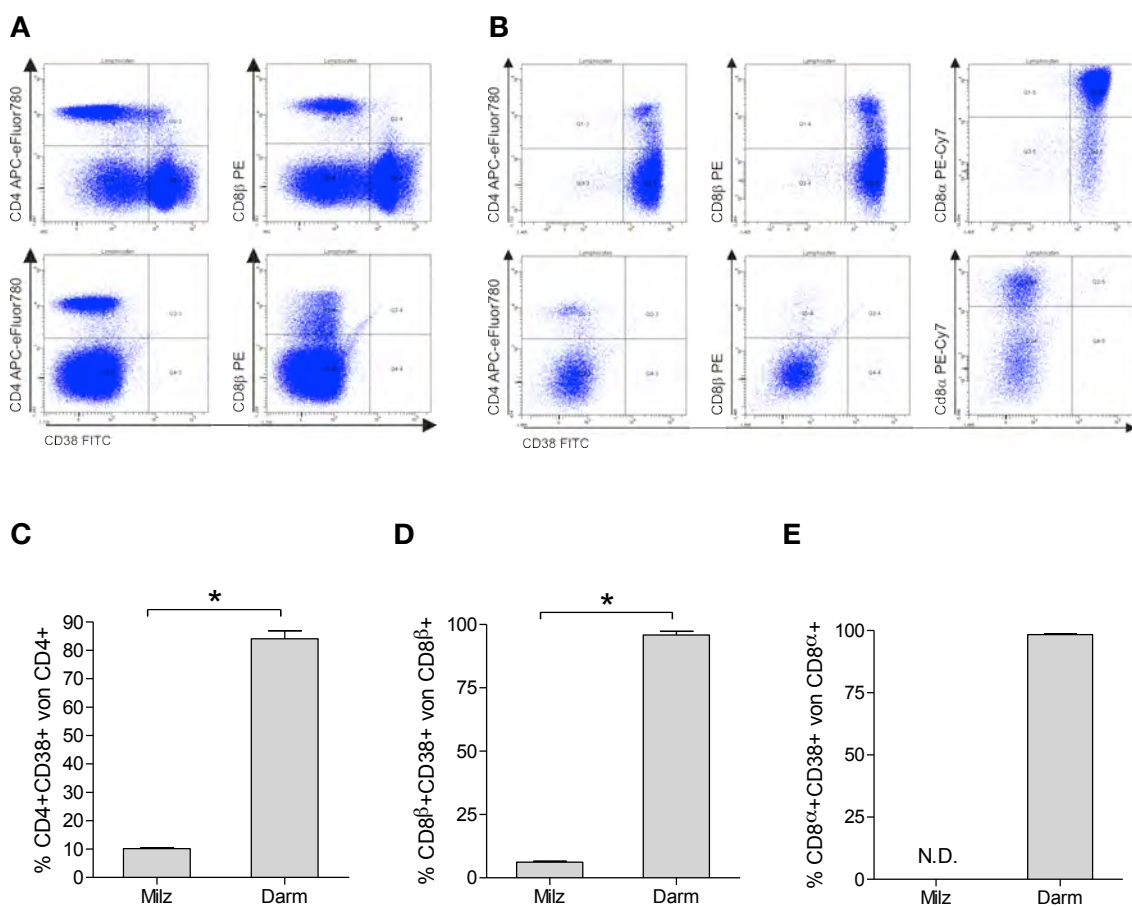


Abb. 18: Expression von CD38 auf T-Lymphozyten

Die Zellen wurden mittels FSC-SSC-, Einzelzellen- und CD45-Region vorselektioniert. Die Diagramme unter **A** und **B** zeigen jeweils oben Lymphozyten aus WT-Tieren, unten solche aus CD38<sup>-/-</sup> Tieren. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus insgesamt drei Experimenten dieser Art. **A**: Expression von CD38 auf Milzlymphozyten. **B**: Expression von CD38 auf Lymphozyten aus dem Kolonepithel. Die beiden CD8 $\alpha$ /CD38 Diagramme beinhalten sowohl unkonventionelle CD8 $\alpha$  T-Zellen als auch konventionelle CD8 $\beta$  T-Zellen. **C**: Mittelwert und Standardabweichung des Anteils an CD38-positiven Lymphozyten unter allen CD4-positiven

---

Zellen aus der Milz (Darm vs. Milz:  $p=0,0015$ ). **D:** Entsprechende Darstellung für CD8 $\beta$ -positive Zellen (Darm vs. Milz:  $p=0,0003$ ). **E:** CD8 $\alpha\alpha$  T-Zellen kommen normalerweise nur in marginalen Zahlen in der Milz vor. Daher werden keine Angaben zur Milz gezeigt (N.D.). Im Darm ist CD38 praktisch zu 100% auf diesen Zellen exprimiert.

T-Lymphozyten aus der Milz exprimieren CD38 gewöhnlich nur sehr schwach. Im vorgestellten Experiment waren CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur zu einem geringen Anteil CD38-positiv, CD8<sup>+</sup> T-Zellen praktisch CD38-negativ (Abb. 18 A). Die CD38-positive Population im unteren rechten Quadranten, die sowohl CD4- als auch CD8 $\beta$ -negativ war, beinhaltet vor allem B-Lymphozyten. Diese Zellen sind in der Maus normalerweise hochpositiv für CD38, das als Korezeptor bei der B-Zell-Rezeptoraktivierung fungiert. Nicht dargestellte Ergebnisse von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten zeigten eine CD38-Expression, die der Expression in der Milz vergleichbar war. Sämtliche CD38-/- Kontrollen zeigten keine Anfärbung von CD38. Im Kolonepithel zeigten mit CD4<sup>+</sup>, CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> und CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen die zahlenmäßig bedeutsamen Subpopulationen der Lymphozyten allesamt hohe Expressionen für CD38 (Abb. 18 B). Der Anteil CD38-positiver Zellen an der entsprechenden Subpopulation war für CD4<sup>+</sup> und CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen im Darm signifikant höher als in der Milz (Abb. 18 C und D). Auch das Ausmaß der CD38-Expression auf CD38-positiven Zellen war deutlich stärker als in der Milz.

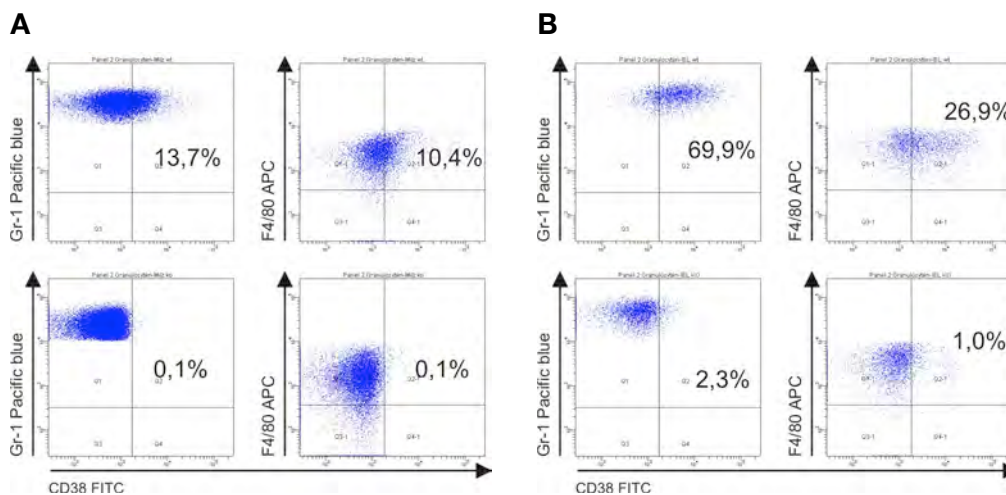
#### 4.1.2 Expression von CD38 auf myeloiden Zellen

Neben Lymphozyten wurden auch myeloide Zellen auf die Expression von CD38 hin untersucht. Da gesundes Darmgewebe praktisch frei von Granulozyten ist und nur wenige Makrophagen enthält, wurden für diesen Versuch Leukozyten verwendet, die aus Salmonellen-infizierten Tieren stammten. Dafür erfolgte zunächst eine Vorbehandlung mit Streptomycin und einen Tag später die orale Infektion mit  $10^9$  Salmonellen des Typs *Salmonella typhimurium* (Stamm: SL1344, Barthel et al. 2003). Als Folge der Infektion kam es im Rahmen einer ausgeprägten Entzündung zur Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen in das Darmgewebe. Zwei Tage nach der Infektion mit Salmonellen wurden die Organe entnommen und durchflusszytometrisch analysiert (Tab. 7, Abb. 19).

**Tab. 7: Färbung myeloider Zellen**

Makrophagen wurden als  $CD11b^+F4/80^+Gr-1^{int}$  und neutrophile Granulozyten als  $CD11b^+F4/80^-Gr-1^+$  definiert.

Antigen	Fluorochrom
CD11b	PE
F4/80	APC
Gr-1	Pacific blue
CD38	FITC
CD45	PerCP

**Abb. 19: Expression von CD38 auf myeloiden Zellen**

Die Zellen wurden aus Milz und Kolon von WT- und  $CD38^{-/-}$  Tieren isoliert, die vorher mit Salmonellen infiziert wurden. Die Färbung erfolgte mit den in Tab. 7 aufgeführten Antikörpern. Die Zellen wurden mittels FSC-SSC-, Einzelzellen- und  $CD45$ -Region vorselektioniert und anschließend die myeloiden Zellen noch durch eine  $CD11b$ -Region definiert. Die oberen Diagramme zeigen jeweils  $CD11b^+Gr-1^+$  oder  $CD11b^+F4/80^+$  Zellen aus WT-Tieren, die unteren die entsprechenden Zellen aus  $CD38^{-/-}$  Tieren. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus insgesamt drei Experimenten dieser Art dargestellt. **A:** Expression von  $CD38$  auf Zellen aus der Milz. **B:** Expression auf Zellen aus dem Kolonepithel.

Zunächst wurden die  $CD45^+CD11b^+$  Zellen vorselektioniert; hierbei handelt es sich um die myeloiden Zellen. An Subgruppen wurden Monozyten und Makrophagen als  $F4/80^+Gr-1^{int}$  und Neutrophile als  $F4/80^-Gr-1^+$  definiert. Die Mehrzahl der Granulozyten und Makrophagen in der Milz waren  $CD38$ -negativ. Dagegen waren im Darm mehr als

---

die Hälfte der Granulozyten CD38-positiv. Bei den Makrophagen zeigte sich dieser Trend ebenfalls, allerdings schwächer ausgeprägt. Von den Makrophagen der Milz exprimierten etwa 10% CD38, dagegen waren es im Darm etwa 27% (Abb. 19). Von den Zellen aus CD38<sup>-/-</sup> Tieren waren praktisch alle Zellen negativ für CD38, was auf die hohe Spezifität der CD38-Färbung hinweist.

#### 4.2 Die Rolle von CD38 im Entzündungsmodell

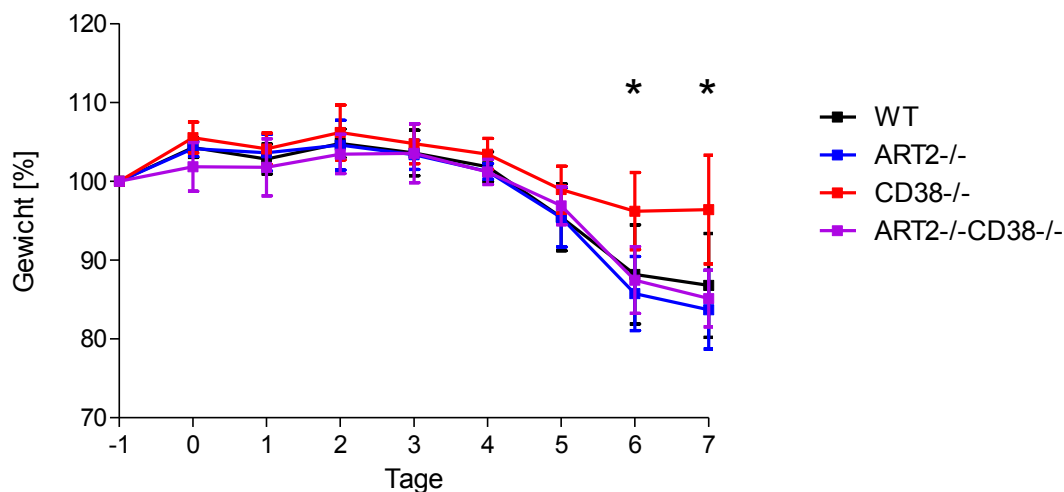
Für die Glykohydrolase CD38 konnte ein darmspezifisches Expressionsmuster auf Leukozyten festgestellt werden, was ein Hinweis auf eine darmspezifische Funktion sein kann. Das intestinale Immunsystem im Darm besitzt spezielle Regulationsmechanismen. Aufgrund des Expressionsmusters und der immunologischen Funktion stellt sich die Frage, ob CD38 darmspezifische Regulationsfunktionen ausübt. Vorversuche der Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass in CD38<sup>-/-</sup> Tieren Darmentzündungen abgeschwächt verlaufen. Daher wurden in den nun folgenden Versuchen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere in einem intestinalen Entzündungsmodell verglichen. Um Hinweise auf die Relevanz von CD38 im extrazellulären Nukleotidstoffwechsel zu erhalten, wurden auch ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere in die Versuche einbezogen.

Als Entzündungsmodell wurde die DSS-Kolitis angewendet (Kap. 3.2.1). Diese Kolitis entspricht unter klinischen, makroskopisch-anatomischen und histologischen Gesichtspunkten einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung. Als Folge der DSS-Verabreichung tritt eine Entzündung des gesamten Kolons auf, die Erkrankung imponiert durch Gewichtsverlust, makroskopische Blutungen, Darmverkürzung sowie histopathologisch durch Kryptenabszesse und entzündliche Infiltrate (Okayasu et al. 1990, Cooper et al. 1993). In den Experimenten wurden demgemäß Gewicht und klinische Parameter ermittelt, Expressionen von Zytokinen und Chemokinen analysiert und schließlich Gewebeproben histopathologisch untersucht.

##### 4.2.1 Gewichtsverläufe

Im Rahmen der DSS-Kolitis kommt es krankheitsbedingt zur Abmagerung der Tiere, deren Ausmaß mit der Schwere der Entzündung korreliert. Zur Kontrolle des Gewichts wurden die Tiere während des Versuchs täglich gewogen. Im dargestellten Experiment folgten die Gewichte zunächst einem in allen Versuchsgruppen ähnlichen Verlauf. Die Gewichte blieben bis etwa zu Tag 4 konstant bzw. nahmen leicht zu (Abb. 20). Bis zu Tag 5 verliefen die Gewichte in den Versuchsgruppen annähernd ähnlich. Danach zeigten alle Versuchsgruppen, mit Ausnahme der CD38<sup>-/-</sup> Tiere, den Übergang in eine

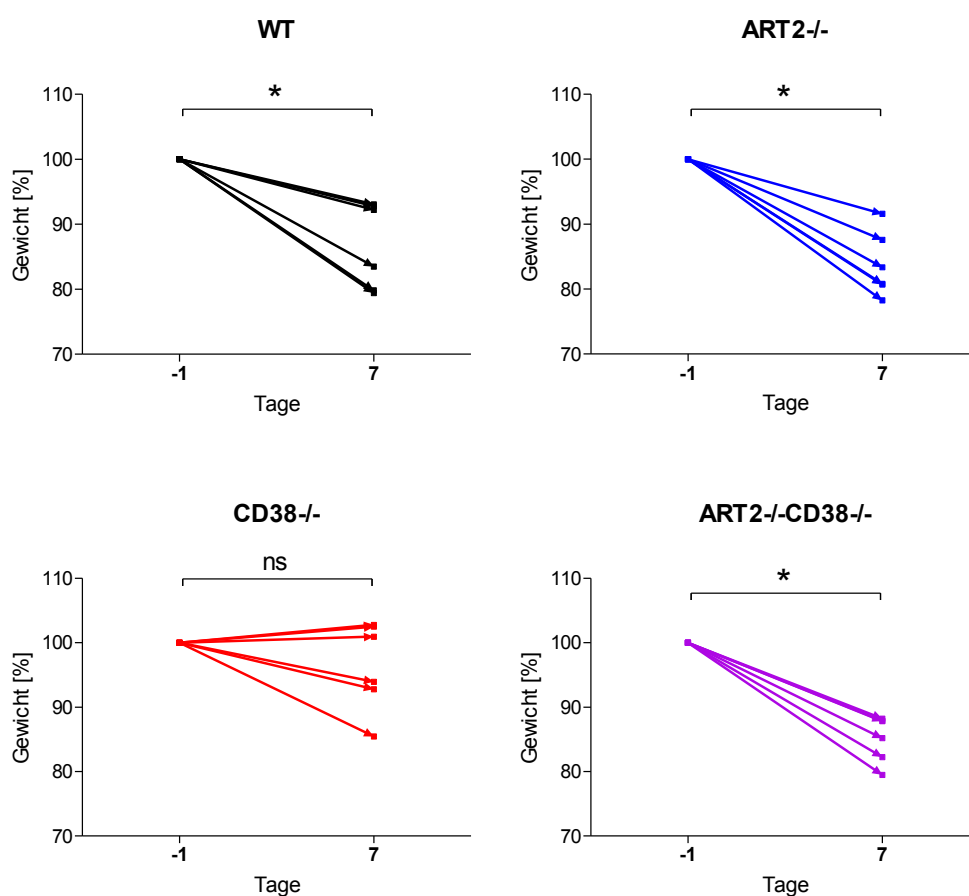
Phase ausgeprägten Gewichtsverlusts. Während das Gewicht der WT-Tiere auf einen Mittelwert von etwa 85% fiel, stabilisierte sich das Gewicht der CD38<sup>-/-</sup> Tiere oberhalb von 95%. Außerdem wurde beobachtet, dass ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere ebenfalls deutlich an Gewicht verloren, und wie WT-Tiere nach 7 Tagen bei etwa 85% des Ausgangsgewichtes lagen. In allen Versuchsgruppen nahm im Verlauf der Kolitis die Streuung der Gewichte zu.



**Abb. 20: Gewichtsverläufe der Versuchstiere**

Jede Versuchsgruppe bestand aus 6 Tieren. Diese wurden für 5 Tage mit 3 % DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen. Das Gewicht der Tiere wurde täglich gemessen und ist prozentual in Relation zum Ausgangsgewicht vor Versuchsbeginn angegeben. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung pro Tag und Gruppe. Statistik für Tag 7: WT vs. CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,026$ , ART2<sup>-/-</sup> vs. CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0087$ , CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0152$ . Statistik für Tag 6: WT vs. CD38<sup>-/-</sup>  $p>0,05$ , ART2<sup>-/-</sup> vs. CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0087$ , CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0152$ .

Der Versuch wurde insgesamt fünfmal durchgeführt; davon zeigten viermal die CD38<sup>-/-</sup> Tiere einen verminderten Gewichtsverlust. Im dargestellten Experiment ließen sich an Tag 6 signifikante Gewichtsunterschiede im Vergleich CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup> und CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren feststellen, am Tag 7 im Vergleich zwischen CD38<sup>-/-</sup> Tieren mit allen anderen Versuchsgruppen. In der Einzelanalyse der Gewichtsverläufe im vorher-nachher Vergleich zeigte sich, dass die Versuchstiergruppen WT, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> signifikant an Gewichtsprozent verloren hatten. Für CD38<sup>-/-</sup> Tiere wurde dagegen kein relevanter Unterschied vor und nach DSS-Behandlung festgestellt (Abb. 21).



**Abb. 21: Gewichtsverläufe in den einzelnen Versuchstiergruppen**

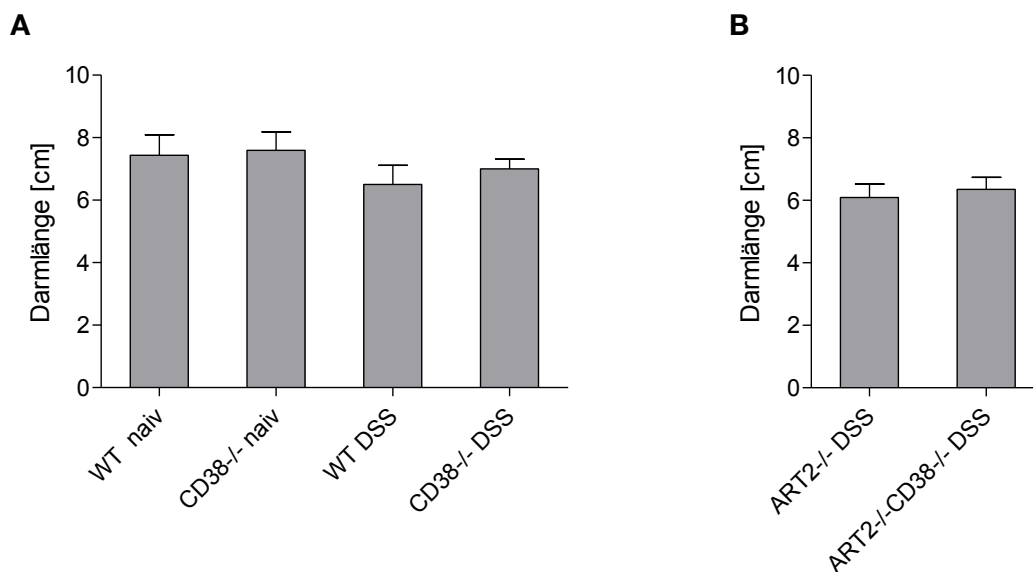
Dargestellt sind die Verläufe des prozentualen Gewichts vom Ausgangsgewicht bis zum Gewicht an Tag 7 des in Abb. 20 vorgestellten Experiments. Statistische Auswertung als Wilcoxon-Rangsummentest für verbundene, nicht normalverteilte Werte. WT  $p=0,031$ , ART2-/-  $p=0,031$ , ART2-/-CD38-/-  $p=0,031$ .

Beide Analysen zeigten einen Gewichtsverlust in allen Versuchsgruppen mit Ausnahme der CD38-/- Tiere. In dieser Gruppe war der Gewichtsverlust der Versuchstiere abgemildert oder nicht vorhanden. Diese Beobachtung könnte auf ein abgeschwächtes Entzündungsgeschehen in diesen Tieren hinweisen. Dieser Trend der Verschlechterung klinischer Parameter unter der DSS-Kolitis (in allen Versuchsgruppen außer in CD38-/- Tieren) zeigte sich auch im klinischen Assessment und entsprach den Beobachtungen mehrerer Vorversuche.

## 4.2.2 Klinisches Assessment

### Messung der Darmlänge

Um das Ausmaß der Entzündung zu evaluieren, wurden in Ergänzung zum Gewichtsverlauf weitere klinische Parameter erfasst. Zu diesen Parametern gehört die Darmlänge, die bei schweren Entzündungen reduziert ist. Da größere bzw. schwerere Tiere auch größere Organe besitzen, wurde die Darmlänge auf das Ausgangsgewicht normalisiert.

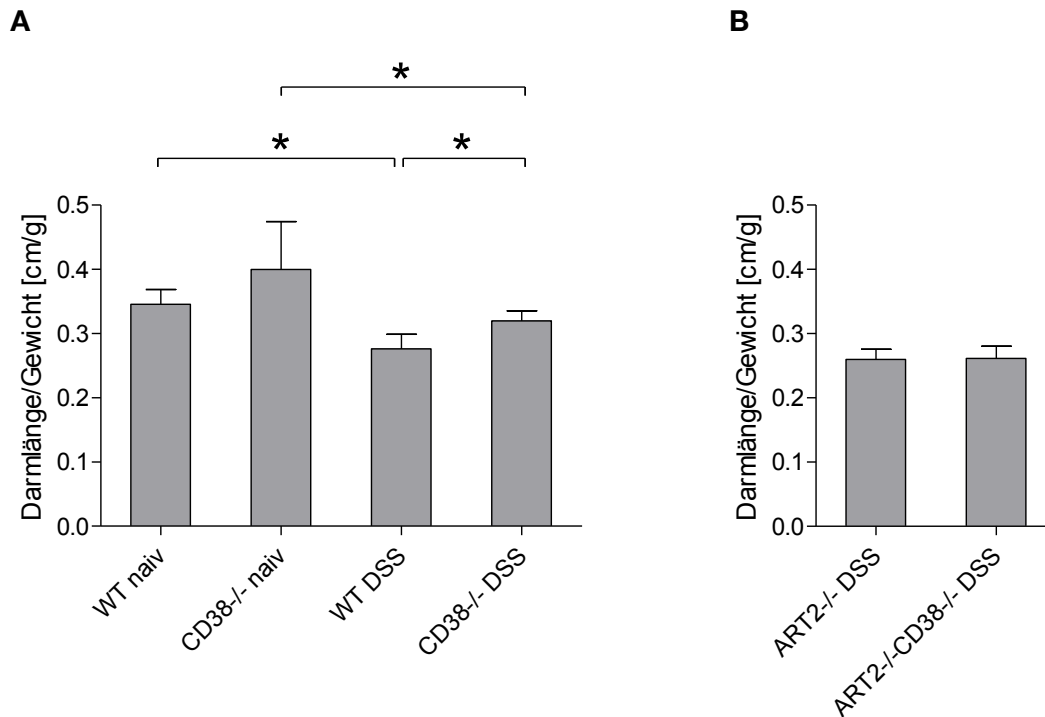


**Abb. 22: Darmlänge gesunder und DSS-behandelter Tiere**

Zwischen 5 und 7 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Darmlänge gemessen. **A:** Vergleich naiver und DSS-behandelter WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere. **B:** DSS-behandelte ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere. Für diese Tiere wurden keine naiv-Werte bestimmt.

Im Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten WT-Tieren zeigten sich die Auswirkungen einer schweren Kolitis auf die Darmlänge. Im Experiment sanken sowohl die absolute Darmlänge (Abb. 22 A) als auch die normalisierte Darmlänge, letztere von etwa 0,35 cm/g in gesunden WT-Tieren auf etwa 0,28 cm/g in DSS-behandelten WT-Tieren (Abb. 23 A). Die normalisierte Darmlänge fiel sowohl in WT- als auch in CD38<sup>-/-</sup> Tieren durch DSS-Behandlung in statistisch signifikantem Ausmaß ab.





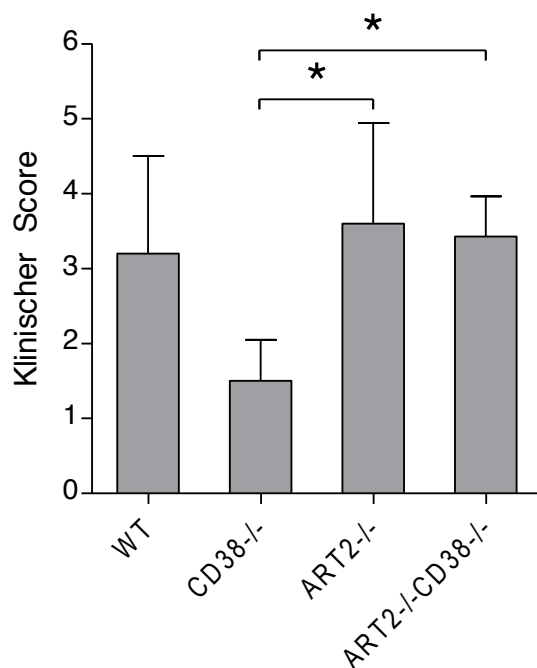
**Abb. 23: Längen/Gewichtsverhältnis gesunder und DSS-behandelter Tiere**

Versuchsgruppen wie Abb. 22. Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung der normalisierten Darmlängen. **A:** WT naiv vs. WT DSS  $p=0,0087$ , CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0043$ , WT DSS vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,021$ . **B:** Vergleich von WT DSS und CD38<sup>-/-</sup> DSS (aus **A**) mit ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren: CD38<sup>-/-</sup> DSS vs. ART2<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0078$ , CD38<sup>-/-</sup> DSS vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0033$ , alle anderen Analysekombinationen  $p>0,05$ .

DSS-behandelte CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten im Vergleich zu behandelten WT-Tieren nicht nur eine im Mittel größere absolute Darmlänge, auch die mittlere normalisierte Darmlänge war in einem statistisch signifikanten Maß größer. Diese Differenz war in allen vier durchgeführten Experimenten vorhanden, unterlag jedoch Schwankungen. Außerdem zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der normalisierten Darmlänge zwischen DSS-behandelten CD38<sup>-/-</sup> Tieren (Abb. 23 A) und DSS-behandelten ART2<sup>-/-</sup> sowie ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren (Abb. 23 B, nicht eingezeichnet).

### Klinischer Score

Das Entzündungsgeschehen wurde außerdem durch Anwendung eines klinischen Scores quantifiziert. Wie bei dem klinischen Parameter Darmlänge bestanden auch in diesem Test große individuelle Schwankungen innerhalb der Versuchstiergruppen. Dennoch zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere eine signifikant verminderte Entzündungspathologie gemäß Scoring-Wert. Dieser Trend ließ sich auch in den anderen durchgeführten Experimenten in unterschiedlicher Ausprägung beobachten.



Tab. 8: Klinischer Score

Grading	Score
Normal geformte Pellets, kein Blut	1
Weiche Pellets	2
Weiche Pellets, Blutbeimengung	3
Keine Pellets, blutiger Stuhl	4
Keine Pellets, massive rektale Blutung	5

#### Abb. 24: Auswertung des klinischen Scorings

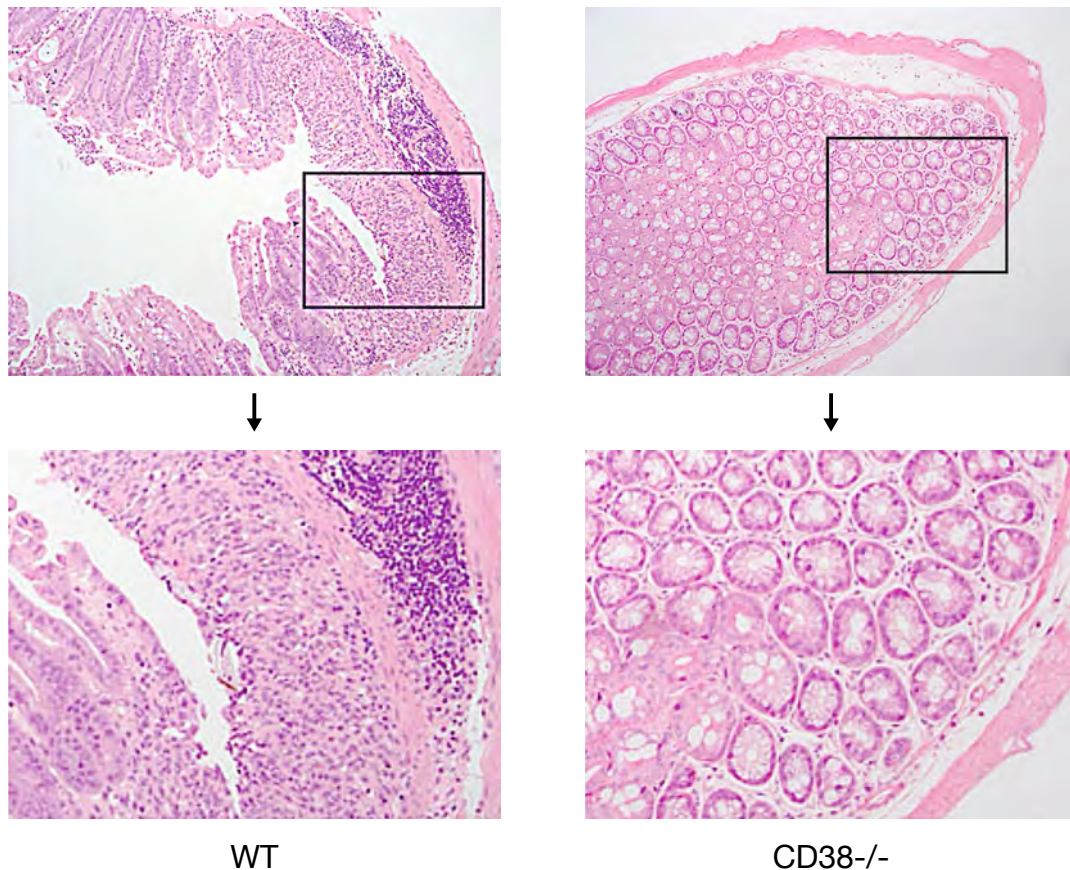
Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS behandelt. Im Rahmen der Organentnahme an Tag 7 wurde der klinische Score der Tiere erhoben. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Scoring-Werte der Gruppen. CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>  $p=0,0147$ , CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0031$ .

Abbildung 24 fasst das Ergebnis des Scorings zusammen. CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten an Tag 7 deutlich geringere Werte, was auf ein geringeres Ausmaß der Entzündung in diesen Tieren hinweist. ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere besaßen Scoring-Werte, die etwa denen von WT-Tieren entsprachen, was auf ein schweres Entzündungsgeschehen wie in WT-Tieren hindeutet. Die Unterschiede zwischen CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> sowie CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren erreicht statistische Signifikanz. Die Ergebnisse des klinischen Scorings korrelieren auch mit dem Gewichtsverlauf der entsprechenden Versuchsgruppen (Abb. 20).

#### 4.2.3 Histologischer Score

Die Untersuchungen von Gewichtsverläufen und klinischen Parametern wiesen auf ein abgemildertes Entzündungsgeschehen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu WT-Tieren hin. Diese Beobachtungen sollten in weiteren Experimenten überprüft werden. Um direkte Einblicke in das Entzündungsgeschehen im Darm zu erhalten, wurden Parafinschnitte von Gewebeproben angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) bzw.

immunhistochemisch gefärbt. Für diese Schnitte wurde Kolongewebe von DSS-behandelten WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren entnommen. Für die Fixierung und Einbettung wurde eine knapp 1 cm lange Gewebeprobe aus dem mittleren Drittel des Kolons herausgeschnitten, längs aufgetrennt und mehrfach in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in 4% Formaldehyd fixiert, erneut gewaschen, entwässert und schließlich in Paraffin eingebettet und geschnitten. Diese Schnitte wurden nach Entparaffinierung mittels H.E. gefärbt (Abb. 25).



**Abb. 25: Histopathologie der Kolitis in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren**

Für die Präparate wurde Kolongewebe von WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren entnommen, die für 5 Tage mit DSS-Wasser und 2 Tage mit normalem Trinkwasser behandelt wurden. Nach Fixierung und Einbettung wurden Gewebeschnitte hergestellt und mittels H.E. gefärbt. **A:** WT-Tiere **B:** CD38<sup>-/-</sup> Tiere (Das Darmlumen wurde hier durch den tangentialen Schnitt nicht angeschnitten). Die Fotos geben jeweils repräsentative Ergebnisse für DSS-behandelte Tiere wieder. Die Vergrößerung beträgt 100x in der Übersicht und 300x in der Detailansicht.

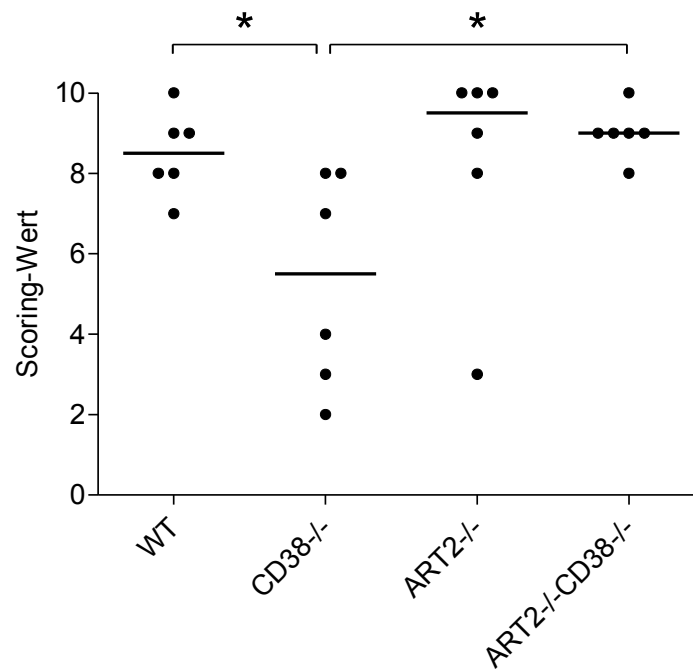
Im Darm von WT-Tieren waren zahlreiche Kryptenverflachungen bis hin zum völligen Verlust der Krypten erkennbar sowie eine entzündliche Infiltration der Mukosa. Auch die Submukosa zeigte sich stellenweise dicht mit Lymphozyten infiltriert. Insgesamt

zeigte sich in WT-Tieren das Bild einer schweren Entzündung. In CD38<sup>-/-</sup> Tieren war eine gering ausgeprägte apikale Schädigung der Zotten auszumachen. Die Krypten waren im Wesentlichen intakt, eine submuköse Infiltration fehlte. Die pathologischen Veränderungen waren im Unterschied zu den WT-Tieren stark reduziert (Abb. 25).

Für eine unabhängige und professionelle Auswertung wurden die Schnitte verblindet und randomisiert an Dr. Joachim Velden aus dem Institut für Pathologie übergeben. Die Auswertung erfolgte anhand eines Klassifikationssystems, das das Ausmaß der pathologischen Epithel- und Kryptenveränderungen erfasst. Dabei wurden Gewebeveränderungen jeweils auf einer Skala von 1 bis 5 bewertet und der Gesamtscore durch die Addition der Zahlenwerte errechnet (Tab. 9, Abb. 26). Gesundes Kolongewebe enthält keine entzündlichen Infiltrate und ist durch zahlreiche Becherzellen sowie durch intakte Kryptenstrukturen gekennzeichnet. Es nimmt gemäß des histologischen Scores den Wert 2 an.

**Tab. 9: Histologischer Score**

Epithel	Score	Krypten	Score
Normale Morphologie	1	Kein Infiltrat	1
Verlust von Becherzellen	2	Infiltrat im Bereich der Krypten	2
Verlust von Becherzellen (große Areale)	3	Infiltrat erreicht die Muscularis mucosae	3
Verlust von Krypten	4	Verdickung der Mukosa	4
Verlust von Krypten (große Areale)	5	Infiltrat in der Submukosa	5



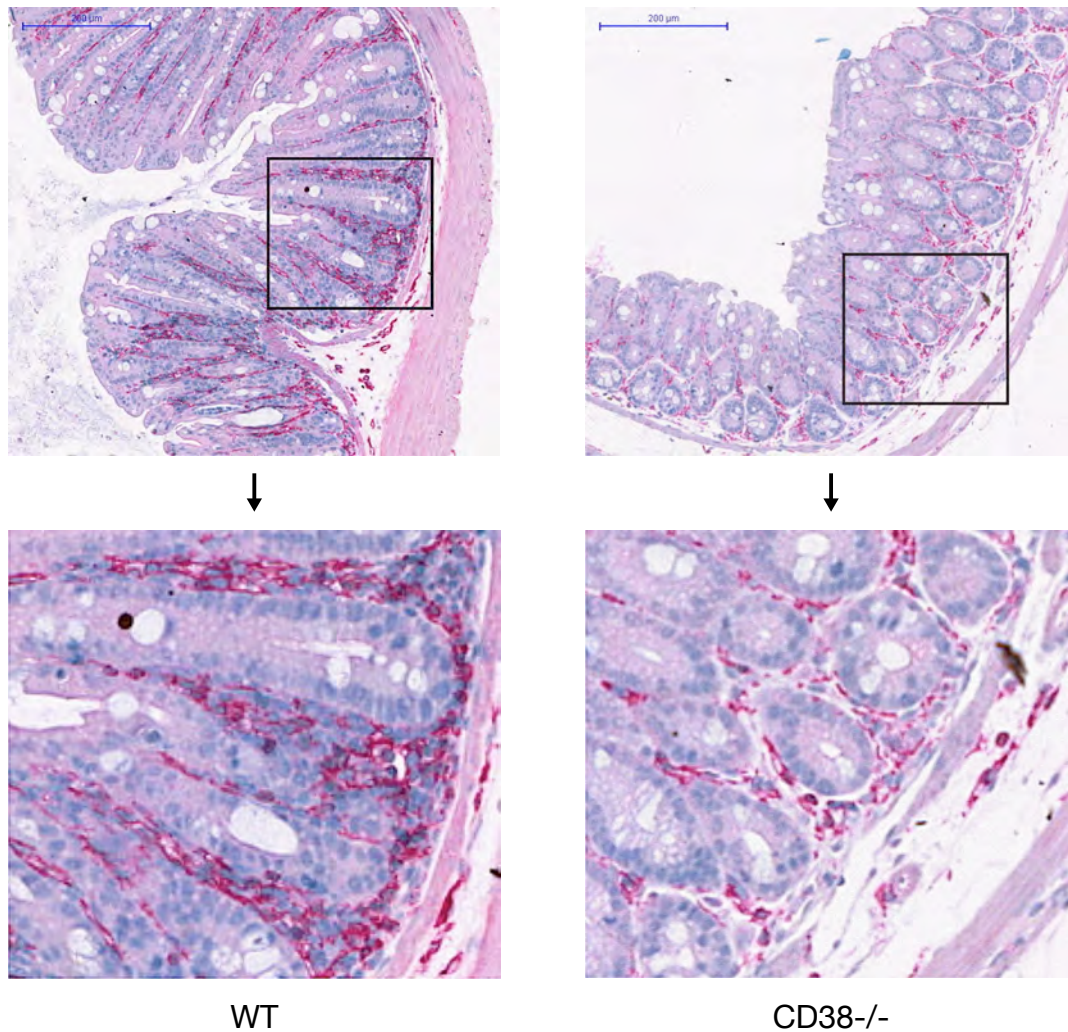
**Abb. 26: Auswertung des histologischen Scorings**

Bewertet wurden die H.E.-gefärbten Gewebeschnitte von Kolongewebe aus DSS-behandelten WT-, CD38<sup>-/-</sup> sowie ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren. Jede Versuchsgruppe bestand aus 6 Tieren. Dargestellt sind die Einzelergebnisse, der Balken markiert den Median. WT vs. CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,033$ , CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0078$ , CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>  $p=0,0509$  (ns). Die Befundung der Paraffinschnitte wurde von Dr. Joachim Velden aus dem Institut für Pathologie durchgeführt.

In unseren Versuchen zeigten WT-Tiere ein ausgeprägtes Entzündungsgeschehen, die Scoring-Werte streuten um einen Median von 8,5 (Abb. 26). Vergleichbare Ergebnisse ließen sich in ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren beobachten, bei denen der Median bei etwa 9 bzw. 9,5 lag; in diesen Tieren ließen sich ähnlich schwere pathologische Veränderungen nachweisen wie in WT-Tieren. CD38<sup>-/-</sup> Tiere fielen durch erheblich niedrigere Scoring-Werte auf. Bei höherer Streuung als in WT-Tieren lag der Median hier etwa bei 5,5, was auf ein deutlich reduziertes Entzündungsgeschehen in dieser Versuchsgruppe hinwies. Zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Scoring-Werte ( $p=0,033$ ), sowie auch zwischen CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren ( $p=0,0078$ ). Die Scoring-Werte bzw. Mediane von CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> Tieren unterschieden sich deutlich und reichten an das Signifikanzniveau heran ( $p=0,0509$ ). Die histologisch-pathologischen Befunde in den vier Versuchsgruppen korrelierten mit dem klinischen Erscheinungsbild der Versuchstiere.

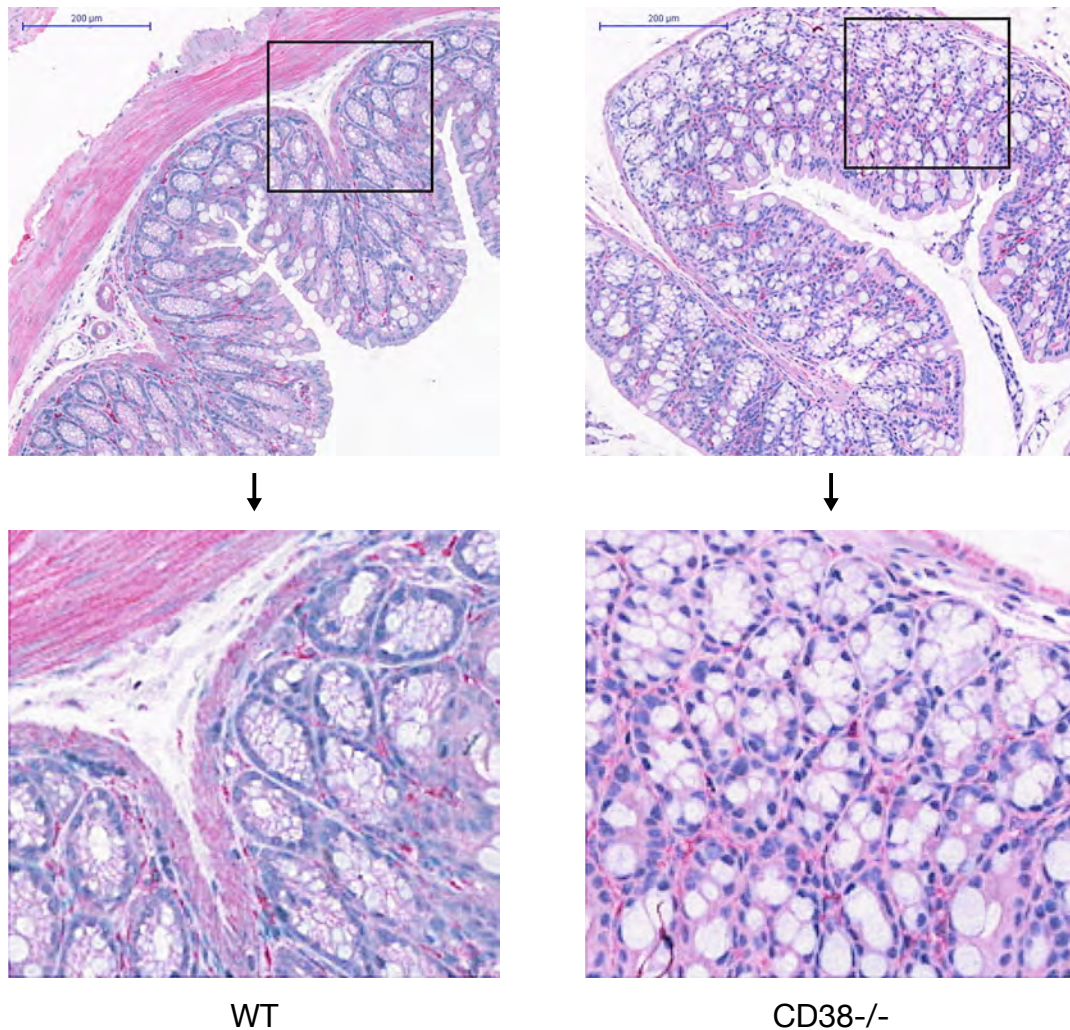
#### 4.2.4 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie wurden die Zellen der frühen Immunantwort anhand spezifischer Oberflächenmoleküle im Gewebeschnitt identifiziert. Makrophagen wurden jeweils über die Antigene F4/80 und Mac2, neutrophile Granulozyten über Ly6G detektiert. Zur Beurteilung der Lokalisation dieser Zellen innerhalb der Gewebearchitektur erfolgte eine Übersichtsfärbung mittels H.E. Es wurden sowohl gesunde als auch DSS-behandelte WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere untersucht.



**Abb. 27 A: Immunhistochemische Färbung von Monozyten und Makrophagen, DSS-behandelte Tiere**

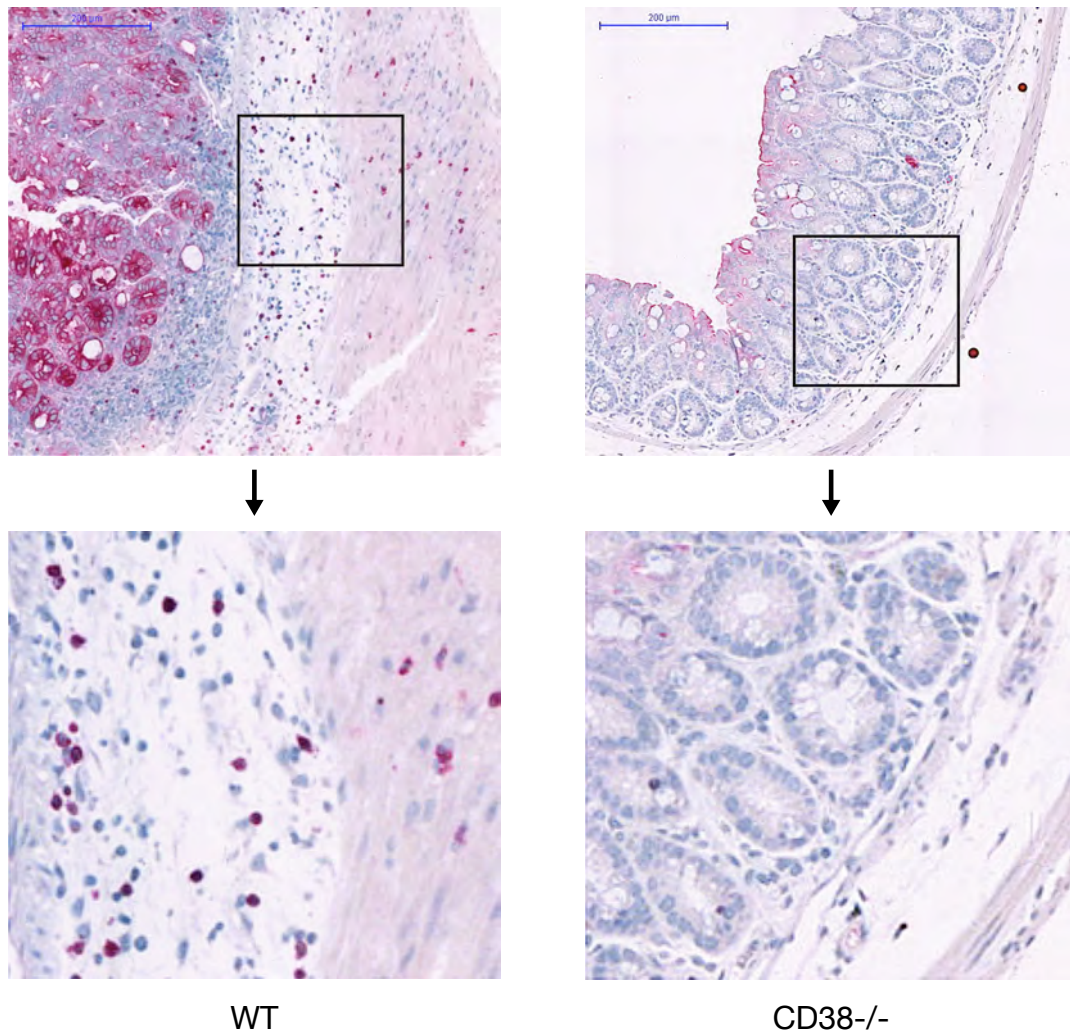
Monozyten und Makrophagen wurden mittels Antikörper-Färbung für das Antigen F4/80 detektiert. Die Vergrößerung beträgt 100x in der Übersicht und 300x in der Detailansicht. Durch die Verabreichung von 3% DSS im Trinkwasser für eine Dauer von 5 Tagen wurde die DSS-Kolitis induziert. Die Organe wurden an Tag 7 entnommen und eine Gewebeprobe aus dem mittleren Kolon zur anschließenden Einbettung in Formalin fixiert.



**Abb. 27 B: Immunhistochemische Färbung von Monozyten und Makrophagen, gesunde Tiere**

Organentnahme, Fixierung, F4/80- bzw. H.E.-Färbung und Vergrößerung entsprechend den Präparaten in Abb. 27 A. Dargestellt sind die Gewebe gesunder WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere.

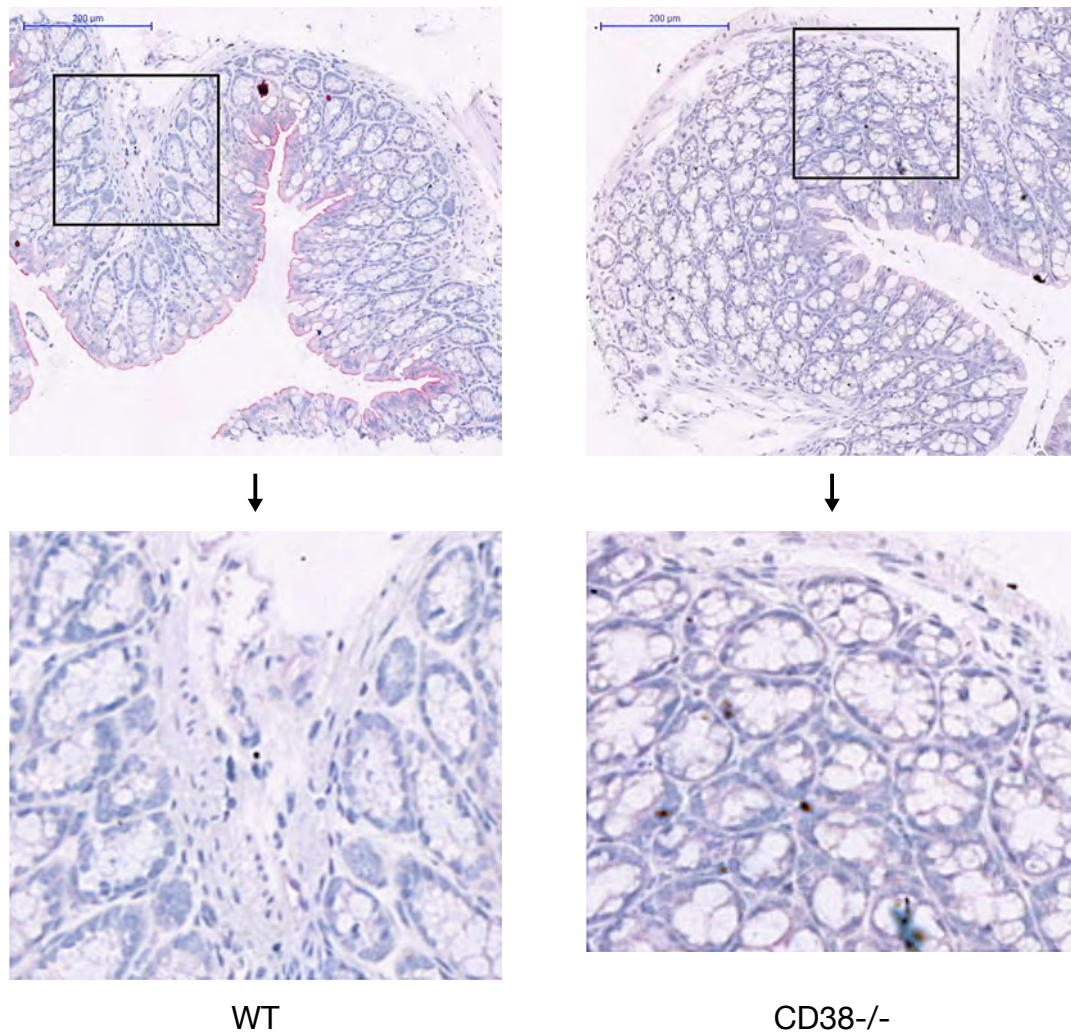
In unbehandelten Tieren waren weder in der WT- noch in der CD38<sup>-/-</sup> Versuchsgruppe größere Anzahlen an Makrophagen zu erkennen. In DSS-behandelten Tieren zeigte sich in der WT-Versuchsgruppe eine ausgeprägte Entzündung mit zahlreichen infiltrierenden Makrophagen, vor allem im Zottenstroma der Lamina propria und in der Submukosa. Auch in CD38<sup>-/-</sup> Tieren war ein Infiltrat von Makrophagen zu beobachten, allerdings war die Anzahl der Makrophagen hier deutlich geringer. Die Mac2-gefärbten Präparate zeigten ein vergleichbares Infiltrationsmuster wie die F4/80-gefärbten.



**Abb. 28 A: Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten, DSS-behandelte Tiere**

Granulozyten wurden mittels Antikörper-Färbung des Ly6G-Antigens detektiert. Bei dieser Färbung ist zu beachten, dass die epitheliale Glykokalyx auf der luminalen Oberfläche des Epithels eine sehr starke unspezifische Färbung zeigt. Die Vergrößerung beträgt 100x in der Übersicht und 300x in der Detailansicht. Durch die Verabreichung von 3% DSS im Trinkwasser für eine Dauer von 5 Tagen wurde die DSS-Kolitis induziert. Die Organe wurden an Tag 7 entnommen und eine Gewebeprobe aus dem mittleren Kolon zur anschließenden Einbettung in Formalin fixiert.





**Abb. 28 B: Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten, gesunde Tiere**

Organentnahme, Fixierung, Ly6G- bzw. H.E.-Färbung und Vergrößerung entsprechend den Präparaten in Abb. 28 A. Dargestellt sind die Gewebe gesunder WT- und CD38-/- Tiere.

Im gesunden Darmgewebe finden sich normalerweise kaum neutrophile Granulozyten. Die Rekrutierung der Granulozyten dagegen ist ein Charakteristikum akuter schwerer Entzündungen. In unseren Analysen konnten in naiven WT- und CD38-/- Tieren keine granulozytären Infiltrate ausgemacht werden. Dagegen wurde in DSS-behandelten WT-Tieren, die eine ausgeprägte Entzündung der Mukosa zeigten, eine massive Neutrophileninfiltration beobachtet. Im Kontrast dazu zeigten DSS-behandelte CD38-/- Tiere eine deutlich reduzierte Infiltration von Neutrophilen.

---

Die Beobachtungen an den immunhistochemisch gefärbten Präparaten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die DSS-Kolitis führte zu einer ausgeprägten Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie zu weiteren morphologischen Veränderungen. In unbehandelten Tieren war kein Unterschied zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren zu erkennen. Die pathologischen Veränderungen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren waren im Vergleich zu WT-Tieren stark abgeschwächt. Im Unterschied zu WT-Tieren zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere eine reduzierte entzündliche Infiltration von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Dieses Ergebnis korreliert weitgehend mit den anderen histopathologischen Befunden sowie mit den parallel erfassten klinischen Parametern.

#### 4.2.5 Expression von Zytokinen und Chemokinen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren

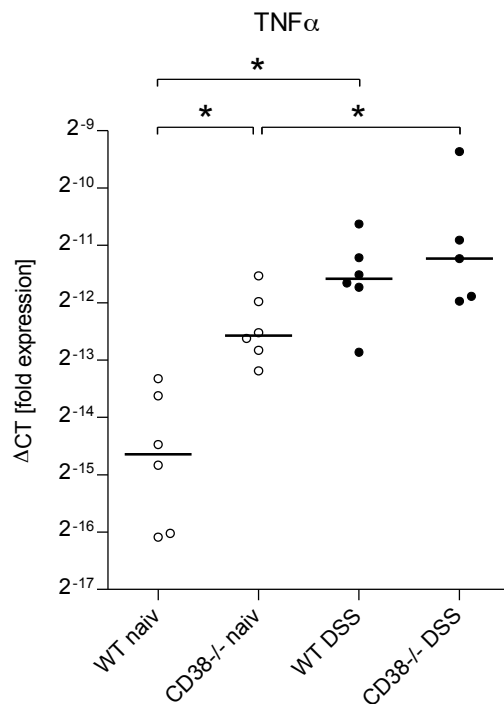
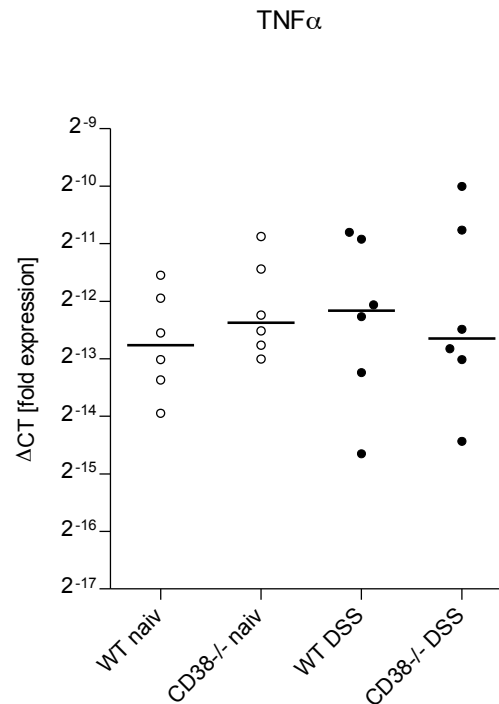
Entzündungsreaktionen sind durch die Synthese und Freisetzung zahlreicher Zytokine und Chemokine gekennzeichnet. Ihre Bestimmung erlaubt eine Quantifizierung der entzündlichen Vorgänge und Rückschlüsse auf beteiligte Zellpopulationen. In den folgenden Analysen sollten WT-, CD38<sup>-/-</sup>, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere im Hinblick auf die Synthese von Zytokinen und Chemokinen verglichen werden.

Bei der Initiation einer Immunantwort sind proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-6 und TNF $\alpha$  von großer Bedeutung. Die Rekrutierung von Leukozyten geschieht durch Chemokine der CC- und CXC-Gruppe. Neutrophile Granulozyten, die wichtigsten Zellen der frühen Immunantwort, werden in der Maus durch CXCL1 und CXCL2 chemotaktisch angezogen. Monozyten und Makrophagen werden hauptsächlich durch CCL1 und CCL2 rekrutiert. Für T-Zellen sind vor allem Chemokine, die die Rezeptoren CCR5 und CXCR3 aktivieren, wichtig, wie z.B. CCL5 (RANTES) und CXCL10 (Bromley et al. 2008).

Der experimentelle Nachweis von Zytokinen und Chemokinen auf Proteinebene ist schwierig, da viele Zytokine im Gewebe nur in geringen Konzentrationen vorliegen und oft im Rahmen der Reinigungsprozedur abgebaut werden. Für unsere Analysen wurde daher die Expression auf der mRNA-Ebene untersucht, die normalerweise eng mit der Transkription des entsprechenden Zytokins bzw. Chemokins korreliert. Da RNA sehr empfindlich gegenüber Degradation durch ubiquitär vorkommende RNAsen ist, wurden die Gewebeproben unmittelbar nach der Entnahme in Probenröhrchen mit Trizol gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Während des Reinigungsprozesses konnte die Stabilität der RNA durch das im Trizol enthaltene Detergenz Guanidinhydrochlorid und später durch RNase-Inhibitoren aufrechterhalten werden.

#### TNF $\alpha$ und IL-6

Die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 zählen zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen. Sie sind für Initiation und Unterhaltung entzündlicher Prozesse von großer Bedeutung. TNF $\alpha$  ist ein pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin, welches als Trimer in membranständiger und löslicher Form existiert. Über die Rezeptoren TNFR1 und TNFR2, die zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören, vermittelt TNF $\alpha$  immunstimulatorische Funktionen gegenüber Körperzellen und Zytotoxizität gegenüber entarteten Zellen. TNF $\alpha$  wird außer von Lymphozyten auch von Monozyten, Makrophagen und DCs im Verlauf von Entzündungen gebildet. Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung in akuten und chronischen Infektionen wurde es hier als Leitzytokin zur Quantifizierung der Entzündungsvorgänge verwendet (Beutler 1999, Aggarwal 2003).

**A Milz****B Darm****Abb. 29: Expression von TNF $\alpha$  in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Gezeigt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der TNF $\alpha$ -mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard, die Exponenten der y-Achse entsprechen der Zyklusdifferenz zum 18S-Standard. Die Messwerte wurden doppelt bestimmt und zu einem Wert pro Versuchstier zusammengefasst. Bei stark voneinander abweichenden Doppelwerten wurden beide von der Analyse ausgeschlossen. Der Balken markiert den Median. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben bestanden. Wenn dies der Fall war, wurde durch Anwendung des Mann-Whitney-Tests weiter ermittelt, zwischen welchen Versuchsgruppen die Unterschiede Signifikanz erreichten. In den folgenden Diagrammen (Abb. 29 - 36) wurden dabei sämtliche Kombinationen außer WT naïv vs. CD38 $^{-/-}$  DSS und CD38 $^{-/-}$  naïv vs. WT DSS analysiert. **A:** WT naïv vs. CD38 $^{-/-}$  naïv  $p=0,0173$ , WT naïv vs. WT DSS  $p=0,0022$ , CD38 $^{-/-}$  naïv vs. CD38 $^{-/-}$  DSS  $p=0,0173$ , WT DSS vs. CD38 $^{-/-}$  DSS  $p>0,05$ . **B:** Alle Analysen  $p>0,05$ .

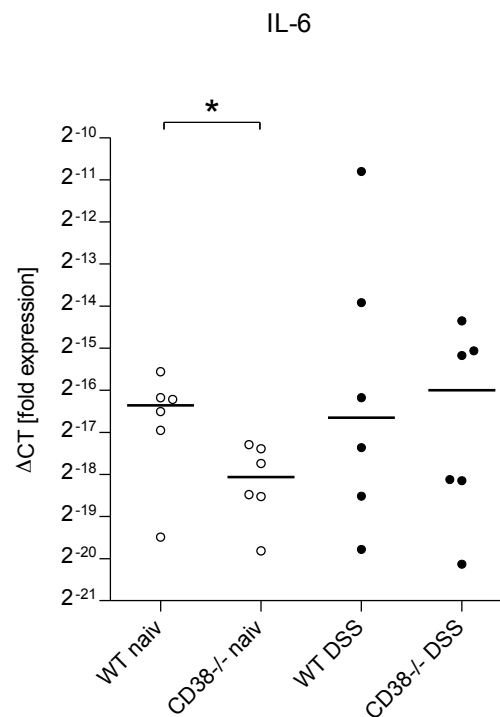
Die basale Expression wurde stets durch die Versuchsgruppe der unbehandelten WT-Tiere repräsentiert. In der Milz zeigten sich sowohl in gesunden als auch in DSS-behandelten Tieren jeweils in CD38 $^{-/-}$  Tieren höhere Expressionen von TNF $\alpha$  als in WT-Tieren (Abb. 29 A). In gesunden Tieren erreichte dieser Unterschied statistische Signifikanz. In unbehandelten CD38 $^{-/-}$  Tieren war die Expression etwa 4-fach gegen-

---

über dem Basalwert in unbehandelten WT-Tieren erhöht. Zwischen DSS-behandelten WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren zeigt sich ein geringer Expressionsunterschied, jeweils auf einem 6-fach erhöhten Level gegenüber der basalen Expression. Sowohl in WT-Tieren als auch in CD38<sup>-/-</sup> Tieren führte die DSS-Kolitis zu einer signifikanten Expressionssteigerung von TNF $\alpha$ .

Im Kolon lag die Expression in allen Versuchsgruppen auf vergleichbarem Level und war gegenüber der basalen Expression in Milzen unbehandelter WT-Tiere etwa 4-fach erhöht, ähnlich der Expression in den Milzen DSS-behandelter Tiere (Abb. 29 B). In gesunden Versuchsgruppen zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere ein leicht erhöhtes Expressionslevel gegenüber WT-Tieren. In DSS-behandelten Versuchsgruppen dagegen überwog in WT-Tieren die TNF $\alpha$ -Expression gegenüber der in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren. In allen Expressionsbestimmungen im Kolongewebe zeigte sich eine große Streuung der Werte. Keiner der Unterschiede erreichte statistische Signifikanz. Die DSS-Behandlung schien nur eine geringe Induktion von TNF $\alpha$  im Darm zur Folge zu haben.

IL-6 ist wie TNF $\alpha$  ein universelles, proinflammatorisches Zytokin, das bereits in der Frühphase von Infektionen und Entzündungsprozessen freigesetzt wird. Insbesondere Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten synthetisieren IL-6. Es dient auch als globaler und schneller Entzündungsmarker, dessen Anstieg proportional zur Schwere der Entzündung erfolgt. Wichtige systemische Wirkungen von IL-6 sind die Induktion von Fieber sowie die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. Auf zellulärer Ebene stimuliert IL-6 die Differenzierung von B-Zellen, die Synthese von Antikörpern und den Ig-Klassenwechsel. IL-6 unterstützt die Differenzierung von Vorläuferzellen im Knochenmark und spielt zusammen mit TGF $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Reifung von T<sub>H</sub>17-Zellen (Kishimoto et al. 1992, Zhou et al. 2007).



**Abb. 30: Expression von IL-6 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Im Punktdiagramm ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der IL-6-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard dargestellt. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergab den repräsentativen Messwert des Tieres. Der Balken markiert den Median. WT naive vs. CD38<sup>-/-</sup> naive  $p=0,0411$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

In der Milz war die IL-6-mRNA weder in unbehandelten noch in behandelten WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren sicher nachweisbar. Diese Beobachtung ist zumindest für die Ergebnisse unbehandelter Tiere plausibel, da der universelle Entzündungsmodulator IL-6 im gesunden Organismus nur sehr schwach exprimiert wird. In der Real-Time PCR stieg zwar auch für gesunde Gewebe die IL-6-Amplifikation über den Hintergrund an, allerdings erst jenseits des 38. Zyklus, so dass hier eine spezifische Detektion von IL-6-Transkript fraglich ist.

Gesunde WT-Tiere exprimierten in der Mukosa des Kolons IL-6 auf einem vergleichbaren Level wie DSS-behandelte WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere, wobei in DSS-behandelten Tieren erheblich größere Streuungen auftraten (Abb. 30). In gesunden CD38<sup>-/-</sup> Tieren wurde eine etwa um den Faktor vier verminderte Expression von IL-6 beobachtet; hier bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zu gesunden WT-Tieren. Während in

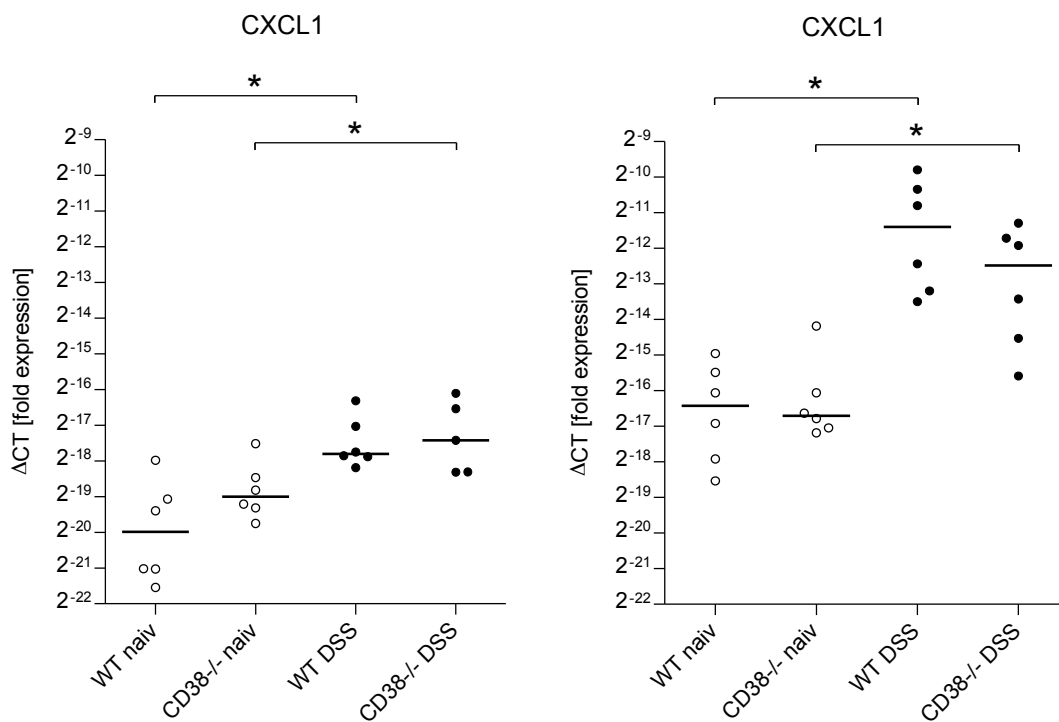
gesunden Tieren CD38 Auswirkungen auf die Expression von IL-6 zu haben schien, zeigten die Ergebnisse für DSS-behandelte Tiere kaum Unterschiede zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Versuchsgruppen.

### CXCL1 und CXCL2

Die wichtigsten Chemokine für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sind vor allem CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 (IL-8). Diese Chemokine werden auf inflammatorische Stimuli hin vor allem von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert. Die drei erstgenannten werden auch unter dem Begriff der GRO-Chemokine (Growth Regulated Protein) zusammengefasst; sie wirken auf die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Über diese Rezeptoren werden neben neutrophilen auch basophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert (Baggiolini et al. 1997).

#### **A Milz**

#### **B Darm**



**Abb. 31: Expression von CXCL1 in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der CXCL1-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergab den Wert, der jedes Tieres repräsentiert. Der Balken markiert den Median. **A:** WT naiv vs. WT DSS  $p=0,0043$ , CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0173$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ . **B:** WT naiv vs. WT DSS  $p=0,0022$ , CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0087$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

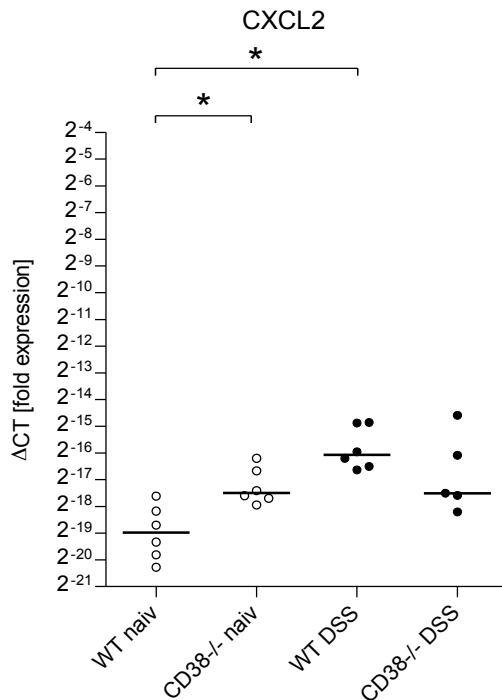
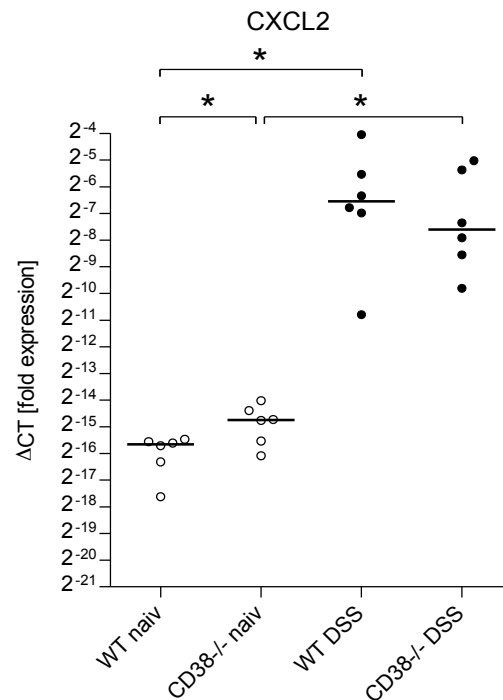
---

Im Milz- wie im Darmgewebe wurde eine generell erhöhte CXCL1-Expression in DSS-erkrankten Tieren im Vergleich zu gesunden Tieren beobachtet (Abb. 31 A). Das Ausmaß dieser Expressionssteigerung durch die DSS-Kolitis war in beiden Geweben statistisch signifikant. In der Milz zeigten gesunde CD38<sup>-/-</sup> Tiere verglichen mit der basalen Expression in gesunden WT-Tieren eine um das Doppelte erhöhte Expression von CXCL1. In DSS-behandelten Tieren stieg die Expression dagegen auf das 6- bzw. 8-fache der basalen Expression in WT- bzw. CD38<sup>-/-</sup> Tieren. Sowohl in gesunden als auch in erkrankten Tieren ließ sich bei CD38<sup>-/-</sup>-Tieren jeweils eine gering höhere Expression als in entsprechenden WT-Tieren beobachten. Insgesamt zeigten die Messwerte eine geringe Streuung.

Im Darm fiel eine ausgeprägte CXCL1-Induktion in DSS-behandelten Tieren auf (Abb. 31 B). Für beide Versuchsgruppen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und erkrankten Tieren. Mit Blick auf den Median bedeutete dies eine etwa 20-fache Expressionssteigerung durch DSS-Behandlung. In DSS-behandelten Tieren war in den CD38<sup>-/-</sup> Tieren die Expression gegenüber WT-Tieren reduziert. Verglichen mit der basalen Expression in der Milz gesunder Tiere war im Darm gesunder Tiere die Expression von CXCL1 um den Faktor 10 erhöht, was mit den unterschiedlichen mikrobiologischen Umgebungen der Organe zusammenhängen könnte. Die Messergebnisse zeigten im Darm eine größere Streuung als in der Milz.

Ein ähnliches Expressionsmuster wie CXCL1 zeigte auch CXCL2 (Abb. 32 A). In der Milz lag die Expression von CXCL2 in gesunden WT-Tieren auf niedrigem Level, während bereits in gesunden CD38<sup>-/-</sup> Tieren eine signifikante Erhöhung der Expression zu beobachten war (Abb. 32 A). Unter den DSS-behandelten Tieren zeigten dagegen die WT-Tiere eine höhere CXCL2-Expression als CD38<sup>-/-</sup> Tiere. In WT-Tieren führte die DSS-Kolitis zu einer signifikanten Steigerung der Expression von CXCL2, in CD38<sup>-/-</sup> Tieren dagegen lagen gesunde und DSS-behandelte Tiere bei geringer Streuung etwa auf gleichem Expressionslevel.



**A Milz****B Darm****Abb. 32: Expression von CXCL2 in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden für 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Das Punktdiagramm demonstriert die relative Expression ( $\Delta$ CT) der CXCL2-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergibt den Wert, der jedes Tieres repräsentiert. Der Balken markiert den Median.

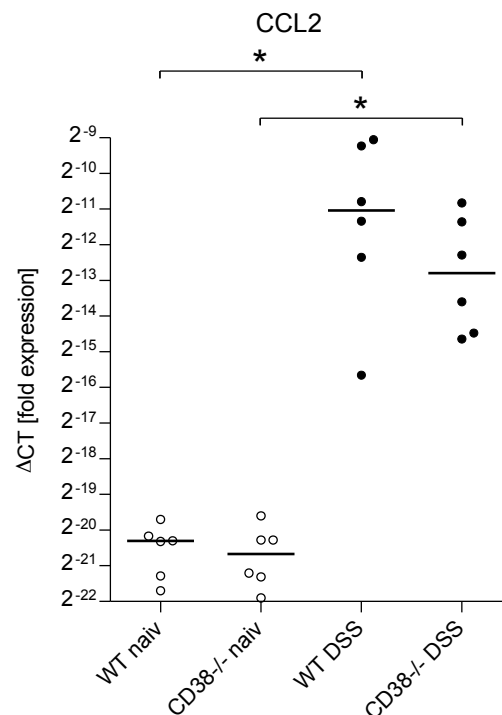
**A:** WT naive vs. CD38<sup>-/-</sup> naive  $p=0,0087$ , WT naive vs. WT DSS  $p=0,0022$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ . **B:** WT naive vs. CD38<sup>-/-</sup> naive  $p=0,0411$ , WT naive vs. WT DSS  $p=0,0022$ , CD38<sup>-/-</sup> naive vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0022$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

Im Darm war ein ähnliches Verhältnis zwischen gesunden WT- und CD38<sup>-/-</sup>-Tieren zu beobachten: Naive WT-Tiere exprimierten ein niedriges Zytokinlevel, während in naiven CD38<sup>-/-</sup>-Tieren etwa die doppelte Expression gemessen wurde; ein Unterschied von statistischer Signifikanz (Abb. 32 B). Die basale Expression in gesunden WT-Tieren war im Kolon um das 10-fache gegenüber der Milz erhöht. Signifikante Unterschiede bestanden im Vergleich von gesunden zu DSS-behandelten Tieren, sowohl in WT- als auch in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren. Die Induktion der DSS-Kolitis führte bei WT-Tieren zu einer Expressionssteigerung im Median etwa um den Faktor 500, in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren dagegen im Median um den Faktor 250. Wie in anderen Versuchsgruppen streuten auch hier die Werte in DSS-behandelten Tieren stärker als in gesunden Tieren.

Mit CXCL1 und CXCL2 zeigten zwei wichtige Chemokine für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Darm eine signifikant erhöhte Expression in DSS-behandelten Tieren im Vergleich zu naiven Tieren. Für beide Chemokine konnte jeweils eine verminderte Expression in CD38<sup>-/-</sup> Tieren gegenüber WT-Tieren im Darm DSS-behandelter Tiere beobachtet werden. In der Immunhistochemie war in den DSS-behandelten Tieren eine ausgeprägte granulozytäre Infiltration sichtbar (Abb. 28 A). Diese Entzündungszeichen waren in CD38<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu WT-Tieren ebenfalls reduziert. Die Beobachtungen der Immunhistochemie waren kohärent mit den Ergebnissen der Real-Time PCR bezüglich der Expression von CXCL1 und CXCL2.

### CCL2

CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1) ist ein wichtiger Vertreter einer Klasse von Chemokinen, die vor allem Monozyten und Makrophagen anlocken. CCL2 wird von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten synthetisiert. Der entsprechende Rezeptor CCR2 wird auf Monozyten, DCs, aktivierten T-Zellen, aber auch von eosinophilen und basophilen Granulozyten exprimiert (Rollins 2000). Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kann im Darmgewebe eine erhöhte Expression von CCL2 beobachtet werden (Grimm et al. 1996).



**Abb. 33: Expression von CCL2 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Dar-

---

gestellt ist die Expression ( $\Delta$ CT) der CCL2-mRNA in Relation zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergab den Wert, der jedes Tier repräsentiert. Der Balken markiert den Median. WT naiv vs. WT DSS  $p=0,0022$ , CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0022$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

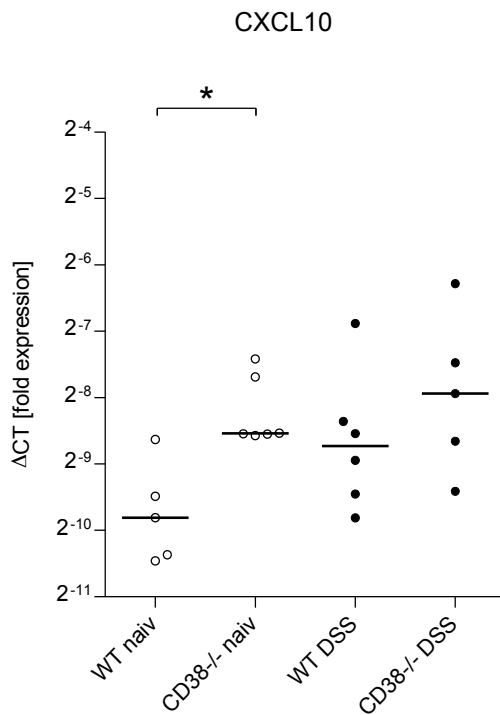
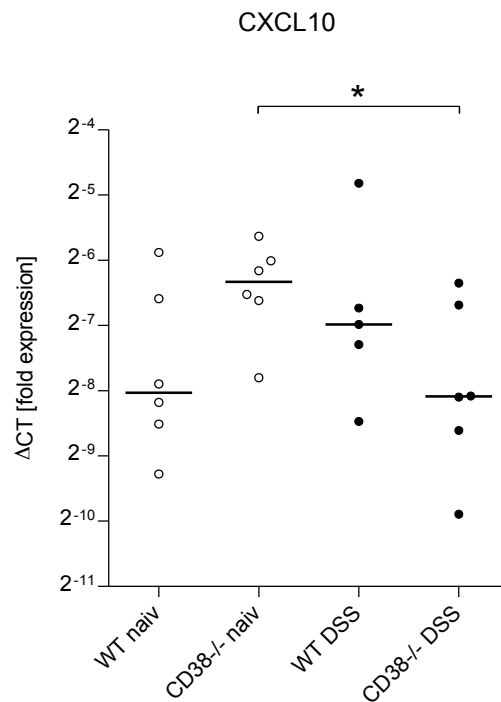
Naive WT-Tiere zeigten auf sehr niedrigem Level vergleichbare Expressionen von CCL2 in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren mit jeweils geringer Streuung (Abb. 33). Im Vergleich naiver vs. DSS-behandelter WT-Tiere imponierte ein Expressionsanstieg nahezu um den Faktor 1000 in der DSS-behandelten Gruppe. In DSS-behandelten CD38<sup>-/-</sup> Tieren war die Expression gegenüber dem basalen Level nur um das ca. 250-fache erhöht, was einem Viertel des Wertes DSS-behandelter WT-Tiere entsprach. In WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren bestanden zwischen naiven und DSS-behandelten Tieren hochsignifikante Unterschiede.

Die hohe Expression von CCL2 in DSS-behandelten Tieren, verglichen mit unbehandelten Tieren, reflektierte die Infiltration zahlreicher Makrophagen in das entzündete Gewebe (Abb. 27). Gesunde Tiere wiesen wenige ortsständige Makrophagen auf und exprimierten CCL2 nur in sehr geringem Umfang.

### CXCL10

Das inflammatorische Chemokin CXCL10 (IP-10, IFN $\gamma$  Inducible Protein) ist neben CXCL9 und CXCL11 ein Ligand des CXCR3. Über diesen Rezeptor werden in erster Linie T<sub>H</sub>1-Zellen und NK-Zellen sowie Monozyten rekrutiert. Beim Menschen spielt CXCL10 eine Rolle im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Es wird z.B. bei Morbus Crohn verstärkt in der Mukosa exprimiert (Grimm und Doe 1996, Loetscher et al. 1996).

Eine deutliche Expressionssteigerung von CXCL10 durch die DSS-Behandlung war weder in der Milz noch im Kolon zu beobachten (Abb. 34). In der Milz zeigte sich ein leichter Expressionsanstieg in unbehandelten CD38<sup>-/-</sup> Tieren und DSS-behandelten Tieren gegenüber der basalen Expression in unbehandelten WT-Tieren. Zwischen gesunden WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren bestand ein signifikanter Expressionsunterschied.

**A Milz****B Darm****Abb. 34: Expression von CXCL10 in Milz und Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

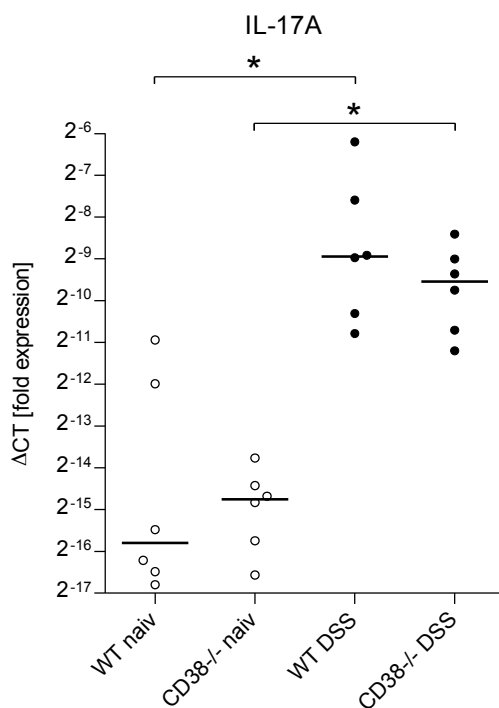
Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Im Punktdiagramm ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der CXCL10-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard dargestellt. Die Messungen wurden jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt, die dargestellten Einzelwerte zeigen die jeweilige Zusammenfassung. Der Balken markiert den Median. **A:** WT naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> naiv  $p=0,0043$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ . **B:** CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,026$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

Im Darm (Abb. 34 B) war in unbehandelten WT-Tieren die Expression gegenüber der basalen Expression in der Milz um etwa das 4-fache gesteigert. Damit entsprach die basale Expression im Kolon der in der Milz erkrankter Tiere. Im Kolon unterschieden sich die Mediane bei mäßiger Streuung nur wenig: In unbehandelten Tieren zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere eine erhöhte Expression gegenüber WT-Tieren, in behandelten Tieren dagegen eine erniedrigte Expression. Dabei zeigten gesunde CD38<sup>-/-</sup> Tiere signifikant höhere Expressionswerte als DSS-behandelte CD38<sup>-/-</sup> Tiere.

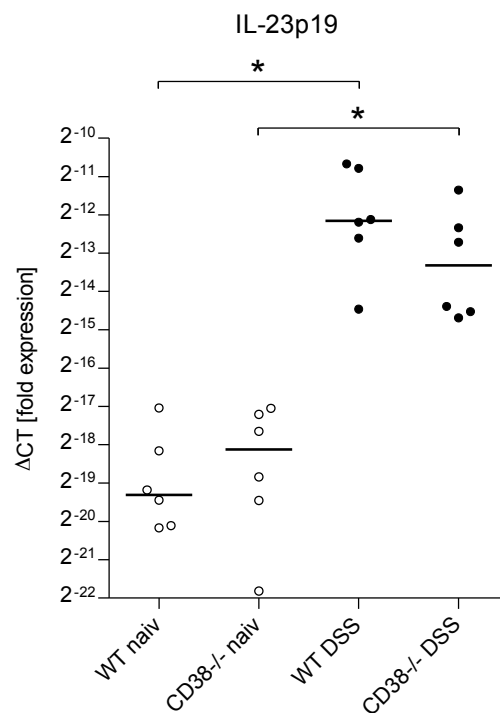
## IL-17A und IL-23p19

IL-17A ist das Leitzytokin der  $T_H17$ -Zellen und ein effektiver Verstärker der akuten inflammatorischen Antwort. IL-17A induziert in Zellen wie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen die Bildung von IL-6, CXCL2, CXCL8, G-CSF, GM-CSF. Die Folge ist eine Stimulation des Knochenmarks und eine vermehrte chemotaktische Rekrutierung vor allem von Neutrophilen. IL-17A wird neben  $T_H17$ -Zellen auch von anderen Lymphozyten, etwa von  $\gamma\delta T$ -Zellen synthetisiert (McKenzie et al. 2006, O'Shea et al. 2008).

### A Darm



### B Darm



**Abb. 35: Expression von IL-17A und IL-23p19 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Das Diagramm zeigt die relative Expression ( $\Delta CT$ ) der IL-17A- und IL-23p19-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung der Proben, die Zusammenfassung ergibt den Wert, der jedes Tier repräsentiert. Der Balken markiert den Median. **A:** WT naiv vs. WT DSS  $p=0,0022$ , CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0022$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ . **B:** WT naiv vs. WT DSS  $p=0,0022$ , CD38<sup>-/-</sup> naiv vs. CD38<sup>-/-</sup> DSS  $p=0,0022$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

---

Im Experiment fiel zunächst die gesteigerte Expression von IL-17A und von IL-23p19 auf, die in DSS-behandelten WT- und CD38<sup>-/-</sup>-Tieren im Darm auftritt. Diese Expressionssteigerung erreichte für beide Zytokine in beiden Tiergruppen statistische Signifikanz (Abb. 35). In unbehandelten WT-Tieren zeigte sich eine schwache Expression von IL-17A, während in unbehandelten CD38<sup>-/-</sup>-Tieren die Expression auf das Doppelte gesteigert war. In DSS-behandelten WT-Tieren stieg die Expression etwa auf das 120-fache des basalen Werts. Erkrankte CD38<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten eine gegenüber erkrankten WT-Tieren um die Hälfte verringerte Expression (Abb. 35 A). IL-17A und IL-23p19 wurden in der Milz nicht bestimmt.

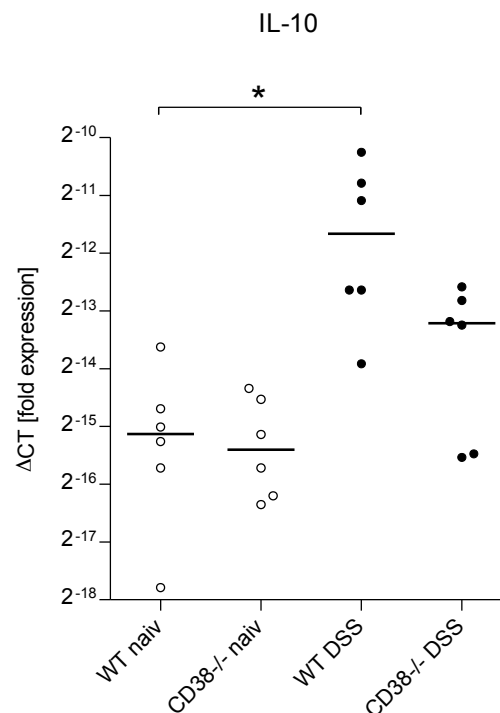
IL-23 ist ein essentieller Differenzierungs- und Überlebensfaktor für T<sub>H</sub>17 Zellen und wird überwiegend von DCs synthetisiert. Dieses Zytokin hat eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener akuter und chronischer Entzündungsreaktionen. IL-23 ist ein Heterodimer und besteht aus der p40- und p19-Kette. Die gleiche p40-Untereinheit bildet aber auch mit einer p35-Untereinheit das Zytokin IL-12 (Oppmann et al. 2000). In unseren PCR-Experimenten wurde daher die Expression der IL-23p19-mRNA gemessen.

IL-23p19 zeigte wie auch IL-17A ein niedriges Expressionslevel im Kolon gesunder WT-Tiere (Abb. 35 B). Gegenüber diesem basalen Expressionslevel wurde die IL-23p19-mRNA in gesunden CD38<sup>-/-</sup>-Tieren etwa in doppelter Menge exprimiert, bei insgesamt geringer Streuung der Werte. In beiden DSS-behandelten Tiergruppen war die Expression signifikant erhöht, in WT-Tieren etwa um den Faktor 200 gegenüber dem basalen Expressionslevel. Mit Blick auf den Median zeigte sich bei IL-23p19 wie auch bei IL-17A eine etwa um die Hälfte verminderte Expression in DSS-behandelten CD38<sup>-/-</sup>-Tieren, verglichen mit WT-Tieren.

Für IL-17A und IL-23p19 lässt sich zusammenfassen, dass die beiden funktionell miteinander verbundenen Zytokine in DSS-behandelten Tieren signifikant höhere Expressionslevel zeigten als in gesunden Tieren. Die Expression beider Zytokine war in DSS-behandelten CD38<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu entsprechend behandelten WT-Tieren geringer ausgeprägt.

## IL-10

IL-10 ist ein immunsuppressives Zytokin; es wirkt v.a. auf Makrophagen, neutrophile Granulozyten, T- und B-Zellen sowie DCs. IL-10 hemmt die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  sowie von Chemokinen wie CCL2, CXCL1 und CXCL10. Weiterhin supprimiert IL-10 die Antigenpräsentation von professionellen APCs sowie zellvermittelte Immunantworten. Schließlich kann IL-10 humorale Antworten verstärken. Insbesondere regulatorische T-Zellen und Makrophagen synthetisieren dieses Zytokin (Moore et al. 2001).



**Abb. 36: Expression von IL-10 im Darm gesunder vs. DSS-behandelter Tiere**

Je 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Gezeigt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der IL-10-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung der Proben, die Zusammenfassung ergibt den dargestellten Einzelwert. Der Balken zeigt den Median. WT naive vs. WT DSS  $p=0,0043$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

Im Experiment wurde die IL-10-mRNA im Kolon gesunder WT- und CD38<sup>-/-</sup>-Tiere auf einem vergleichbaren Level mit einer minimal verringerten Expression in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren exprimiert (Abb. 36). In beiden Gruppen DSS-behandelter Tiere wurde eine Induktion der IL-10-mRNA beobachtet. Wie in gesunden Tieren wurden in DSS-behandelten CD38<sup>-/-</sup>-Tieren geringere IL-10-Expressionswerte als in WT-Tieren gemessen. Im Ver-

---

gleich DSS-behandelt vs. unbehandelt ergaben sich in den erkrankten WT-Tieren ein etwa 8-facher, signifikant ausfallender Expressionsanstieg, und ein etwa 3-facher Expressionsanstieg in den CD38<sup>-/-</sup> Tieren.

Generell führte die Induktion der DSS-Kolitis zu einem hohen Expressionsanstieg der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CCL2 sowie der Zytokine IL-17A, IL-23p19 und IL-10 im Kolon. Für diese Zytokine und Chemokine waren die Expressionslevel in behandelten CD38<sup>-/-</sup> Tieren geringer als in WT-Tieren. In der Milz waren, sofern nachweisbar, die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren weniger stark ausgeprägt. Erstaunlicherweise konnten wir für die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 sowie für das Chemokin CXCL10 in beiden Tierstämmen keine deutlichen Unterschiede zwischen gesunden und DSS-behandelten Tieren nachweisen.

#### 4.2.6 Expression von Zytokinen und Chemokinen in ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren

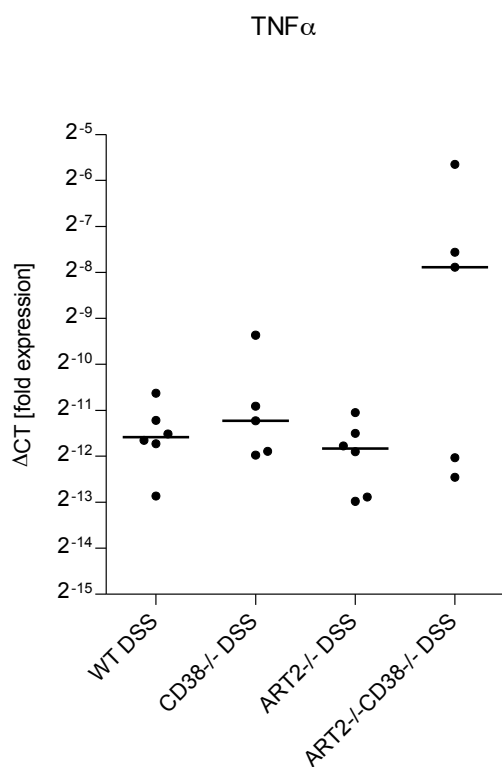
Neben WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren wurden auch ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere bezüglich der Zytokinsynthese analysiert. Diese Tiere wurden allerdings nur im Vergleich mit DSS-behandelten, nicht mit unbehandelten Tieren untersucht. Dieser Vergleich ist insofern interessant, weil eine postulierte regulatorische Funktion von extrazellulärem NAD<sup>+</sup> auf der Gegenwart und Funktion von ART2 beruht. Demnach könnte NAD<sup>+</sup> über ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung des Purinrezeptors P2X7 die Apoptose von T-Zellen auslösen.

Die DSS-behandelten ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere stammten aus demselben Versuch wie die DSS-behandelten Tiere der oben dargestellten Ergebnisse; sie erhielten vor der Organentnahme ebenfalls zunächst 5 Tage DSS-Trinkwasser und anschließend 2 Tage normales Trinkwasser. Zum Vergleich werden die Ergebnisse von WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren aus diesem Versuch erneut gezeigt.

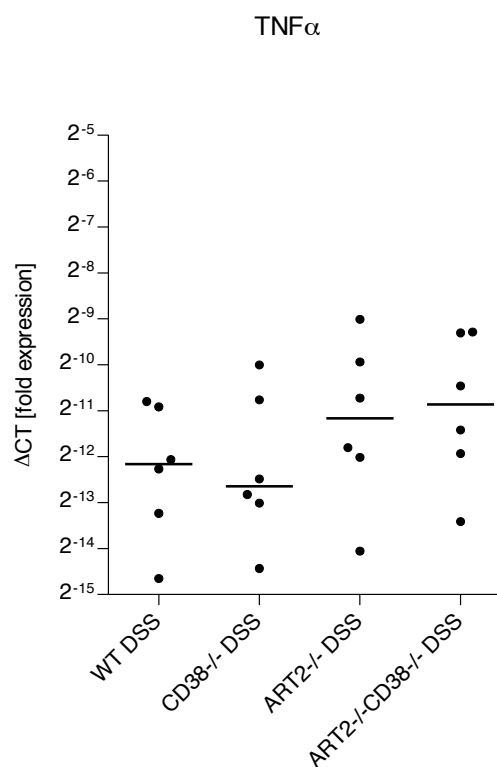


TNF $\alpha$ 

## A Milz



## B Darm

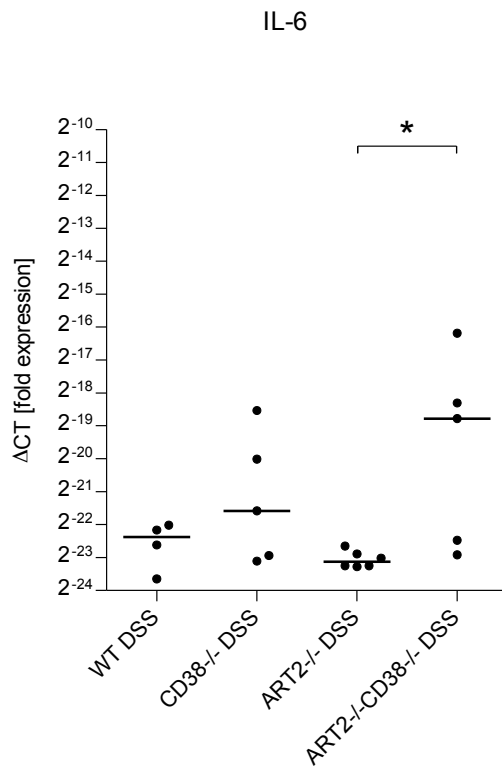
**Abb. 37: Expression von TNF $\alpha$  in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der TNF $\alpha$ -mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergibt den Messwert des einzelnen Tieres. Der Balken markiert den Median. In den folgenden Diagrammen (Abb. 37 - 44) wurden, abhängig vom Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests, die Einzelergebnisse sämtlicher Gruppen durch Anwendung des Mann-Whitney-Tests verglichen. **A:** Alle Analysen  $p > 0,05$ . **B:** Alle Analysen  $p > 0,05$ .

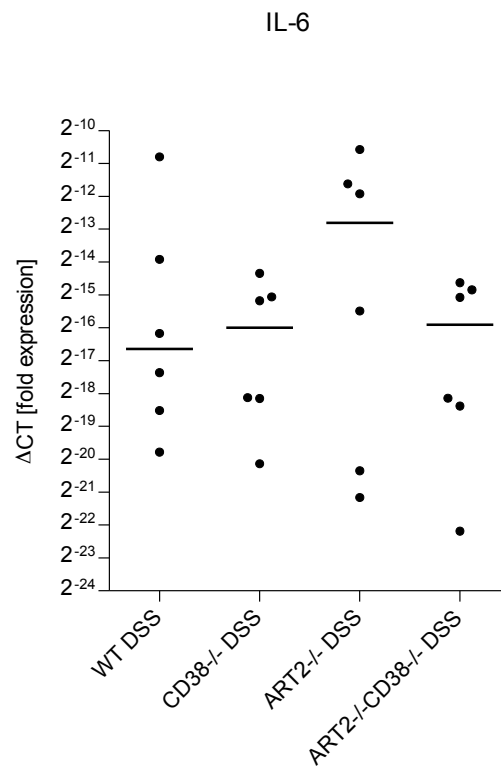
TNF $\alpha$  wurde in der Milz in WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> Tieren auf einem ähnlichen Level und mit geringer Streuung exprimiert (Abb. 37 A). Die ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten dagegen eine große Streuung der Messwerte, der Median lag erheblich höher als in WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> Tieren. Im Darm konnten bei hoher Streuung der Messwerte annähernd vergleichbare Expressionslevel in allen Versuchsgruppen beobachtet werden, die auf ähnlichem Niveau wie in der Milz lagen (Abb. 37 B). Zwischen den Medianen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

## IL-6

## A Milz



## B Darm

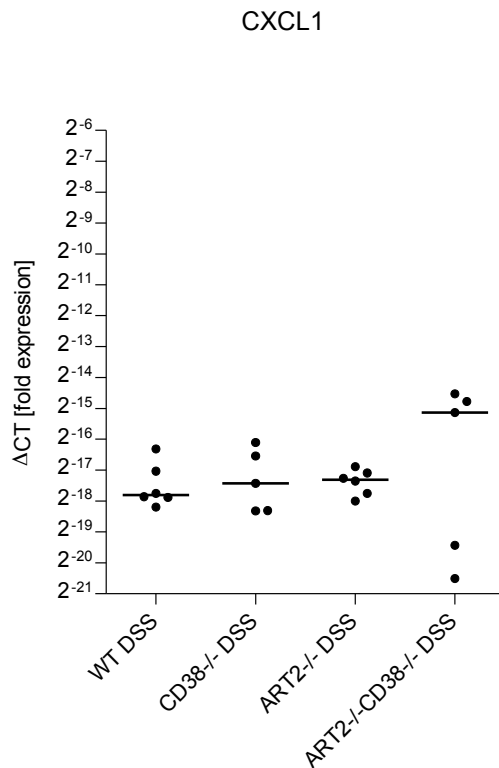
**Abb. 38: Expression von IL-6 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Das Diagramm präsentiert die relative Expression ( $\Delta$ CT) der IL-6-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt, die Zusammenfassung ergibt die dargestellten Mittelwerte. Der Balken markiert den Median. **A:** ART2<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0173$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ . **B:** Alle Analysen  $p>0,05$ .

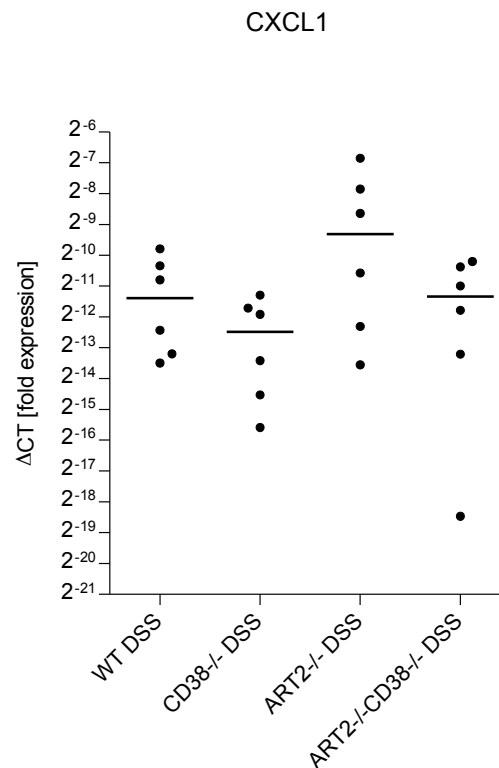
IL-6 wurde in der Milz in WT- und ART2<sup>-/-</sup> Tieren auf niedrigem Niveau exprimiert, in CD38<sup>-/-</sup> Tieren lag der Median bei größerer Streuung der Werte etwas höher (Abb. 38 A). In ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren konnten zum Teil hohe Expressionswerte im Vergleich zu WT-Tieren gemessen werden, der Median lag auf einem 8-fach höheren Level als bei WT-Tieren. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten allerdings auch eine hohe Streuung. Zwischen ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren bestand ein signifikanter Unterschied. Die IL-6-Expression unterlag im Darm in allen Versuchsgruppen erheblichen Streuungen (Abb. 38 B). Die Mediane befanden sich insgesamt höher als in der Milz. Sie lagen im Darm für WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere auf ähnlichem Level, für ART2<sup>-/-</sup> Tiere etwa 4-fach höher. Keiner der Unterschiede erreichte Signifikanz.

## CXCL1

## A Milz



## B Darm

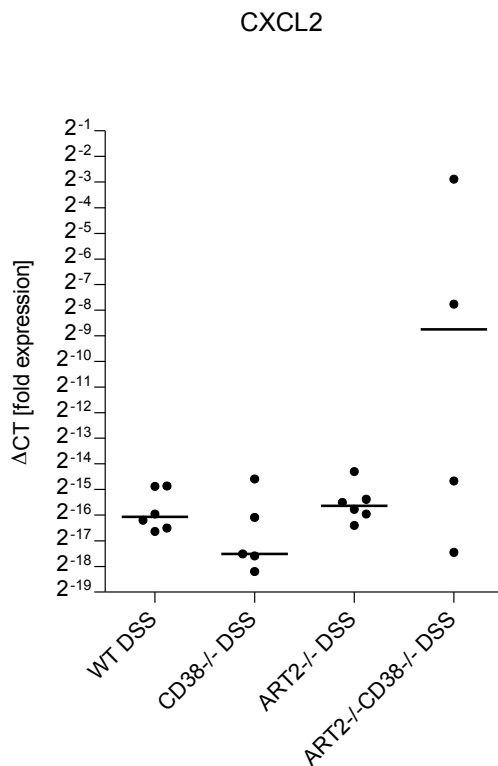
**Abb. 39: Expression von CXCL1 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Gezeigt ist, im Verhältnis zum 18S-Standard, die relative Expression ( $\Delta CT$ ) der CXCL1-mRNA. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergibt den Messwert des einzelnen Tieres. Der Balken markiert den Median. **A:** Alle Analysen  $p > 0,05$ . **B:** Alle Analysen  $p > 0,05$ .

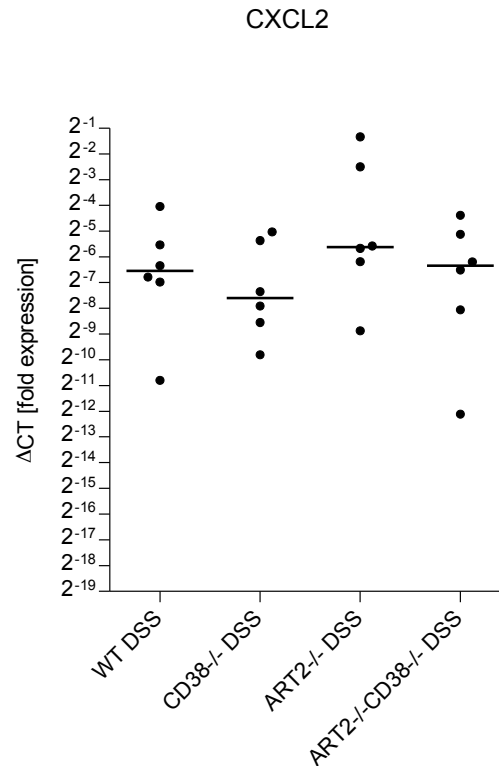
Das Chemokin CXCL1 wurde in der Milz in WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> Tieren auf vergleichbar niedrigem Niveau exprimiert, einzig in ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren war die Expression im Median erhöht. Allerdings streuten in letztgenannter Gruppe die Messwerte auch stärker (Abb. 39 A). Im Darm zeigten WT-Tiere eine etwa 90-fach erhöhte CXCL1-Expression verglichen mit der in der Milz beobachteten. Auf gleichem Niveau lag im Darm die Expression in ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren. Dagegen zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere eine leicht reduzierte, ART2<sup>-/-</sup> Tiere eine erhöhte IL-6-Expression. Der Verlust von ART2 und CD38 zusammen hatte im Darm zur Folge, dass IL-6 geringer exprimiert wurde als im Falle des alleinigen ART2 Knockouts (Abb. 39 B).

## CXCL2

## A Milz

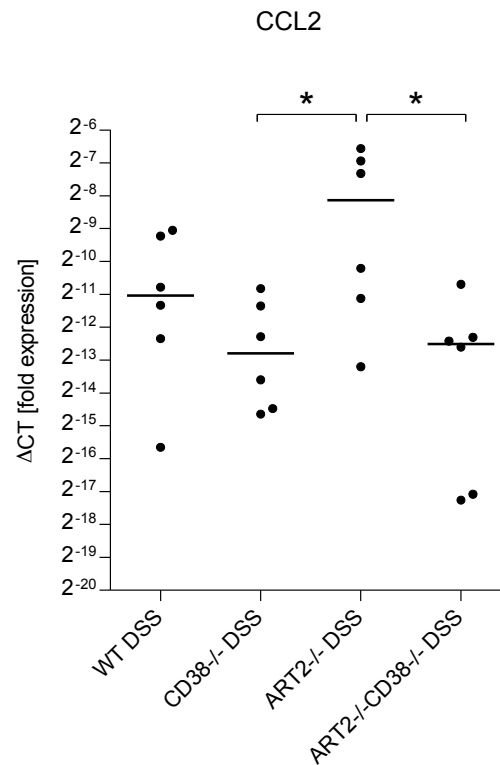


## B Darm

**Abb. 40: Expression von CXCL2 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta CT$ ) der CXCL2-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergibt den Messwert des einzelnen Tiers. Der Balken repräsentiert den Median. **A:** Alle Analysen  $p > 0,05$ . **B:** Alle Analysen  $p > 0,05$ .

In der Milz wurde CXCL2 in WT- und ART2<sup>-/-</sup> Tieren auf geringem Level exprimiert, in CD38<sup>-/-</sup> Tieren lag der Median etwas niedriger. Eine sehr hohe Streuung zeigten die Messwerte in ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren. Der Median lag deutlich höher als in den anderen Versuchsgruppen; die Unterschiede waren nicht signifikant ausgeprägt (Abb. 40 A). Für den Darm war zunächst die generelle Steigerung des Expressionslevels auffällig. Verglichen mit der Milz aus WT-Tieren konnte in dieser Versuchsgruppe im Darm eine etwa 500-fache Expressionssteigerung beobachtet werden. Bei mäßiger Streuung lagen im Darm die Mediane von WT-, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren auf vergleichbarem Niveau. CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten eine gering verminderte Expression. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 40 B).

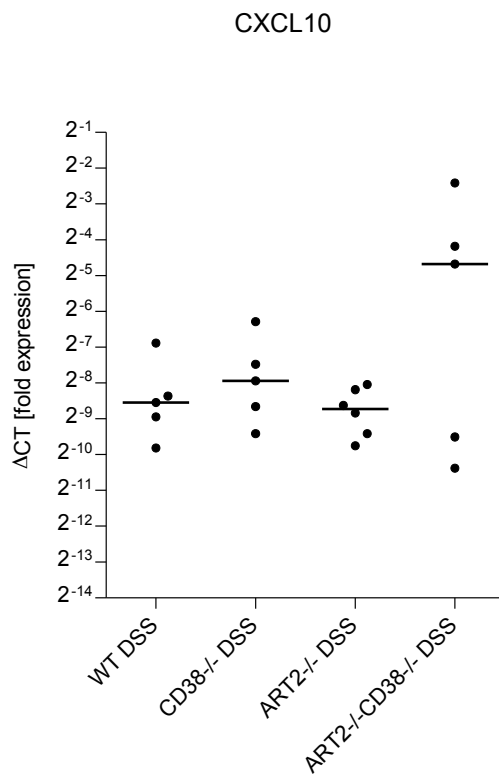
CCL2**Abb. 41: Expression von CCL2 im Darm DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Im Diagramm dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der CCL2-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt, die Zusammenfassung ergibt den Wert, der jedes Tier repräsentiert. Der Balken markiert den Median. CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup> p=0,026, ART2<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> p=0,0411, alle anderen Analysen p>0,05.

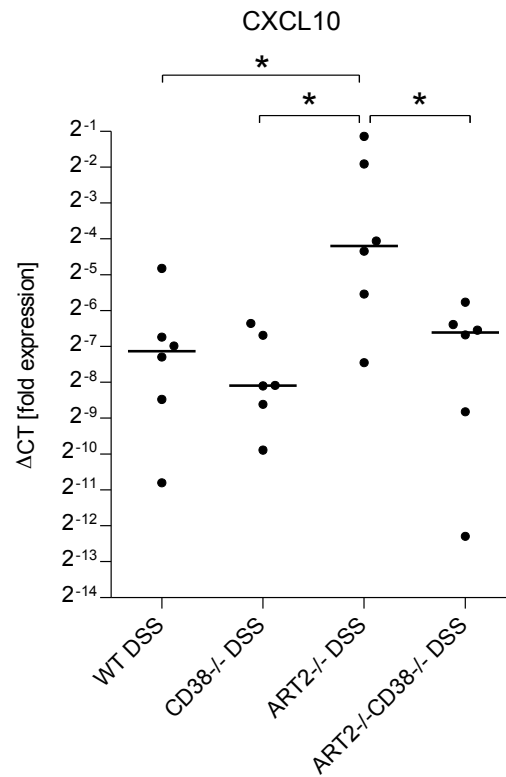
Die Expression von CCL2 in DSS-behandelten WT-Tieren lag etwa 1000-fach höher als der basale Wert in gesunden WT-Tieren (Abb. 33 und 41). Im Vergleich zu DSS-behandelten WT-Tieren war in DSS-behandelten CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren die Expression von CCL2 vermindert, der Median lag in diesen Gruppen etwa 4-fach niedriger als in WT-Tieren. Hohe Expressionswerte zeigten sich in ART2<sup>-/-</sup> Tieren mit signifikant ausgeprägten Unterschieden zwischen CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> und zwischen ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup> Tieren.

## CXCL10

## A Milz



## B Darm

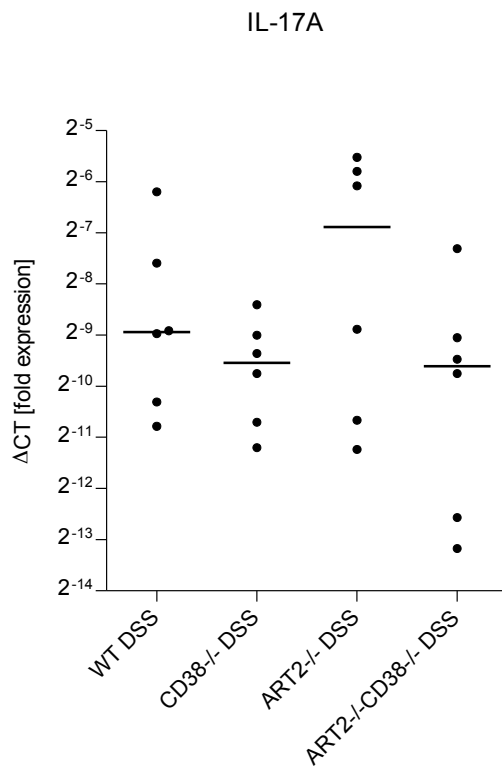
**Abb. 42: Expression von CXCL10 in Milz und Darm DSS-behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Das Diagramm zeigt die relative Expression ( $\Delta$ CT) der CXCL10-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergibt den Messwert eines jeden Einzeltieres. Der Balken markiert den Median. **A:** Alle Analysen  $p > 0,05$ . **B:** CD38<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>  $p = 0,0087$ , ART2<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p = 0,026$ , WT vs. ART2<sup>-/-</sup>  $p = 0,0411$ , alle anderen Analysen  $p > 0,05$ .

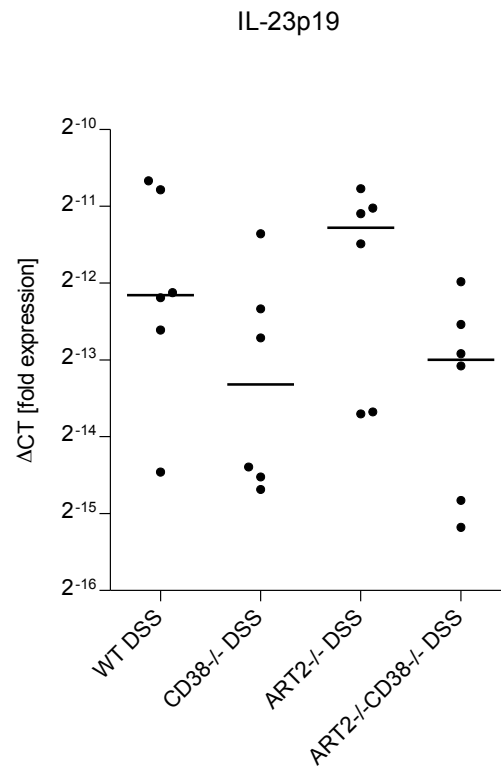
Das Chemokin CXCL10 wurde in der Milz in WT-, ART2<sup>-/-</sup> und CD38<sup>-/-</sup> Tieren auf vergleichbarem Niveau exprimiert (Abb. 42 A). Eine im Median gesteigerte Expression bei relativ hoher Streuung wurde in ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet. Im Darm fiel vor allem in ART2<sup>-/-</sup> Tieren eine erhöhte Expression auf, die sich signifikant von dem Expressionslevel in WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren abhob (Abb. 42 B). Dieses Muster in der Relation der Expressionslevel zwischen CD38<sup>-/-</sup>, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren fiel auch bei IL-6, CXCL1 und CCL2 auf, bei CCL2 ebenfalls mit signifikanter Ausprägung.

## IL-17A und IL-23p19

## A Darm



## B Darm

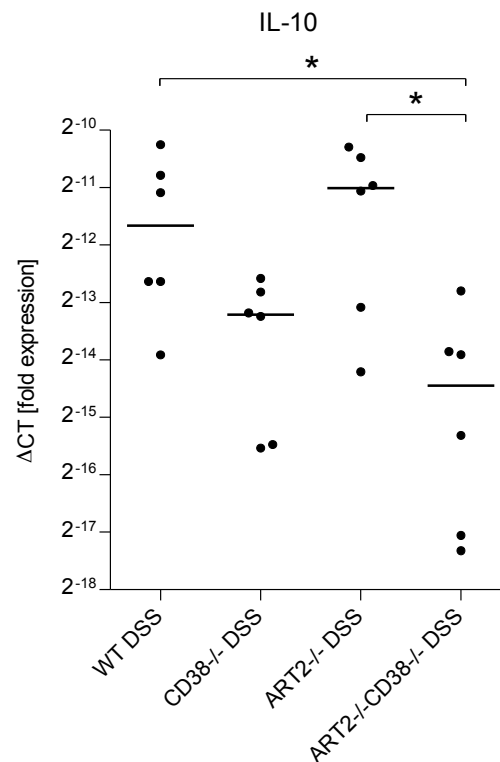
**Abb. 43: Expression von IL-17A und IL-23p19 im Darm DSS behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeprobe zur RNA-Isolierung eingefroren. Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der IL-17A- und IL-23p19-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung der Proben, die Zusammenfassung ergibt den Wert, der jedes Tier repräsentiert. Der Balken markiert den Median. **A:** Alle Analysen  $p > 0,05$ . **B:** Alle Analysen  $p > 0,05$ .

IL-17A wurde in WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren bei relativ großer Streuung auf vergleichbarem Level exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigten ART2<sup>-/-</sup> Tiere eine erhöhte Expression, bei ebenfalls großer Streuung der Messwerte (Abb. 43 A). Die Zytokinuntereinheit IL-23p19 zeigte auf niedrigerem Expressionslevel ein ähnliches Muster: Eine geringe Expression in WT- und insbesondere auch in CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren, dagegen eine erhöhte Expression in ART2<sup>-/-</sup> Tieren (Abb. 43 B). Keiner der beschriebenen Unterschiede erreichte statistische Signifikanz. Die Relation der Mediane der Expressionslevel zwischen den einzelnen Gruppen zeigte gewisse Ähnlichkeiten zwischen IL-17A und IL-23p19, was die funktionelle Verbindung

dieser Zytokine reflektieren könnte. Dieses Verhältnis der Mediane wurde nicht nur zwischen DSS-behandelten, sondern auch zwischen naiven WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet (Abb. 35 A und B).

## IL-10



**Abb. 44: Expression von IL-10 im Darm DSS behandelter Tiere**

Jeweils 6 Tiere pro Versuchsgruppe wurden 5 Tage mit DSS-Trinkwasser behandelt. An Tag 7 wurden die Organe entnommen und die Gewebeproben zur RNA-Isolierung eingefroren. Dargestellt ist die relative Expression ( $\Delta$ CT) der IL-10-mRNA im Verhältnis zum 18S-Standard. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung, die Zusammenfassung ergibt den Messwert des einzelnen Tieres. Der Balken markiert den Median. ART2<sup>-/-</sup> vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,026$ , WT vs. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>  $p=0,0152$ , alle anderen Analysen  $p>0,05$ .

Auffällig bezüglich der Expression von IL-10 waren die ähnlichen Expressionslevel in WT- und ART2<sup>-/-</sup> Tieren, sowie die deutlich verminderte Expression in CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren (Abb. 44). CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten, verglichen mit WT-Tieren, eine um die Hälfte verminderte Expression, ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere eine um etwa drei Viertel reduzierte Expression. ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere exprimierten damit IL-10 signifikant schwächer als WT- und ART2<sup>-/-</sup> Tiere. In allen Versuchsgruppen konnten erhebliche Streuungen der Messwerte beobachtet werden (Abb. 44).



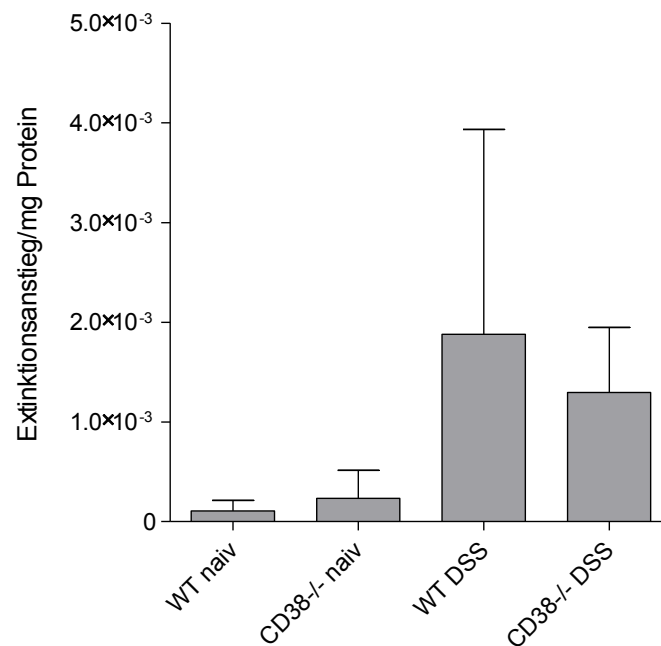
#### 4.2.7 MPO-Nachweis

Dieses Experiment diente dazu, granulozytäre Infiltrate in Geweben zu quantifizieren und Rückschlüsse auf das Entzündungsgeschehen in den einzelnen Versuchstiergruppen zu ziehen. Im MPO-Nachweis wird die Aktivität des für Granulozyten spezifischen Enzyms Myeloperoxidase (MPO) bestimmt.

Klinische und histologisch-pathologische Beobachtungen zeigten das Vorliegen einer schweren Kolitis in DSS-behandelten Tieren. Zugleich verdichteten sich die Hinweise, dass in CD38<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu WT-Tieren ein abgeschwächter Entzündungs- und Krankheitsverlauf vorliegt. Ähnliches war auch auf Ebene der Zytokine und Chemokine erkennbar, die mittels Real-Time PCR erfasst wurden. Diese Beobachtungen sollten mittels MPO-Nachweis untermauert werden.

Die Gewebeproben für diese Versuche wurden unmittelbar nach Organentnahme in flüssigem Stickstoff konserviert. Nach Aufreinigung der Proteine erfolgte die Bestimmung der MPO-Aktivität, indem der Umsatz eines Redoxindikators photometrisch gemessen und über die Zeit aufgetragen wurde. Der gemessene Absorptionsanstieg konnte als Maßzahl für die Enzymaktivität verwendet und auf die eingesetzte Proteinmenge standardisiert werden. Dadurch ließen sich Schwankungen in der Menge des eingesetzten Gewebes ausgleichen.

In unbehandelten Tieren wurde sowohl in WT- als auch in CD38<sup>-/-</sup> Tieren nur eine geringe MPO-Aktivität beobachtet (Abb. 45). Dagegen fiel in DSS-behandelten Tieren eine stark erhöhte MPO-Aktivität auf, was der Infiltration der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der Kolitis entspricht. Gegenüber DSS-behandelten WT-Tieren war die Aktivität in behandelten CD38<sup>-/-</sup> Tieren reduziert. Alle erkrankten Tiere, insbesondere in der WT-Gruppe, zeigten höhere Streuungen als gesunde Tiere. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erreichen keine statistische Signifikanz.



**Abb. 45: MPO-Aktivität in Relation zum Gesamtprotein**

Jede Versuchsgruppe bestand aus 3 Tieren. Den DSS-Tieren wurde über 5 Tage DSS-Trinkwasser verabreicht. Zwei Tage später wurden bei allen Tieren die Organgewebe entnommen und die Proteine wie beschrieben aufgereinigt. Auf der y-Achse ist das Verhältnis von Aktivitätsanstieg und eingesetzter Proteinmenge dargestellt (s.o.). Vor allem in DSS-behandelten Tieren zeigten sich große Streuungen der Messwerte. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren nicht signifikant ausgeprägt.

Die Ergebnisse stimmen mit den histopathologischen Befunden überein. Auch hier zeigten sich in unbehandelten Tieren kaum neutrophile Granulozyten, während in DSS-behandelten Tieren ausgedehnte Infiltrate dieser Zellen erkennbar waren.

#### 4.3 Zellpopulationen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren

Die folgenden Experimente dienten der Charakterisierung von T-Zellpopulationen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren unter homöostatischen Bedingungen. Die mittels Real-Time PCR durchgeführten Analysen hatten ergeben, dass für einige Zytokine und Chemokine ausgeprägte Expressionsunterschiede zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup>-Tieren bestanden. Dies galt insbesondere für DSS-behandelte Tiere, war aber auch in gesunden Tieren zu beobachten. Aufgrund dieser Befunde und der darmspezifischen Expression von CD38 wurden intestinale T-Lymphozyten aus WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren auf unterschiedliche Zytokinprofile hin untersucht.

Um die Zellpopulationen anhand ihrer Leitzytokine identifizieren zu können, wurden die Zellen nach der Isolierung zunächst mittels PMA/Ionomycin stimuliert. Danach erfolgte die extrazelluläre Färbung der Rezeptoren CD4, CD8 $\alpha$  und CD45 (Tab. 10) sowie die intrazelluläre Färbung der Zytokine IFN $\gamma$  und IL-17A (Tab. 11). Dabei diene IFN $\gamma$  als Leitzytokin für T<sub>H</sub>1-Zellen, entsprechend IL-17A für T<sub>H</sub>17-Zellen. Die durchflusszytometrische Auswertungsstrategie für die Vorselektion der Lymphozyten und für die Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in Abb. 46 beispielhaft gezeigt.

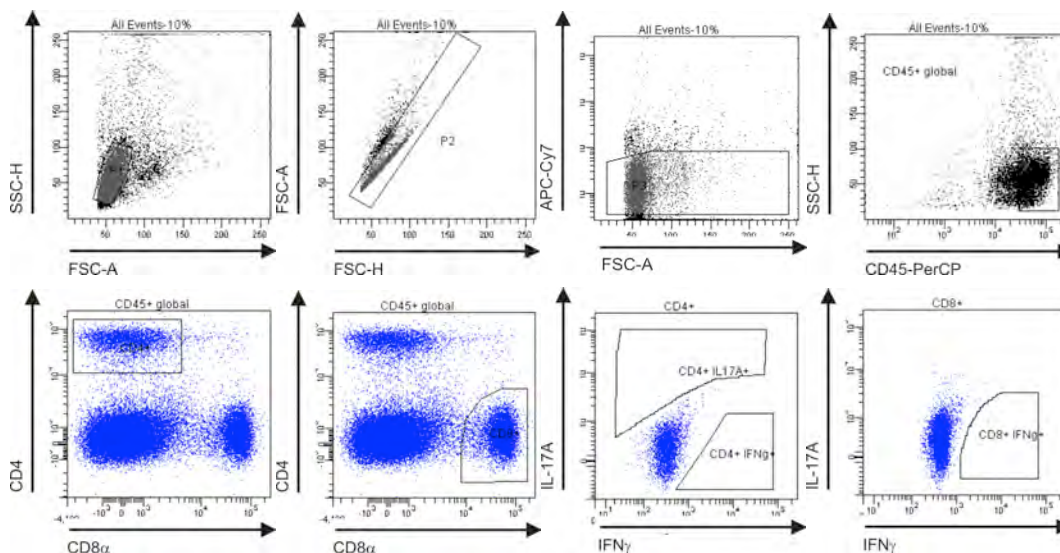
**Tab. 10: Extrazelluläre Färbung**

Antikörper zur Charakterisierung von T-Zellpopulationen in gesunden Tieren.

Antigen	Fluorochrom
CD4	APC
CD8 $\alpha$	PE-Cy7
CD45	PerCP

**Tab. 11: Intrazelluläre Zytokinfärbung**

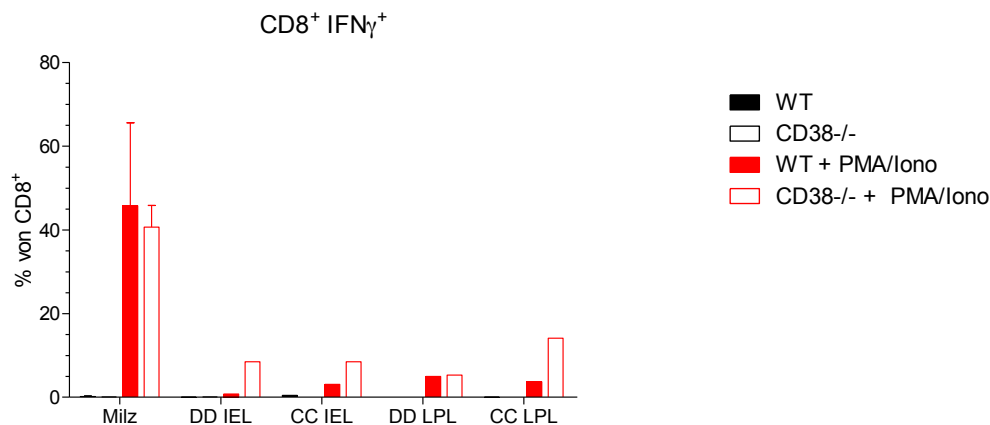
Antigen	Fluorochrom
IFN $\gamma$	Pacific blue
IL-17A	PE

**Abb. 46: Vorselektion der Zellen**

Es wurden jeweils zwei WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere verwendet und die Organe Milz, Dünndarm und Kolon entnommen. Die isolierten Zellen wurden mittels PMA/Ionomycin für 4 h stimuliert. Im FACS wurden die Zellen zunächst, wie in den oberen Diagrammen gezeigt, nach FSC-SSC, Einzelzellen sowie der Expression von CD45 vorselektioniert. Durch die Auswahl von Zellen, die negativ waren für APC-Cy7 – einem nicht benutzten Kanal – konnten tote Zellen aussortiert

werden, die häufig eine relativ starke Autofluoreszenz aufweisen. Schließlich wurden mittels SSC-H und CD45<sup>+</sup>-Auswahl die lebenden Zellen hämatopoetischen Ursprungs selektioniert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in den oberen Punktdiagrammen jeweils nur 10% der aufgenommenen Zellen dargestellt.

#### 4.3.1 IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen



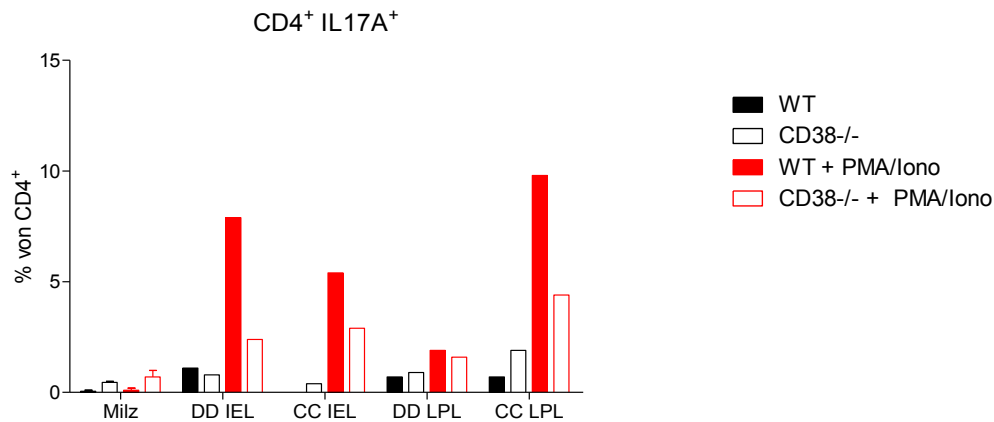
**Abb. 47: Anteile von IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren**

Dargestellt ist der Anteil der IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Bezug auf alle CD8<sup>+</sup> Zellen. Für jedes Gewebe wurden Zellen aus WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren jeweils mit und ohne Stimulation durch PMA/Ionomycin analysiert. Für die Analyse der Zellen aus Dünndarm und Kolon wurden jeweils zwei Isolate zusammengegeben. DD: Dünndarm, CC: Zäkum und Kolon, IEL: intraepitheliale Lymphozyten, LPL: Lamina-propria-Lymphozyten.

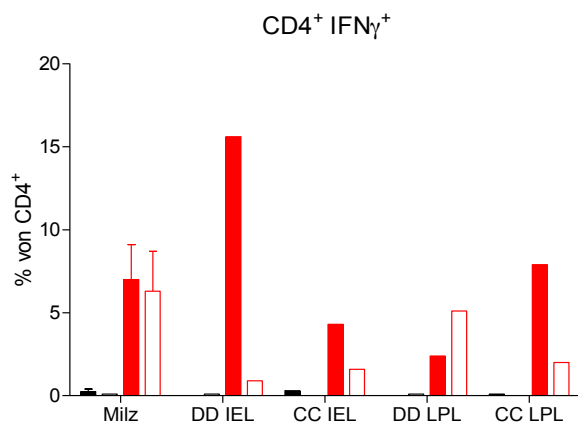
In unstimulierten Kontrollen zeigte sich in Zellen aus allen untersuchten Geweben nur eine marginale Synthese von Zytokinen. Nach Stimulation waren in den Milzen von WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren jeweils etwa 40% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen IFN $\gamma$ -positiv. Im Darm war der Anteil dieser Zellen jeweils erheblich geringer. IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen hatten hier meist einen Anteil von unter 10% an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wobei in CD38<sup>-/-</sup> Tieren in allen Kompartimenten geringfügig höhere Anteile ermittelt wurden. Für CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnten in keinem Gewebe nennenswerte Zellpopulationen beobachtet werden, die IL-17A synthetisieren (Abbildung nicht gezeigt).

### 4.3.2 IL17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen

**A**



**B**



**Abb. 48: Anteile von IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren**

Dargestellt ist der Anteil der IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen in Bezug auf alle CD4<sup>+</sup> Zellen. Für jedes Gewebe wurden Zellen aus WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren jeweils mit und ohne Stimulation durch PMA/Ionomycin analysiert. Für die Analyse der Zellen aus Dünndarm und Kolon wurden jeweils zwei Isolate zusammengegeben. DD: Dünndarm, CC: Zäkum und Kolon, IEL: intraepitheliale Lymphozyten, LPL: Lamina-propria-Lymphozyten.

T<sub>H</sub>17-Zellen wurden als IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen definiert (Abb. 48 A). Da diese Identifikation über das synthetisierte Leitzytokin nur in stimulierten Zellen möglich ist, bezieht sich die folgende Beschreibung nur auf stimulierten Zellen. IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen treten gewöhnlich in der Milz in nur geringer Anzahl auf; diese Beobachtung konnte hier bestätigt werden. Im Gegensatz zur Milz fanden sich in den untersuchten Darmgeweben jeweils beachtliche Populationen an IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Vergleich zu

---

WT-Tieren ließen sich in den CD38<sup>-/-</sup> Tieren deutlich verminderte Anteile an IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen feststellen.

T<sub>H</sub>1-Zellen wurden als IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen definiert (Abb. 48 B). In der Milz konnten für diese Zellen vergleichbar große Populationen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet werden. Im Darm fanden sich, mit Ausnahme der Lamina propria des Dünndarms, in WT-Tieren jeweils höheren Frequenzen an IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen als in CD38<sup>-/-</sup> Tieren.

Im Vergleich zu WT-Tieren konnten in CD38<sup>-/-</sup> Tieren für IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und IL-17A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm veränderte Anteile der Zellpopulationen beobachtet werden. Diese Versuche geben Hinweise auf einen möglichen Einfluss von CD38 bereits unter homöostatischen Bedingungen.

---

## 5. Diskussion

Nukleotide wie NAD<sup>+</sup> werden bei Entzündungen oder allgemein bei Zellstress freigesetzt. Extrazellulär besitzen sie als DAMP-Struktur Signalfunktionen für das Immunsystem. Die Glykohydrolase CD38 synthetisiert aus NAD<sup>+</sup> Second Messenger, die eine wichtige Funktion für die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren und damit für die Chemotaxis besitzen. NAD<sup>+</sup> dient außerdem als Substrat für die ADP-Ribosyltransferase ART2. Diese kann durch ADP-Ribosylierung des Purinrezeptors P2X7 auf T-Zellen deren Apoptose auslösen. Durch die Koexpression von ART2 und P2X7 ergibt sich ein immunregulatorischer Mechanismus für T-Zellen, der auf erhöhtes extrazelluläres NAD<sup>+</sup> reagiert. Der NAD<sup>+</sup> Abbau durch CD38 könnte hierzu einen funktionellen Antagonismus darstellen.

Bereits bekannt ist die hohe CD38-Expression auf immunregulatorischen T<sub>reg</sub>-Zellen sowie iNKT-Zellen. Vorversuche in der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass auch Effektorzellen im Darm eine hohe Expression von CD38 aufweisen, was auf eine mögliche darmspezifische Funktion hindeutet. Die Expression von CD38 auf T-Zellen der Darmmukosa konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Außerdem konnte die Expression auf verschiedenen Zellsubpopulationen näher bestimmt werden, was im vorliegenden Kapitel zunächst diskutiert wird.

Anschließend wird auf die Entzündungsversuche eingegangen. In diesen Experimenten sollte die weitgehend unklare Funktion von CD38 im Rahmen intestinaler Entzündungen untersucht werden. Dafür wurden WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere im DSS-Modell verglichen (DSS: Dextransulfat-Natrium). Die Entzündungsparameter, histologische Untersuchungen und klinische Korrelate wie Gewichtsveränderungen bestätigten das Vorliegen einer schweren Kolitis in DSS-behandelten Tieren. Um weitere Aufschlüsse über das mögliche regulatorische Zusammenspiel von CD38 und ART2 zu erhalten, wurden auch ART2<sup>-/-</sup> und CD38<sup>-/-</sup>ART2<sup>-/-</sup> Tiere in die Analysen einbezogen. In diesen Experimenten zeigte sich eine abgeschwächte Entzündung in CD38<sup>-/-</sup> Tieren sowie ein uneinheitliches Verhalten von ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren.

Um mögliche Auswirkungen von CD38 auf Leukozyten unter homöostatischen Bedingungen zu untersuchen, wurden schließlich die Zusammensetzung verschiedener T-Zellsubpopulationen und deren Zytokinprofil in naiven WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren untersucht. Bei diesen Versuchen lag das Augenmerk auf den T-Zellsubpopulationen des Darms, was abschließend diskutiert wird.

---

## 5.1 Expression von CD38 auf Lymphozyten und myeloiden Zellen

### 5.1.1 Expression von CD38 auf Lymphozyten

Vorversuche hatten gezeigt, dass T-Lymphozyten in der intestinalen Mukosa im Vergleich zu T-Lymphozyten anderer Organe eine erhöhte CD38-Expression aufwiesen (Vorarbeiten der AG Mittrücker). Die organspezifische Expression kann Anhalt für eine besondere lokale Funktion sein. Diese Beobachtung sollte zunächst in eigenen Versuchen reproduziert werden. Dafür wurde durchflusszytometrisch die Expression von CD38 auf Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen analysiert. Die Zellen wurden dazu aus den Organen Darm, Milz und Lymphknoten gesunder WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere isoliert. Zur Analyse der T-Lymphozyten wurden über CD4, CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  die wichtigsten Subpopulationen differenziert.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass CD38 auf den wesentlichen T-Zellsubpopulationen (CD4<sup>+</sup>, CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> und CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen) im Darm höher exprimiert war als auf den entsprechenden Populationen der Milz. Hierbei war sowohl der Anteil CD38-positiver Zellen als auch das Ausmaß der CD38-Expression pro Zelle im Darm deutlich erhöht. Eine sehr hohe Expression fiel insbesondere bei den CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> T-Zellen auf.

Zu berücksichtigen ist hierbei, dass in unseren Analysen nicht zwischen regulären CD4<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>reg</sub>-Zellen differenziert wurde. T<sub>reg</sub>-Zellen sind hochpositiv für CD38 und finden sich auch in der Darmmukosa (Patton et al. 2011). Um innerhalb der CD38-positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation zwischen regulären und T<sub>reg</sub>-Zellen zu differenzieren, sollten bei weiteren Experimenten Charakteristika für murine T<sub>reg</sub>-Zellen wie die Expression von Foxp3, CD25 oder  $\alpha\text{E}\beta 4$ -Integrin in die Analyse aufgenommen werden (Read et al. 2000, Lehmann et al. 2002).

CD38 findet sich bei antiviralen Immunantworten auch auf Zellen mit aktiviertem oder Memory-Phänotyp (Zaunders et al. 2006, Epple et al. 2010). In diesem Kontext ist die CD38-Expression auch als Epiphänomen einer Aktivierung denkbar (Bofill und Borthwick 2000). Eine höhere CD38-Expression auf Lymphozyten des Darms könnte daher auch eine Anreicherung von aktivierten und Memory-T-Zellen oder eine unterschwellige T-Zell-Aktivierung durch das normale Mikrobiom im Darm widerspiegeln.

Für CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist bekannt, dass bei der Prägung durch CD103<sup>+</sup> DCs mittels TGF $\beta$  und Retinoat ein intestinaler Phänotyp induziert wird, zu dem u.a. die Expression von  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin und CCR9 gehören (Abb. 3, Iwata et al. 2004, Du Pré et al. 2011). Nukle-



---

otidmetabolisierende Moleküle wie P2X7 und ART2 sind ebenfalls auf Lymphozyten des Darms höher exprimiert als auf Lymphozyten anderer Gewebe (Vorarbeiten der AG Mittrücker). Die Expression dieser Moleküle – wie auch die des für den Darmphänotypen charakteristischen Moleküls  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin – konnte mittels Stimulation durch anti-CD3, TGF $\beta$  und Retinoat *in vitro* induziert werden (Vorarbeiten der AG Mittrücker). In diesen Experimenten zeigte sich auch eine Induktion von CD38, womit CD38 als Teil eines Darmphänotyps von Lymphozyten angesehen werden kann. Insgesamt zeigten unsere Analysen eine hohe Expression von CD38 auf allen untersuchten T-Lymphozyten, was höchstwahrscheinlich auf einer Prägung durch CD103<sup>+</sup> DCs beruht; andere Mechanismen der CD38 Induktion können aber nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Koexpression von CD38 mit nukleotidmetabolisierenden Enzymen wie ART2 und Nukleotidrezeptoren wie P2X7 ergibt sich ein potentieller Regulationsmechanismus (Kap. 1.3), der prinzipiell auch *in vivo* funktioniert, wie Adriouch et al. (2007) zeigen konnten. Bei Injektion hoher NAD<sup>+</sup>-Dosen fand eine ausgeprägte Depletion von T<sub>reg</sub>-Zellen in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren statt, jedoch nur eine geringe Depletion in WT-Tieren. Die ausgeprägte Depletion in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren konnte durch ART2-blockierende Antikörper verhindert werden (Hubert et al. 2010, Adriouch et al. 2012). Demnach ist zumindest unter experimentellen Bedingungen eine Funktion des CD38 vermittelten NAD<sup>+</sup>-Abbaus erkennbar. Weiterhin konnte in einem Entzündungsmodell eine erhöhte lokale NAD<sup>+</sup> Konzentration in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass CD38 auch unter physiologischen Bedingungen die extrazelluläre NAD<sup>+</sup> Konzentration und dadurch regulierte Mechanismen steuern kann (Adriouch et al. 2007). Die hohe CD38-Expression von T-Lymphozyten legt daher eine Funktion dieses Regelkreises auch im Darm nahe. Sie könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von CD38<sup>-/-</sup>- und CD38<sup>-/-</sup>-ART2<sup>-/-</sup>-Tieren im DSS-Entzündungsmodell bieten (Kap. 5.2).

### 5.1.2 Expression von CD38 auf myeloiden Zellen

In der gesunden Darmmukosa fanden sich nur geringe Zahlen an Makrophagen und fast keine neutrophilen Granulozyten. Zur Analyse der myeloiden Zellen wurden deshalb oral mit Salmonellen infizierte Mäuse verwendet. In diesen Tieren zeigten Makrophagen und Neutrophile der Milz eine geringe CD38-Expression (etwa 10% bzw. 13%). Im Darm lag der Anteil CD38-positiver Zellen für Makrophagen bei 27% und für Neutrophile bei 70%. Im Vergleich zu den Lymphozyten war der Unterschied der Expression zwischen Milz und Darm aber weniger stark ausgeprägt.

---

CD38 ist auf zirkulierenden Monozyten exprimiert, jedoch nicht auf sesshaften Makrophagen. Bei humanen Monozyten ist die Expression durch  $\text{IFN}\gamma$  induzierbar (Zilber et al. 2000, Malavasi 2008). Diese CD38-Induktion könnte auch in unseren Analysen aufgrund der experimentellen Salmonelleninfektion auftreten, da bei Immunantworten gegen Salmonellen typischerweise  $\text{T}_\text{H}1$ -Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$  gebildet werden (Musso et al. 2001). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass CD38-positive zirkulierende Monozyten im Rahmen der Infektion in die Darmmukosa einwandern und dadurch zur erhöhten CD38-Expression innerhalb der Makrophagenpopulation beitragen.

Wie auf Lymphozyten werden auch auf myeloiden Zellen weitere nukleotidmetabolisierende Enzyme und Rezeptoren exprimiert. Bekannt ist, dass Makrophagen den Rezeptor P2X7 tragen (North 2002, Ferrari et al. 2006). Makrophagen exprimieren nach Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  oder Lipopolysaccharid außerdem ART2.1 (Hong et al. 2007). Dennoch ist es fraglich, ob CD38 auf myeloiden Zellen unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen eine Rolle im extrazellulären Nukleotidstoffwechsel spielt. Beschrieben wurde, dass  $\text{NAD}^+$  mittels ART2.1 auf Makrophagen P2X7 aktivieren kann, was zur Freisetzung von  $\text{IL-1}\beta$  führt (Ferrari et al. 2006). Ob CD38 hier jedoch eine Rolle spielt, müsste zunächst durch *in vitro*-Experimente untersucht werden. Allerdings wird ART2.1 in den in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6 Mäusen nicht exprimiert (Kanaitzuka et al. 1997). Da ART2.2 seinerseits nicht auf myeloiden Zellen exprimiert wird, spielt der für T-Zellen angenommene ART2-abhängige Regulationsmechanismus für diese Zellen hier keine Rolle.

CD38 ist auch auf murinen neutrophilen Granulozyten exprimiert. Für diese Zellen ist CD38 im Rahmen der Chemotaxis wichtig (Partida-Sánchez et al. 2004). Im Darm zeigten neutrophile Granulozyten in unseren Analysen eine höhere CD38-Expression als in der Milz. Eine darmspezifische Prägung, wie sie für die Lymphozyten diskutiert wurde, ist aber für Granulozyten aufgrund der raschen und direkten Akkumulation im Darm sowie der kurzen Halbwertszeit dieser Zellen unwahrscheinlich. In entzündeten Geweben, z.B. im Peritoneum nach Thioglycolat-Injektion, besitzen Neutrophile ebenfalls eine hohe CD38-Expression (Partida-Sánchez et al. 2001). Analog könnte die Salmonelleninfektion im durchgeführten Versuch zur gesteigerten CD38-Expression geführt haben. Ein Grund für die hohe CD38-Expression auf Neutrophilen in den entzündeten Geweben könnte in der Abhängigkeit der Chemotaxis von CD38 liegen. Andererseits existieren Rezeptoren wie P2Y11, die auf extrazelluläres  $\text{NAD}^+$  ansprechen und ebenfalls eine chemotaktische Funktion haben (Moreschi et al. 2006). Durch die Reduktion von extrazellulärem  $\text{NAD}^+$  hätte CD38 hier eine hemmende Funktion auf die Migration von Neutrophilen. Für ein umfassenderes Verständnis des Zusammenspiels von extrazellulärem  $\text{NAD}^+$ , nukleotidmetabolisierenden Enzymen und der Akti-

vität von neutrophilen Granulozyten im Gewebe sollten diese Funktionsbeziehungen zunächst *in vitro* näher untersucht werden.

## 5.2 Phänotyp von CD38<sup>-/-</sup> Tieren bei schwerer intestinaler Entzündung

Um die Rolle von CD38 bei schwerer Entzündung zu untersuchen, wurde das DSS-Modell gemäß Okayasu et al. (1990) angewendet. Es handelt sich um ein etabliertes Modell für schwere Darmentzündungen. Im angewendeten Protokoll wurde den Versuchstieren 5 Tage DSS-Trinkwasser verabreicht, danach normales Wasser bis zum Versuchsende bzw. zur Organentnahme an Tag 7. In unseren Experimenten wurden gesunde WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere sowie DSS-behandelte WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tiere, aber auch DSS-behandelte ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>-Tiere untersucht.

Die DSS-Behandlung führte in den WT-Kontrolltieren zu einem signifikanten Gewichtsverlust. Dieser war auch in ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren, nicht aber in CD38<sup>-/-</sup> Tieren zu beobachten. Der reduzierte Gewichtsverlust in CD38<sup>-/-</sup> Tieren zeigte sich sowohl innerhalb dieser Versuchsgruppe im Vorher-nachher-Vergleich zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende als auch im Vergleich zu den WT-Tieren am Tag 6 und 7. Diese Beobachtung weist auf einen abgeschwächten Entzündungsprozess in CD38<sup>-/-</sup> Tieren hin. Ein weiterer klinischer Parameter für das Ausmaß einer Darmentzündung ist die krankheitsbedingte Verkürzung des Dickdarms (Okayasu et al. 1990). In unseren Versuchen war generell eine Verkürzung des Darmes bei DSS-behandelten Tieren zu beobachten. Innerhalb der DSS-behandelten Tiere zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere einen signifikant längeren Dickdarm als WT-, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse der Gewichtsmessung, vor allem aber legt sie – wie auch die Gewichtsanalyse – ein abgeschwächtes Entzündungsgeschehen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren nahe.

Auch die Auswertung des klinischen Scores, der auf der makroskopischen Analyse der Darmpräparate beruht, legte eine verminderte Entzündung in CD38<sup>-/-</sup> Tieren nahe. Allerdings erfolgte die Bewertung nicht in einem verblindeten Verfahren; die Ergebnisse könnten prinzipiell durch Voreingenommenheit bei der Auswertung beeinflusst worden sein. Dennoch zeigte sich der Trend, dass CD38<sup>-/-</sup> Tiere vor schweren Entzündungen geschützt waren, während WT-, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere auffällige makroskopisch-pathologische Merkmale zeigten.

Für die Quantifizierung der Entzündungsvorgänge wurden histologische und immunohistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die histologische Untersuchung ermöglicht eine originalgetreue Darstellung der Gewebearchitektur und eingewander-

---

ter Zellen und ist der Goldstandard in der Gewebediagnostik. Die H.E.-gefärbten Paraffinschnitte wurden anhand eines histologischen Scores befundet (Tab. 5, Cooper et al. 1993). Das Ergebnis zeigte in WT-, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren einen hohen Scoring-Wert, d.h. Anzeichen einer ausgeprägten Entzündung. Dagegen ergab sich für CD38<sup>-/-</sup> Tiere ein geringer Scoring-Wert, der gegenüber WT- und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup>-Tieren statistische Signifikanz erreichte. Dies entspricht einer auf mikroskopischer Ebene verminderten Entzündung und Zellinfiltration in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der Gewichtsmessung und des klinischen Assessments.

Mittels Immunhistochemie wurden in den Paraffinschnitten Makrophagen (über die Antigene F4/80 und Mac2) und neutrophile Granulozyten (über Ly6G) detektiert. Zu beobachten war eine starke Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen im Darmgewebe DSS-behandelter Tiere. Auch hier wiesen CD38<sup>-/-</sup> Tiere, verglichen mit WT-Tieren, eine deutlich verminderte Infiltration auf.

Als nächstes wurden Zytokine und Chemokine im Gewebe mithilfe der RT-PCR quantifiziert. Die RT-PCR erlaubt eine zuverlässige Bestimmung der mRNA-Expression und wurde daher zur Analyse der Zytokin- und Chemokinexpression in Milz- und Darmgewebe eingesetzt. Da Fehlamplifikate durch Schmelzkurve und DNA-Elektrophorese weitgehend ausgeschlossen werden konnten, handelt es sich um eine verlässliche Methode. Ein Problem war allerdings, dass nur ein relativ kleines Stück des präparierten Darms jeweils für die Analyse zur Verfügung stand. Da die Entzündung zum Teil diskontinuierlich über den Darm verteilt war, könnte ein „Sampling Error“ auftreten, die zufällige Auswahl eines zufällig kaum betroffenen oder eines übermäßig stark entzündeten Abschnittes zur Analyse (Särndal et al. 1992). Dieser Sampling Error könnte auch die Streuung von Werten innerhalb der einzelnen experimentellen Gruppen erklären.

Für die meisten von uns überprüften Zytokine zeigte sich eine Induktion durch die DSS-Kolitis, was bereits bekannten Beobachtungen entspricht (Alex et al. 2009). In unseren Versuchen wurden signifikante Expressionssteigerungen der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CCL2, sowie der Zytokine IL-17A und IL-23 beobachtet. IL-17A ist das wichtigste Effektorzytokin der T<sub>H</sub>17-Zellen. Für diese T<sub>H</sub>-Zellen konnte eine bedeutende Rolle in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch in der Pathogenese der DSS-Kolitis gezeigt werden (Takedatsu et al. 2008, Ito et al. 2008, Kobayashi et al. 2008). IL-23 spielt in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen sowie in entsprechenden Tiermodellen ebenfalls eine wichtige Rolle (Hue et al. 2006, Ahern et al. 2008, Ahern et al. 2010). In Kongruenz hierzu stehen un-

---

sere Beobachtungen bezüglich der Expressionssteigerungen von IL-17A und IL-23p19. Für diese beiden Zytokine sowie einige weitere Zytokine und Chemokine (CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, IL-10) konnte eine reduzierte Expression in erkrankten CD38<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu erkrankten WT-Tieren beobachtet werden (Abb. 31 - 36), wenn auch die Unterschiede kaum Signifikanz erreichten.

Schließlich wurde in einem enzymatischen Assay die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität als Maß für die Granulozyteninfiltration bestimmt, ein weiteres Korrelat für die Schwere der Entzündung. Dabei wurden in DSS-behandelten WT-Tieren, verglichen mit behandelten CD38<sup>-/-</sup> Tieren, höhere Werte gemessen. Allerdings bestanden hohe Streuungen der Messwerte innerhalb der Tiere aus den behandelten Versuchsgruppen.

Insgesamt lieferten die DSS-Kolitisexperimente aussagekräftige Ergebnisse. Gewichtsveränderungen, klinisches Erscheinungsbild, Histologie, Immunhistochemie sowie RT-PCR bestätigen, dass DSS-Trinkwasser in C57BL/6-Tieren eine schwere Kolitis induziert. Diese Ergebnisse reproduzieren weitgehend Beobachtungen der Erstbeschreibungen von Okayasu et al. (1990) und Cooper et al. (1993). Ein zentrales Ergebnis unserer Experimente war der deutlich mildere Krankheitsverlauf der DSS-Kolitis in CD38<sup>-/-</sup> Tieren. In CD38<sup>-/-</sup> Tieren konnten im Vergleich zu WT-Tieren ein abgeschwächter Gewichtsverlust, ein besserer histopathologischer Score sowie eine verminderte Expression vor allem proinflammatorischer Zytokine (IL-17A, IL-23) und Chemokine (CXCL1, CXCL2, CXCL10 und CCL2) beobachtet werden. In histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen fiel in CD38<sup>-/-</sup> Tieren eine verminderte Infiltration von Makrophagen und Granulozyten in auf.

Die beobachteten Unterschiede zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren in den DSS-Experimenten lassen sich durch die Funktion von CD38 für die Chemotaxis hinreichend erklären. Die eingeschränkte Funktion verschiedener Chemokinrezeptoren in CD38<sup>-/-</sup> Tiere könnte zu einer reduzierten Infiltration von Makrophage und Granulozyten und dadurch zu einem verminderten Entzündungsgeschehen in der Darmmukosa führen. Prinzipiell sind aber auch weitere CD38-Funktionen zu erwägen, da die Beobachtungen in ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren durch Veränderungen in der Chemotaxis allein unzureichend erklärbar sind. Bezogen auf Gewichtsverlust, Darmverkürzung, makroskopische und histologische Entzündungszeichen zeigten die ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tiere einen Phänotyp vergleichbar zu WT- und ART2<sup>-/-</sup> Tieren. Für diese Parameter erwies sich die Auswirkung der CD38-Defizienz auf den Krankheitsverlauf abhängig von der ADP-Ribosyltransferase ART2. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Parametern waren in der RT-PCR für die untersuchten Zytokine und Chemokine keine oder nur geringe Expressionsunterschiede zwischen CD38<sup>-/-</sup> und

---

ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren zu beobachten: Die Auswirkung der CD38-Defizienz auf den Krankheitsverlauf war hier unabhängig von ART2. Diese Beobachtung legt nahe, dass CD38 ART2-abhängige und -unabhängige Funktionen im DSS-Modell haben könnte.

In unseren Versuchen zeigten CD38<sup>-/-</sup> Tiere wie erwähnt im Vergleich zu WT-Tieren abgeschwächte Entzündungen und damit einen teils erheblich besseren klinischen Zustand. Das lässt unter diesen Versuchsbedingungen eine proinflammatorische Rolle für CD38 vermuten. Die Arbeitsgruppe um F. Lund konnte eine Funktion von CD38 in der Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren zeigen (Partida-Sánchez et al. 2001, Partida-Sánchez et al. 2004). Insbesondere Chemokinrezeptoren mit einer Funktion in der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten sind in ihrer Aktivität stark von CD38 abhängig. Dies zeigt sich in Infektionsmodellen für Streptokokken, Mykobakterien oder Parasiten, in denen CD38<sup>-/-</sup> Tiere aufgrund einer verminderten Rekrutierung dieser Zellen nur eingeschränkt in der Lage sind, diese Infektionen zu kontrollieren (Partida-Sánchez et al. 2001, Viegas et al. 2007, Estrada-Figueroa et al. 2011). Für die Funktion von Phagozyten hat CD38 daher einen proinflammatorischen Charakter und ist bei Infektionen ein unentbehrlicher Faktor zur Erregerabwehr und letztlich zur Ausheilung der Erkrankung. Da CD38 aber auch in die Migrationvorgänge von DCs in sekundär lymphatische Organe involviert ist, konnte in CD38<sup>-/-</sup>-Tieren auch eine abgeschwächte humorale Immunantwort festgestellt werden (Cockayne et al. 1998, Partida-Sánchez et al. 2004). Die Rekrutierung von Entzündungszellen trägt wesentlich zum Entstehen von Gewebeschäden im Rahmen von immunpathologischen Prozessen bei. Auch in dem hier verwendeten DSS-Modell beruht die Schädigung des Darmgewebes auf der Rekrutierung von Entzündungszellen. Die deutlich reduzierte Migration von Granulozyten und Makrophagen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren (Partida-Sánchez et al. 2001) ist daher eine plausible Erklärung für den abgeschwächten Erkrankungsverlauf in CD38<sup>-/-</sup> Tieren in unseren DSS-Experimenten.

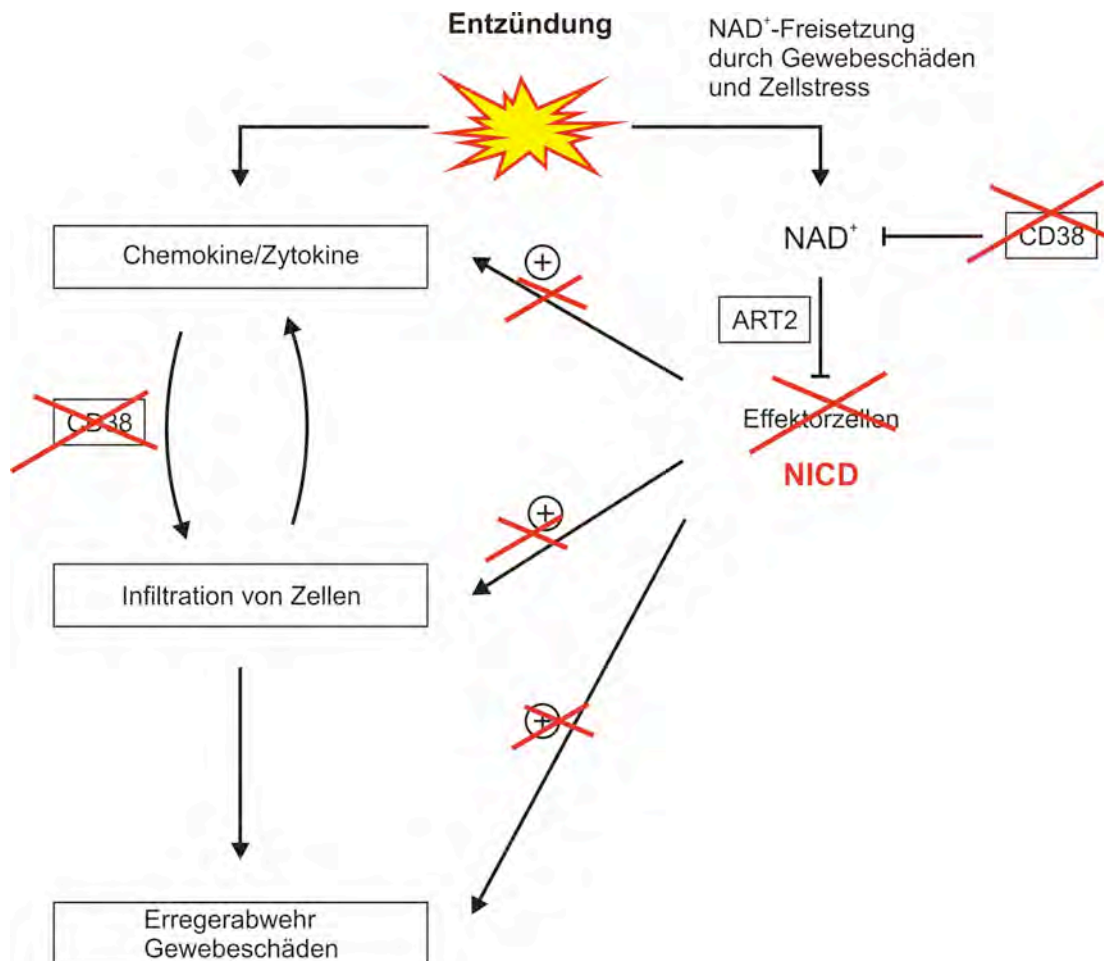
Neben der dargestellten proinflammatorischen Rolle von CD38 gibt es auch Hinweise für eine die Immunantwort hemmende Funktion. Anders als in den bereits beschriebenen Infektionsmodellen führt in bestimmten Autoimmunmodellen die Abwesenheit von CD38 zu schwereren Krankheitsverläufen (Lund 2006). In einem Modell für den Systemischen Lupus Erythematoses entwickeln *lpr/lpr*-Mäuse bei einer zusätzlichen Defizienz von CD38 stärkere Krankheitssymptome. Bei NOD-Mäusen, einem Mausstamm, der spontan einen Typ-1-Diabetes (T1D) entwickelt, zeigen CD38<sup>-/-</sup> NOD Tiere eine beschleunigte Entwicklung des autoimmunen T1D. Interessanterweise ist dieser Effekt abhängig von ART2: CD38<sup>-/-</sup> NOD Tiere, aber nicht ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> NOD Tiere zeigen sowohl schnellere Krankheitsverläufe als auch verminderte Zahlen an T<sub>reg</sub>-Zellen (Chen et al. 2006a). Die beschleunigte Entwicklung des T1D in CD38<sup>-/-</sup>-NOD Tieren ist außer-

dem abhängig von P2X7: In CD38<sup>-/-</sup>-P2X7<sup>-/-</sup> NOD Tieren wurde ein normaler Krankheitsverlauf beobachtet (Chen et al. 2011). Da T<sub>reg</sub>-Zellen ART2- und P2X7-positiv sind, wird postuliert, dass eine erhöhte extrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen in CD38<sup>-/-</sup> Tieren zur erhöhten Apoptoserate von T<sub>reg</sub>-Zellen führt. Die verminderte Anzahl an T<sub>reg</sub>-Zellen könnte dann die verstärkte Pathologie und den schnelleren Krankheitsverlauf erklären. Ein Mangel oder eine Fehlfunktion von T<sub>reg</sub>-Zellen wird auch mit zahlreichen Immunpathologien einschließlich chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (Singh et al. 2001). Wie T<sub>reg</sub>-Zellen tragen auch iNKT-Zellen CD38, ART und P2X7. Diese Zellen sind besonders empfindlich gegenüber NICD, ihre Zahl ist ebenfalls in CD38<sup>-/-</sup> Tieren reduziert (Chen et al. 2006b, Postigo et al. 2012). Die intestinale Mukosa beherbergt insgesamt eine große Anzahl regulatorischer Zellen, die eine wichtige Rolle für die immunologische Homöostase spielen (Uhlir et al. 2006, Maynard und Weaver 2009). Der Schutz regulatorischer Zellen vor Apoptose bedeutet eine antiinflammatorische Rolle von CD38.

Die nukleotidmetabolisierenden Enzyme CD38, ART2 und P2X7 sind neben T<sub>reg</sub>- und iNKT-Zellen auf nahezu allen T-Effektorzellen der Darmmukosa koexprimiert. Damit würden im Darm die Exponenten von Immunabwehr und Immuntoleranz der Regulation durch extrazelluläres NAD<sup>+</sup> unterliegen. Aufgrund der gegensätzlichen Funktion dieser Zellpopulationen könnte CD38 im Darm sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten. In unseren Experimenten äußerte sich eher eine proinflammatorische Rolle: Die CD38<sup>-/-</sup> Tiere zeigten im DSS-Kolitismodell, dessen Pathogenese mehr auf Immunpathologie denn auf Infektion beruht, einen besseren Gesundheitszustand.

CD38<sup>-/-</sup> Tiere und CD38<sup>-/-</sup>-ART2<sup>-/-</sup> Tiere zeigen in manchen Versuchen ein ähnliches und in anderen Versuchen ein unterschiedliches Verhalten. Eine Erklärung könnte sein, dass CD38 verschiedene regulatorische Mechanismen steuert, von denen nur manche von ART2 beeinflusst werden. Zu den ART2-abhängigen Mechanismen zählt der Nukleotid-induzierte Zelltod (NICD), der bei Koexpression von ART2 und P2X7 relevant ist. ART2-unabhängig sollte die Funktion von CD38 in der Chemokin-abhängigen Rekrutierung von Zellen in die Darmmukosa sein (Partida-Sánchez et al. 2001). Sowohl ART2-abhängige als auch ART2-unabhängige Mechanismen von CD38 können zur Pathogenese im DSS-Modell beitragen (Abb. 49). Zur Differenzierung zwischen diesen Mechanismen bieten sich verschiedene Strategien an. Wichtig wäre eine Charakterisierung der verschiedenen Zellpopulationen in der entzündeten Darmmukosa von WT-, CD38<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>-CD38<sup>-/-</sup> Mäusen. Mit histologischen Methoden und mittels Durchflusszytometrie sollten Granulozyten und Makrophagen, aber auch die verschiedenen Lymphozytenpopulationen, insbesondere auch die T<sub>reg</sub>-Zellen,

charakterisiert werden. In beiden Ansätzen sollten auch der Differenzierungszustand und die Apoptoserate der einzelnen Zellen mit erfasst werden. Aufgrund der selektiven Expression von ART2 wäre zu erwarten, dass sich die ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Mäuse vor allem in der Zusammensetzung und Funktion ihrer T-Zellsubpopulationen von WT-, ART2<sup>-/-</sup> und CD38<sup>-/-</sup> Tieren unterscheiden.



**Abb. 49: Synopsis der CD38-Funktionen für Zellrekrutierung und extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsel**

Eintragungen in Rot zeigen die (zum Teil hypothetischen) Veränderungen bei CD38-Defizienz. In WT-Tieren unterstützt CD38 die Zellmigration, so dass Zellen bei Entzündungen mittels Chemotaxis zum Entzündungsherd rekrutiert werden können. Außerdem benötigen DCs diese CD38-Funktion, um in sekundär lymphatische Organe zu gelangen (nicht dargestellt). Als NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase hält CD38 die NAD<sup>+</sup>-Spiegel niedrig und verhindert im Darm die Apoptose von Effektorzellen, systemisch dagegen eher die von T<sub>reg</sub>-Zellen (nicht dargestellt). Die Effektorzellen ihrerseits unterhalten die Entzündung, sie synthetisieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine, unterstützen Zellmigration und Erregerabwehr, verursachen aber auch Gewebeschäden. In CD38<sup>-/-</sup> Tieren ist die Zellmigration vermindert. Ferner führen hohe extrazelluläre NAD<sup>+</sup>-Spiegel zur Apoptose von Effektorzellen (Abb. 8). Deren pleiotrope proin-



---

flammatorische Wirkung fällt weg, was den Entzündungsprozess im Verlauf weiter abschwächt. Ein Resultat wäre eine unzureichende Erregerabwehr. Demgegenüber würde eine verminderte Gewebeschädigung und Immunpathologie stehen (Abb. 1, Kap. 1.3). Ob die CD38-Wirkung zum Nachteil oder Vorteil des Gesamtorganismus ist, hängt daher jeweils von der Entzündungsursache ab. Nicht eingezeichnet sind weitere Effekte von CD38, z.B. als Korezeptor auf B-Zellen, sowie andere nukleotidmetabolisierende Enzyme.

Generell zeigen unsere Ergebnisse, dass das Fehlen von CD38 zu einem milderen Krankheitsverlauf im DSS-Modell führt. In der Literatur wurden in CD38<sup>-/-</sup> Tieren meist abgeschwächte Immunantworten beobachtet, in Abhängigkeit vom Krankheitsmodell aber auch eine verminderte Immuntoleranz (Cockayne et al. 1998, Partida-Sánchez et al. 2001, Partida-Sánchez et al. 2004). Das von uns angewendete Krankheitsmodell entspricht einer Entzündung, in der die Tiere vom CD38-Verlust profitieren.

Ähnlich wie das vorliegende DSS-Entzündungsmodell beruhen die Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wahrscheinlich auch auf einer inadäquaten Immunantwort in der Darmmukosa, die zu schweren Entzündungen bzw. zur Immunpathologie führt. Aufgrund unserer Ergebnisse stellt sich die Frage nach der Rolle von CD38 in der Pathogenese der humanen Erkrankungen. CD38 könnte auch dort an der Rekrutierung von Entzündungszellen beteiligt sein. Aufgrund der fehlenden Expression von ART2 im Menschen ist die Regulation der Darmentzündung über eine durch NAD<sup>+</sup>-vermittelte Apoptose unwahrscheinlich (Haag et al. 1994). Interessant wäre daher zu sehen, in welchem Umfang Zellen der Darmmukosa CD38 und weitere nukleotidmetabolisierende Enzyme tragen und ob die Migration von Immunzellen der Darmmukosa von CD38 abhängig ist. Dies wären Voraussetzungen für die Beantwortung der Frage, ob die Inhibition von CD38 eine Behandlungsstrategie für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen bietet.

### 5.3 Zellpopulationen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren

Die Analyse der CD38-Expression und die DSS-Versuche in CD38<sup>-/-</sup> Tieren zeigten, dass CD38 auf Zellen der Darmmukosa exprimiert wird und bei Entzündungsreaktionen in der Darmmukosa eine Rolle spielt. Generell besteht daher die Möglichkeit, dass CD38 bereits unter homöostatischen Bedingungen Mechanismen der Aktivierung, der Differenzierung und des Überlebens von T-Zellen beeinflusst. Diese potentielle Wirkung von CD38 auf die T-Zellhomöostase hätte dann auch Auswirkungen auf Immunantworten. Um den Einfluss von CD38 auf T-Zellen unter homöostatischen Bedingungen zu untersuchen, wurden T-Zellpopulationen in naiven WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren

---

verglichen. Die Identifizierung verschiedener T-Zellpopulationen erfolgte anhand der Expression bestimmter Leitzytokine wie IFN $\gamma$  und IL-17A. Hierzu wurden die Zellen mittels PMA/Ionomycin für 4 Stunden stimuliert und die Zytokine nach intrazellulärer Färbung im Durchflusszytometer gemessen.

Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen bilden nach einer Kurzzeitstimulation nur geringe Mengen an IFN $\gamma$ . Erst nach Voraktivierung sind diese Zellen in der Lage, größere Mengen an IFN $\gamma$  zu produzieren. Diese Zellen besitzen im Gegensatz zu naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch zytotoxische Eigenschaften. In der Darmmukosa existieren neben den konventionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die ein CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer und den  $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor exprimieren, auch unkonventionelle CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abadie et al. 2012). Diese Zellen tragen ein CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer und sind jeweils etwa zur Hälfte positiv für den  $\alpha\beta$ - bzw. für den  $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor. Im Gegensatz zu den konventionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterliegen die unkonventionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch keiner klassischen MHC-I-Restriktion (Abadie et al. 2012). In unseren Analysen wurde aber keine Differenzierung dieser Subtypen vorgenommen. Für unseren Vergleich zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Mäusen wurden voraktivierte zytotoxische T-Zellen als IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen definiert. In der Milz zeigte sich kein Unterschied in der Frequenz IFN $\gamma$ -positiver Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen WT- und CD38<sup>-/-</sup> Mäusen. Im Darm waren die Frequenzen der IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen in beiden Mausstämmen deutlich niedriger. Interessanterweise war der Anteil an IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen aber in allen untersuchten Darmgeweben der CD38<sup>-/-</sup> Mäuse höher als in denen der WT-Tiere. Anhand dieses Ergebnisses hätte CD38 einen Einfluss auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Darmmukosa. Hier ist aber zu bedenken, dass in unseren Analysen die CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen in der Darmmukosa nicht weiter nach konventionellen und unkonventionellen T-Zellen differenziert wurden. Eine veränderte Zusammensetzung dieser Zellpopulationen könnte für die Unterschiede der Anteile von IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich sein. Weiterhin wurden nur Anteile, aber keine absoluten Zellzahlen ermittelt, was auch zur Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse beiträgt. In künftigen Experimenten ist es daher notwendig, die Subpopulationen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu differenzieren. Auch eine Ermittlung der Zellzahlen wäre wünschenswert, obgleich diese Werte aufgrund der generell niedrigen T-Zellzahlen, insbesondere in der Kolonmukosa, häufig ungenau und daher kritisch zu bewerten sind.

In unseren Analysen wurden innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen die T<sub>H</sub>1 und die T<sub>H</sub>17-Zellen untersucht. Die Identifizierung erfolgte anhand der Leitzytokine IFN $\gamma$  und IL-17A. Aus Erfahrungswerten innerhalb der Arbeitsgruppe war bekannt, dass T<sub>H</sub>2-Zellen in naiven C57BL/6 Tieren nur in extrem niedrigen Zahlen vorliegen und mit der verwendeten Methode nicht nachweisbar sind. Aus diesem Grund wurden T<sub>H</sub>2-Zellen nicht in die

---

Analyse aufgenommen. In den Milzen von WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren wurden vergleichbare Prozentwerte für IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen gefunden. Mit Ausnahme der Lamina propria des Dünndarms waren in den Darmgeweben der WT-Mäuse deutlich mehr T<sub>H</sub>1 Zellen nachzuweisen als in den Geweben der CD38<sup>-/-</sup> Mäuse. IL-17A<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17-Zellen konnten in der Milz nur in sehr niedrigen Zahlen detektiert werden. In den Darmgeweben waren diese Zellen aber in beiden Mausstämmen gut nachweisbar. Vergleichbar zu den T<sub>H</sub>1-Zellen fanden sich in CD38<sup>-/-</sup> Tieren deutlich niedrigere Prozentwerte dieser Zellen als in WT-Tieren. Auch hier zeigte sich in der Lamina propria ein anderes Bild. In diesem Gewebe fanden sich in etwa vergleichbare Anteile an T<sub>H</sub>17-Zellen in WT- und CD38<sup>-/-</sup> Tieren.

Generell beobachteten wir in der Darmmukosa der CD38<sup>-/-</sup> Tiere niedrigere Frequenzen an beiden untersuchten T<sub>H</sub>-Zellpopulationen. CD38 scheint also in diesem Gewebe die Differenzierung oder das Überleben dieser Zellen zu regulieren. Als Erklärungen bieten sich an, dass in Abwesenheit von CD38 weniger T-Zellen in die Darmmukosa einwandern, oder aber, dass in CD38<sup>-/-</sup> Tieren eine vermehrte Apoptose dieser Zellen stattfindet. Ähnlich wie bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind aber auch bei der Interpretation der Ergebnisse zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmte Einschränkungen zu berücksichtigen. Wie bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen bereits diskutiert wurde, könnte eine Bestimmung der absoluten Zellzahlen das Ergebnis verändern. Weiterhin ist zu beachten, dass durch die relativ harsche Aufreinigungsprozedur von Zellen aus der Darmmukosa wahrscheinlich größere Mengen an NAD<sup>+</sup> freigesetzt werden. In Abwesenheit von CD38 könnte dies zu einer ausgeprägten ADP-Ribosylierung von P2X7 und zur verstärkten Apoptose der Zellen führen. Die hohe P2X7-Expression in T-Zellen der Darmmukosa macht diese Zellen besonders sensitiv gegenüber einer NAD<sup>+</sup> induzierten Apoptose (Heiss et al. 2008 und nicht publizierte Ergebnisse der AG Mittrücker). In weitere Analysen wäre es sinnvoll, die Apoptoserate der T-Zellen in den Darmgeweben zu bestimmen. Um Reinigungsartefakte auszuschließen, sollten ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Mäuse in die Analysen aufgenommen werden. Schließlich sollten die Ergebnisse durch histologische Untersuchungen bestätigt werden.

#### 5.4 Fazit und Ausblick

Zahlreiche Hinweise deuten darauf hin, dass CD38 neben seiner essentiellen Rolle für die Chemotaxis auch eine Funktion im extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsel ausübt. Unsere Experimente geben Anhaltspunkte auf mehrere Funktionen von CD38 in intestinalen Entzündungen. Beim Vergleich von WT-, CD38<sup>-/-</sup>, ART2<sup>-/-</sup> und ART2<sup>-/-</sup>CD38<sup>-/-</sup> Tieren zeigten sich Unterschiede, die durch die bekannte Funktion als intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisator allein nicht erklärbar sind. Hier bietet die Funktion als

---

NAD<sup>+</sup>-abbauendes Ektoenzym eine mögliche Erklärung. Zusätzlich konnten wir eine hohe Verfügbarkeit von CD38 auf T-Zellen des Darms nachweisen. Der Regelkreis aus CD38, ART2 und P2X7, der bisher für T<sub>reg</sub>-Zellen postuliert wurde, ist daher wahrscheinlich auch für T-Zellen der Darmmukosa relevant.

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen haben in der westlichen Welt mit bis zu 0,2% eine hohe Prävalenz (Cosnes et al. 2011). Seit dem letzten Jahrzehnt wurden zunehmend Einsichten in die Pathogenese dieser Erkrankungen auf zellulärer und molekularer Ebene erzielt. Dies eröffnet letztlich die Möglichkeit zur Entwicklung spezifischer Therapien. Die Antagonisierung bestimmter Zytokine zeigt – trotz der damit verbundenen Nebenwirkungen – zunehmend Erfolge, und grundsätzlich das Potential einer an den pathophysiologischen Grundlagen dieser Erkrankungen orientierten Forschung (Neurath und Finotto 2009). Bezogen auf CD38 stellt sich die Frage, inwieweit CD38-abhängige Regulationsmechanismen kausal mit der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen zusammenhängen. Da die ADP-Ribosyltransferase ART2 beim Menschen nicht vorkommt (Haag et al. 1994), wäre eine Untersuchung anderer nukleotidmetabolisierender Enzyme auf Zellen der Darmmukosa sinnvoll. Dies sind wichtige Schritte auf dem Weg zur Fragestellung, ob CD38 letztlich als pharmakologische Zielstruktur einer medikamentösen Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen in Frage kommt, wobei stets zu berücksichtigen ist, dass CD38 sowohl eine Rolle für Immunabwehr als auch für Toleranzinduktion spielt.

---

## Literaturverzeichnis

- Abadie, V., Discepolo, V., Jabri, B. (2012) Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Seminars in Immunopathology* **34**, 551 - 566.
- Abbas, A. K., Murphy, K. M., Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787 - 793.
- Abraham, C., Cho, J. H. (2009) Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine* **361**, 2066 - 2078.
- Adriouch, S., Haag, F., Boyer, O., Seman, M., Koch-Nolte, F. (2012) Extracellular NAD<sup>+</sup>: a danger signal hindering regulatory T cells. *Microbes and Infection* **14**, 1284 - 1292.
- Adriouch, S., Hubert, S., Pechberty, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., Seman, M. (2007) NAD<sup>+</sup> released during inflammation participates in T cell homeostasis by inducing ART2-mediated death of naive T cells in vivo. *The Journal of Immunology* **179**, 186 - 194.
- Adriouch, S., Ohlrogge, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., Seman, M. (2001) Rapid induction of naive T cell apoptosis by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide: Requirement for Mono(ADP-Ribosyl)Transferase 2 and a downstream effector. *The Journal of Immunology* **167**, 196 - 203.
- Aggarwal, B. B. (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* **3**, 745 - 756.
- Ahern, P. P., Izcue, A., Maloy, K. J., Powrie, F. (2008) The Interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunological Reviews* **226**, 147 - 159.
- Ahern, P. P., Schiering, C., Buonocore, S., McGeachy, M., Cua, D. J., Maloy, K. J., Powrie, P. (2010) Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* **33**, 279 - 288.
- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., Centola, M., Li, X. (2009) Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 341 - 352.
- Althaus, F. R., Richter C. (1987) ADP-Ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics* **37**. Springer-Verlag, Berlin. 216 - 218.
- Aswad, F., Kawamura, H., Dennert, G. (2005) High Sensitivity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: A role for P2X7 receptors. *The Journal of Immunology* **175**, 3075 - 3083.
- Aujla, S. J., Kolls, J. K. (2009) IL-22: A critical mediator in mucosal host defense. *Journal of Molecular Medicine* **87**, 451 - 454.

- Bäckhed, F., Ley, R. F., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915 - 1920.
- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997) Human chemokines: An update. *Annual Review of Immunology* **16**, 675 - 705.
- Bahri, R., Bollinger, A., Bollinger, T., Orinska, Z., Bulfone-Paus, S. (2012) Ectonucleotidase CD38 demarcates regulatory, memory-like CD8<sup>+</sup> T cells with IFN- $\gamma$ -mediated suppressor activities. *PLoS One* **7**, e45234.
- Barnes, M. J., Powrie, F. (2009) Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* **31**, 401 - 411.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Rüssmann, H., Hardt, W.-D. (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and Immunity* **71**, 2839 - 2858.
- Bendelac, A., Savage, P. B., Teyton, L. (2007) The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology* **25**, 297 - 336.
- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315 - 325.
- Berthelier, V., Tixier, J. M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., Deterre, P. (1998) Human CD38 is an authentic NAD(P)<sup>+</sup> glycohydrolase. *The Biochemical Journal* **330**, 1383 - 1390.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2008) Induction and effector functions of T<sub>H</sub>17 cells. *Nature* **453**, 1051 - 1057.
- Beutler, B. A. (1999) The role of tumor necrosis factor in health and disease. *The Journal of Rheumatology* **26**, Supplement 57, 16 - 21.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology* **40**, 845 - 859.
- Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 1 - 5.
- Bofill, M., Borthwick, N. J. (2000) CD38 in health and disease. In: Mehta, K., Malavasi, F. (Eds.). Human CD38 and related molecules. *Chemical Immunology* **75**. S. Karger AG, Basel. 218 - 234.
- Bonneville, M., O'Brien, R. L., Born, W. K. (2010)  $\gamma\delta$ T cell effector functions: A blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews Immunology* **10**, 467 - 478.
- Bortz, J., Schuster, C. (2010) Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 7. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 130 - 133.
- Bouma, G., Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* **3**, 521 - 533.

- Braun, J., Wei, B. (2007) Body traffic: Ecology, genetics, and immunity in inflammatory bowel disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2**, 401 - 429.
- Bromley, S. K., Mempel, T. R., Luster, A. D. (2008) Orchestrating the orchestrators: Chemokines in control of T cell traffic. *Nature Immunology* **9**, 970 - 980.
- Bruzzone, S., Franco, L., Guida, L., Zocchi, E., Contini, P., Bisso, A., Usai, C., De Flora, A. (2001) A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD<sup>+</sup> and cyclic ADP-Ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 48300 - 48308.
- Carding, S. R., Egan, P. J. (2002)  $\gamma\delta$ T cells: Functional plasticity and heterogeneity. *Nature Reviews* **2**, 336 - 345.
- Chen, J., Chen, Y.-G., Reifsnyder, P. C., Schott, W. H., Lee, C.-H., Osborne, M., Scheuplein, F., Haag, F., Koch-Nolte, F., Serreze, D. V., Leiter, E. H. (2006a) Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-Ribosyltransferase 2-dependent fashion. *The Journal of Immunology* **176**, 4590 - 4599.
- Chen, Y. G., Chen, J., Osborne, M. A., Chapman, H. D., Besra, G. S., Porcelli, S. A., Leiter, E. H., Wilson, S. B., Serreze, D. V. (2006b) CD38 is required for the peripheral survival of immunotolerogenic CD4<sup>+</sup> invariant NK T cells in nonobese diabetic mice. *The Journal of Immunology* **177**, 2939 - 2947.
- Chen, Y. G., Scheuplein, F., Driver, J. P., Hewes, A. A., Reifsnyder, P. C., Leiter, E. H., Serreze, D. V. (2011) Testing the role of P2X7 receptors in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *The Journal of Immunology* **186**, 4278 - 4284.
- Cherayil, B. J., Chaitovitz, S., Wong, C., Pillai, S. (1990) Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *PNAS* **87**, 7324 - 7328.
- Cheroutre, H. (2004) Starting at the beginning: New perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annual Review of Immunology* **22**, 217 - 264.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156 - 159.
- Clapham, D. E. (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047 - 1058.
- Cockayne, D. A., Muchamuel, T., Grimaldi, J. C., Muller-Steffner, H., Randall, T. D., Lund, F. E., Murray, R., Schuber, F., Howard, M. C. (1998) Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* **92**, 1324 - 1333.
- Coffman R.L., Carty J. (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by Interferon- $\gamma$ . *The Journal of Immunology* **136**, 949 - 954.

- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., Sedergran, D. J. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation* **69**, 238 - 249.
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., Cortot, A. (2011) Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1785 - 1794.
- Couper, K. N., Blount, D. G., Riley, E. M. (2008) IL-10: The master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology* **180**, 5771 - 5777.
- Dale, D. C., Boxer, L., Liles, W.C. (2008) The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935 - 945.
- Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S., Albina, J. E. (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of Leukocyte Biology* **83**, 64 - 70.
- De Flora, A., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Usai, C., Zocchi, E. (2000) Topology of CD38. In: Mehta, K., Malavasi, F. (Eds.). Human CD38 and related molecules. *Chemical Immunology* **75**. S. Karger AG, Basel. 79 - 98.
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E. (1997) The CD38/cyclic ADP-Ribose system: A topological paradox. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29**, 1149 - 1166.
- De Flora, A., Zocchi, E., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S. (2004) Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD<sup>+</sup>/cyclic ADP-Ribose system. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1028**, 176 - 191.
- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D. Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjoyji, K, Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., Robson, S. C. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 1257 - 1265.
- Deaglio, S., Malavasi, F. (2006) The CD38/CD157 mammalian gene family: An evolutionary paradigm for other leukocyte surface enzymes. *Purinergic Signalling* **2**, 431 - 441.
- Deaglio, S., Mehta, K., Malavasi, F. (2001) Human CD38: A (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leukemia Research* **25**, 1 - 12.
- Deaglio, S., Robson, S. C. (2011) Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances in Pharmacology* **61**, 301 - 332.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Aydin, S., Ferrero, E., Malavasi, F. (2006) In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **108**, 1135 - 1144.



- Delves, P. J., Roitt, I. M. (2000a) The immune system – First of two parts. *The New England Journal of Medicine* **343**, 37 - 49.
- Delves, P. J., Roitt, I. M. (2000b) The immune system – Second of two parts. *The New England Journal of Medicine* **343**, 108 - 117.
- Deshpande, D. A., White, T. A., Dogan, S., Walseth, T. F., Panettieri, R. A., Kannan, M. S. (2004) CD38/cyclic ADP-Ribose signaling: Role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **288**, 773 - 788.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J. M., Venketaraman, V., Baricordi, O. R. (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death and Differentiation* **5**, 191 - 199.
- Du Pré, M. F., van Berkel, L. A., Ráki, M., van Leeuwen, M. A., de Ruiter, L. F., Broere, F., ter Borg, M. N. D., Lund, F. E., Escher, J. C., Lundin, K. E. A., Sollid, L. M., Kraal, G., Nieuwenhuis, E. E. S., Samsom, J. N. (2011) CD62L<sup>neg</sup>CD38<sup>+</sup> expression on circulating CD4<sup>+</sup> T cells identifies mucosally differentiated cells in protein fed mice and in human celiac disease patients and controls. *The American Journal of Gastroenterology* **106**, 1147 - 1159.
- Duerkop, B. A., Vaishnav, S., Hooper, L. V. (2009) Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* **31**, 368 - 376.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: Production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry* **267**, 4315 - 4324.
- Eberl, G. (2005) Inducible lymphoid tissues in the adult gut: Recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nature Reviews Immunology* **5**, 413 - 420.
- Eberl, G. (2010) A new vision of immunity: Homeostasis of the superorganism. *Mucosal Immunology* **3**, 450 - 460.
- Ehrlich, P., Morgenroth, J. (1901) Ueber Hämolyse. *Berliner Klinische Wochenschrift* **38**, 251 - 257.
- Elson, C. O., Cong, Y., McCracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G., Weaver, C. T. (2009) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews* **206**, 260 - 276.
- Epple, H. J., Allers, K., Tröger, H., Köhl, A., Erben, U., Fromm, M., Zeitz, M., Lodenkemper, C., Schulzke, J. D., Schneider, T. (2010) Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology* **139**, 1289 - 1300.
- Estrada-Figueroa, L. A., Ramírez-Jiménez, Y., Osorio-Trujillo, C., Shibayama, M., Navarro-García, F., García-Tovar, C., Talamás-Rohana (2011) Absence of CD38 delays arrival of neutrophils to the liver and innate immune response

- development during hepatic amoebiasis by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunology* **33**, 661 - 668.
- Falbe, J., Regitz, M. (1997) Lexikonartikel „Dextransulfate“. In: Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.). RÖMPP Lexikon Chemie. 10. Aufl., 2. Bd. Thieme, Stuttgart. S. 927.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., Di Virgilio, F. (2006) The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release. *The Journal of Immunology* **176**, 3877 - 3883.
- Feuerer, M., Hill, J. A., Mathis, D., Benoist, C (2009) Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: Differentiation, specification, subphenotypes. *Nature Immunology* **10**, 689 - 695.
- Friedman, S., Blumberg, R. S. (2012) Inflammatory Bowel Disease. In: Longo, D. L., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L., Loscalzo, J (Eds.). Harrison's Principles of Internal Medicine. 18. Ed., Vol. 2. McGraw-Hill Medical, New York. 2478 - 2479.
- Gallucci, S., Matzinger, P. (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology* **13**, 114 - 119.
- Garrett, W. S., Gordon, J. I., Glimcher, L. H. (2010) Homeostasis and inflammation in the Intestine. *Cell* **140**, 859 - 870.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., Ley, K. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656 - 661.
- Glowacki, G., Braren, R., Firner, K., Nissen, M., Kühl, M., Reche, P., Bazan, F., Cetkovic-Cvrlje, Leiter, E., Haag, F., Koch-Nolte, F (2002) The family of toxin-related Ecto-ADP-Ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Science* **11**, 1657 - 1670.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. (2005) The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology* **23**, 515 - 548.
- Grimm, M. C., Doe, W. F. (1996) Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: Expression of RANTES, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and  $\gamma$ -Interferon-Inducible Protein-10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas. *Inflammatory Bowel Disease* **2**, 88 - 96.
- Grimm, M. C., Elsbury, S. K., Pavli, P., Doe, W. F. (1996) Enhanced expression and production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of Leukocyte Biology* **59**, 804 - 812.
- Guse, A. H. (1999) Cyclic ADP-Ribose: A novel Ca<sup>2+</sup>-mobilising second messenger. *Cellular Signalling* **11**, 309 - 316.
- Haag, F., Adriouch, S., Braß, A., Jung, C., Möller, S., Scheuplein, F., Bannas, P., Seman, M., Koch-Nolte, F. (2007) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling* **3**, 71 - 81.

- Haag, F., Freese, D., Scheublein, F., Ohlrogge, W., Adriouch, S., Seman, M., Koch-Nolte, F. (2002) T Cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD. *Developmental Immunology* **9**, 197 - 202.
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Kühl, M., Lorenzen, S., Thiele, H.-G. (1994) Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *Journal of Molecular Biology* **243**, 537 - 546.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Weaver, C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* **6**, 1123 - 1132.
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., Pacher, P. (2008) Adenosine receptors: Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 759 - 770.
- Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D., Thornton, D. J., Png, C. W., Crockford, T. L., Cornall, R. J., Adams, R., Kato, M., Kelms, N. A., Hong, N. A., Florin, T. H. J., Goodnow, C. C., McGuckin, M. A. (2008) Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Medicine* **5**, 440 - 460.
- Heine, H., Lien, E. (2003) Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *International Archives of Allergy and Immunology* **130**, 180 - 192.
- Heiss, K., Jänner, N., Mähneß, B., Schumacher, V., Koch-Nolte, F., Haag, F., Mittrücker, H. W. (2008) High sensitivity of intestinal CD8<sup>+</sup> T cells to nucleotides indicates P2X7 as a regulator for intestinal T cell responses. *The Journal of Immunology* **181**, 3861 - 3869.
- Hirata, Y., Kimura, N., Sato, K., Ohsugi, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Ishikawa, J., Kaisho, T., Ishihara, K., Hirano, T. (1994) ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Letters* **356**, 244 - 248.
- Höpken, U. E., Lipp, M. (2004) All roads lead to Rome: Triggering dendritic cell migration. *Immunity* **20**, 244 - 246.
- Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A., Sly, P. D. (1999) The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402**, Supplement, B12 - 17.
- Honda, K., Takeda, K. (2009) Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunology* **2**, 187 - 196.
- Hong, S., Brass, A., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., Dubyak, G. R. (2007) Lipopolysaccharide, IFN- $\gamma$ , and IFN- $\beta$  induce expression of the thiol-sensitive

- ART2.1 Ecto-ADP-Ribosyltransferase in murine macrophages. *The Journal of Immunology* **179**, 6215 - 6227.
- Hong, S., Schwarz, N., Brass, A., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., Schilling, W. P., Dubyak, G. R. (2009) Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular nicotinamide adenine dinucleotide and Ecto-ADP-Ribosyltransferases in murine macrophages and T cells. *The Journal of Immunology* **183**, 578 – 592.
- Hooper, L. V., Gordon, J. I. (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**, 1115 - 1118.
- Horenstein, A. L., Stockinger, H., Imhof, B. A., Malavasi, F. (1998) CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31. *The Biochemical Journal* **330**, 1129 - 1135.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061.
- Howard, M., Grimaldi, J. C., Bazan, J. F., Lund, F. E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R. M. E., Walseth, T. F., Lee, H. C. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-Ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**, 1051-1059.
- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., Adriouch, S. (2010) Extracellular NAD<sup>+</sup> shapes the Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 2561 - 2568.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M. C., Cua, D. J., McKenzie, B. S., Powrie, F., Maloy, K. J. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 2473 - 2483.
- Ishihara, K., Hirano, T. (2000) BST-1/CD157 regulates the humoral immune responses in vivo. In: Mehta, K., Malavasi, F. (Eds.). Human CD38 and related molecules. *Chemical Immunology* **75**. S. Karger AG, Basel. 235 - 255.
- Ito, R., Kita, M., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Iwakura, Y., Okanoue, T., Yoshikawa, T., Kataoka, K., Mazda, O. (2008) Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**, 12 - 16.
- Iwasaki, A. (2007) Mucosal dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **25**, 381 - 418.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., Song, S. (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**, 527 - 538.

- 
- Izcue, A., Coombes, J. L., Powrie, F (2009) Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology* **27**, 313 - 338.
- Janeway, C. A. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **54**, 1 - 13.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* **20**, 197 - 216.
- Jang, M. H., Kweon, M. N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P. D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., Kiyono, H. (2004) Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *PNAS* **101**, 6110 - 6115.
- Jin, D., Liu, H. X., Hirai, H., Torashima, T., Nagai, T., Lopatina, O., Shnayder, N. A., Yamada, K., Noda, M., Seike, T., Fujita, K., Takasawa, S., Yokoyama, S., Koizumi, K., Shiraishi, Y., Tanaka, S., Hashii, M., Yoshihara, T., Higashida, K., Islam, M. S., Yamada, N., Hayashi, K., Noguchi, N., Kato, I., Okamoto, H., Matsushima, A., Salmina, A., Munesue, T., Shimizu, N., Mochida, S., Asano, M., Higashida, H. (2007) CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature* **446**, 41 - 45.
- Johansen, F. E., Pekna, M., Norderhaug, I. N., Haneberg, B., Hietala, M. A., Krajci, P., Betsholtz, C., Brandtzaeg, P. (1999) Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* **7**, 915 - 921.
- Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G. C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *PNAS* **150**, 15064 - 15069.
- Johansson-Lindbom, B., Agace, W. W. (2007) Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological Reviews* **215**, 226 - 242.
- Johnson, J. D., Ford, E. L., Bernal-Mizrachi, E., Kusser, K. L., Luciani, D. S., Han, Z., Tran, H., Randall, T. D., Lund, F. E., Polonsky, K. S. (2006) Suppressed insulin signaling and increased apoptosis in CD38-null islets. *Diabetes* **55**, 2737 - 2746.
- Josefowicz, S. Z., Rudensky, A. (2009) Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* **30**, 616 - 625.
- Junger, W. G. (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology* **11**, 201 - 212.
- Kahl, S., Nissen, M., Girisch, R., Duffy, T., Leiter, E. H., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2000) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse Ecto-ADP-

- Ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. *The Journal of Immunology* **165**, 4463 - 4469.
- Kamanaka, M., Kim, S. T., Wan, Y. Y., Sutterwala, F. S., Lara-Tejero, M., Galán, J. E., Harhaj, E., Flavell, R. A. (2006) Expression of Interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an Interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* **25**, 941 - 952.
- Kanaitsuka, T., Bortell, R., Stevens, L. A., Moss, J., Sardinha, D., Rajan, T. V., Zipris, D., Mordes, J. P., Greiner, D. L., and Rossini, A. A. (1997) Expression in BALB/c and C57BL/6 mice of Rt6-1 and Rt6-2 ADP-Ribosyltransferases that differ in enzymatic activity: C57BL/6 Rt6-1 is a natural transferase knockout. *The Journal of Immunology* **159**, 2741 - 2749.
- Kapsenberg, M. L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T cell polarization. *Nature Reviews Immunology* **3**, 984 - 993.
- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R. S. (2010) Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology* **28**, 573 - 621.
- Kaufmann, S. H. E. (2002) Protection against tuberculosis: Cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the Rheumatic Disease* **61**, Supplement II, 54 - 58.
- Kawamura, H., Aswad, F., Minagawa, M., Malone, K., Kaslow, H., Koch-Nolte, F., Schott, W. H., Leiter, E. H., Dennert, G. (2005) P2X7 receptor-dependent and -independent T cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *The Journal of Immunology* **174**, 1971 - 1979.
- Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T. (1992) Interleukin-6 and its receptor: A paradigm for cytokines. *Science* **258**, 593 - 597.
- Klein, J. (1999) Self-nonself discrimination, histoincompatibility, and the concept of immunology. *Immunogenetics* **50**, 116 - 123.
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M. T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., Hibi, T. (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**, 1682 - 1689.
- Koch-Nolte, F., Adriouch, S., Bannas, P., Krebs, C., Scheuplein, F., Seman, M., Haag, F. (2006) ADP-Ribosylation of membrane proteins: Unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Annals of Medicine* **38**, 188 - 199.
- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Killeen, N., Ablamunits, V., Haag, F., Leiter, E. H. (1999) A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse Ecto-ADP-Ribosyltransferase on T cells: Subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *The Journal of Immunology* **163**, 6014 - 6022.

- Koch-Nolte, F., Fischer, S., Haag, F., Ziegler, M. (2011) Compartmentation of NAD<sup>+</sup>-dependent signalling. *FEBS Letters* **585**, 1651 - 1656.
- Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., Thiele, H. G. (1996) Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein Mono-(ADP-Ribosyl-)Transferases and share secondary structure motifs with ADP-Ribosylating bacterial toxins. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 7686 - 7693.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology* **27**, 485-517.
- Krebs, C., Adriouch, S., Braasch, F., Koestner, W., Leiter, E. H. Seman, M., Lund, F. E., Oppenheimer, N., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2005) CD38 controls ADP-Ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-Ribosylation of T cell surface proteins. *The Journal of Immunology* **174**, 3298-3305.
- Kufer, T. A., Banks, D. J., Philpott, D. J. (2006) Innate immune sensing of microbes by NOD proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**, 19 - 27.
- La Sala, A., Ferrari, D., Di Virgilio, F., Idzko, M., Norgauer, J., Girolomoni, G. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *Journal of Leukocyte Biology* **73**, 339 - 343.
- Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P., Ma, A. (2000) Failure to regulate TNF-Induced NF- $\kappa$ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**, 2350 - 2354.
- Lee, H. C. (2001) Physiological functions of cyclic ADP-Ribose and NAADP as calcium messengers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **41**, 317 - 345.
- Lee, H. C., Munshi, C., Graeff, R. (1999) Structures and activities of cyclic ADP-Ribose, NAADP and their metabolic enzymes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **193**, 89 - 98.
- Lefrançois, L., Puddington, L. (2006) Intestinal and pulmonary mucosal T cells: Local heroes fight to maintain the status quo. *Annual Review of Immunology* **24**, 681 - 704
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyzna, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., Hamann, A. (2002) Expression of the integrin  $\alpha$ E $\beta$ 4 identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *PNAS* **99**, 13031 - 13036.
- Littman, D. R., Rudensky, A. Y. (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* **140**, 845 - 858.
- Liu, Q., Kriksunov, I. A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H. C., Hao, Q. (2005) Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure* **13**, 1331 - 1339.
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and Mig:

- structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **184**, 963 - 969.
- Löffler, G. (2003) Vitamine. In: Löffler, G., Petriedes, P. E. (Hrsg.). *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl. Springer-Verlag, Berlin. S. 741.
- Lund, F. E. (2006) Signaling Properties of CD38 in the Mouse Immune System: Enzyme-dependent and -independent Roles in Immunity. *Molecular Medicine* **12**, 328 - 333.
- Lund, F. E., Cockayne, D. A., Randall, T. D., Solvason, N., Schuber, F., Howard, M. C. (1998) CD38: A new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunological Reviews* **161**, 79 - 93.
- Lund, F. E., Naixuan, Y., Kwang-Myong, K., Reth, M., Howard, M. C. (1996) Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *The Journal of Immunology* **157**, 1455 - 1567.
- Lund, F. E., Solvason, N., Grimaldi, J. C., Michael E., Parkhouse, R., Howard, M. C. (1995) Murine CD38: An immunoregulatory ectoenzyme. *Immunology Today* **16**, 469 - 473.
- MacDonald, T. T., Monteleone, G. (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307**, 1920 - 1925.
- Macpherson, A. J., Harris, N. L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology* **4**, 478 - 485.
- Madshus, I. H., Stenmark, H. (1992) Entry of ADP-Ribosylating-Toxins into cells. In: Aktories, K. (Ed.). *ADP-Ribosylating Toxins. Current Topics in Microbiology and Immunology* **125**. Springer Verlag, Berlin. S. 4.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Damle, R., Cutrona, G., Ferrarini, M., Chiorazzi, N. (2011) CD38 and chronic lymphocytic leukemia: A decade later. *Blood* **118**, 3470 - 3478.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., Aydin, S (2008) Evolution and function of the ADP Ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological Reviews* **88**, 841 - 886.
- Maloy, K. J. (2008) The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *Journal of Internal Medicine* **263**, 584 - 590.
- Maloy, K. J., Kullberg M. C. (2008) IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunology* **1**, 339 - 349.
- Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L. M., Maxfield, F. R., Muller, W. A. (2003) Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* **421**, 748 - 753.
- Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D. R. (2008) The differentiation of human T<sub>H</sub>-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ t. *Nature Immunology* **9**, 641 - 649.



- Manson, J., Thiemermann, C., Brohi, K. (2012) Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *British Journal of Surgery* **99**, Supplement 1, 12 - 20.
- Mark, H. F., Bikales, N. M., Overberger, C. G., Menges, G., Kroschwitz, J. I. (1986) Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. 2. Ed., Vol. 4: Composites, Fabrication to Die Design. John Wiley & Sons, New York. 763 - 764.
- Masumoto, J., Yang, K., Varambally, S., Hasegawa, M., Tomlins, S. A., Qiu, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Foster, S. J., Horie, Y., Mak, T. W., Núñez, G., Chinnaiyan, A. M., Fukase, K., Inohara, N. (2006) NOD1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 203 - 213.
- Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* **12**, 991 - 1045.
- Matzinger, P. (2002) The danger model: A renewed sense of self. *Science* **296**, 301 - 305.
- Maynard, C. L., Weaver, C. T. (2009) Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* **31**, 389 - 400.
- McGeachy, M. J., Cua, D. J. (2008) Th17 Cell Differentiation: The long and winding road. *Immunity* **28**, 445 - 453.
- McKenzie, B. S., Kastelein, R. A., Cua, D. J. (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology* **27**, 17 - 23.
- Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428 - 435.
- Mege, J.-L., Meghari, S., Honstetter, A., Capo, C., Raoult, D. (2006) The two faces of Interleukin 10 in human infectious diseases. *The Lancet - Infectious Diseases* **6**, 557 - 569.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* **19**, 683 - 765.
- Moreschi, I., Bruzzone, S., Nicholas, R. A., Fruscione, F., Sturla, L., Benvenuto, F., Usai, C., Meis, S., Kassack, M. U., Zocchi, E., De Flora, A. (2006) Extracellular NAD<sup>+</sup> is an agonist of the human P2Y<sub>11</sub> purinergic receptor in human granulocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 31419 - 31429.
- Mosmann, V. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. *The Journal of Immunology* **136**, 2348 - 2357.
- Mülhardt, C. (2009) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 109 - 114.
- Murdoch, C., Finn, A. (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95**, 3032 - 3043.

- 
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2008) Janeway's Immunobiology. 7. Ed. Garland Science, New York, London. 83 - 86.
- Musso, T., Deaglio, S., Franco, L., Calosso, L., Badolato, R., Garbarino, G., Dianzani, U., Malavasi, F. (2001) CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN- $\gamma$  on human monocytes and monocytic cell lines. *Journal of Leukocyte Biology* **69**, 605 - 612.
- Nemoto, E., Yu, Y., Dennert, G. (1996) Cell surface ADP-Ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *The Journal of Immunology* **157**, 3341 - 3349.
- Neurath, M. F., Finotto, S. (2009) Translating inflammatory bowel disease research into clinical medicine. *Immunity* **31**, 357 - 361.
- North, A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews* **82**, 1013 - 1067.
- O'Brien, A., Lahn, M., Born, W. K., Huber, S. A. (2001) T cell receptor and function cosegregate in gamma-delta T cell subsets. In: Bergstresser, P. R., Takashima, A. (Eds.). Gamma-Delta T Cells. *Chemical Immunology* **79**. S. Karger AG, Basel. 1-28.
- O'Shea, J. J., Tato, C. M., Siegel, R. (2008) Cytokines and cytokine receptors. In: Rich, R. R., Shearer, W. T., Fleisher, T. A., Schroeder, H. W., Weyand, C. M., Frew, A. J. (Eds.). Clinical Immunology. 3. Ed. Elsevier, Amsterdam. 165 - 166.
- Ohlrogge, W., Haag, F., Löhler, J., Seman, M., Littman, D. R., Killeen, N., Koch-Nolte, F. (2002) Generation and characterization of Ecto-ADP-Ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 7535 - 7542.
- Okamoto, S., Azhipa, O., Yu, Y., Russo, E., Dennert, G. (1998) Expression of ADP-Ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *The Journal of Immunology* **160**, 4190 - 4198.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaja, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 649 - 702.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y.-J., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., Kastelein, R. A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715 - 725.
- Orange, J. S., Ballas, Z. (2006) Natural killer cells in human health and disease. *Clinical Immunology* **118**, 1 - 10.
- O'Reilly, T., Niven, D. F. (2003) Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be growth-limiting for *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae and *Haemophilus parasuis*. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **67**, 229 - 231.
- Ouyang, W., Valdez, P. (2008) IL-22 in mucosal immunity. *Mucosal Immunology* **1**, 335 - 338.
- Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., Lenardo, M. J. (2007) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature Immunology* **8**, 1353 - 1362.
- Partida-Sánchez, S., Cockayne, D. A., Monard, S., Jacobson, E. L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T. D., Lund, F. E. (2001) Cyclic ADP-Ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nature Medicine* **7**, 1209 - 1216.
- Partida-Sánchez, S., Gasser, A., Fliegert, R., Siebrands, C. C., Dammermann, W., Shi, G., Mousseau, B. J., Sumoza-Toledo, A., Bhagat, H., Walseth, T. F., Guse, A. H., Lund, F. E. (2007) Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by ADP-Ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. *The Journal of Immunology* **179**, 7827 - 7839.
- Partida-Sánchez, S., Goodrich, S., Kusser, K., Oppenheimer, N., Randall, T. D., Lund, F. E. (2004) Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-Ribosyl cyclase CD38: Impact on the development of humoral immunity. *Immunity* **20**, 279 - 291.
- Patton, D. T., Wilson, M. D., Rowan, W. C., Soond, D. R., Okkenhaug, K (2011) The PI3K p110 $\delta$  regulates expression of CD38 on regulatory T cells. *PLoS One* **6**, e17359.
- Paul, W. E., Zhu, J. (2010) How are T<sub>H</sub>2-type immune responses initiated and amplified? *Nature Reviews Immunology* **10**, 225 - 235.
- Pelegri, P., Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and Interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO Journal* **25**, 5071 - 5082.
- Podack, E. R. (1995) Functional significance of two cytolytic pathways of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **57**, 548 - 552.
- Postigo, J., Iglesias, M., Cerezo-Wallis, D., Rosal-Vela, A., García-Rodríguez, S., Zubiaur, M., Sancho, J., Merino, R., Merino, J. (2012) Mice deficient in CD38 develop an attenuated form of collagen Type II-induced arthritis. *PLoS One* **7**, e33534.
- Ramasundara, M., Leach, S. T., Lemberg, D. A., Day, A. S. (2009) Defensins and inflammation: The role of defensins in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **24**, 202 - 208.

- Read, S., Malmström, V., Powrie, S. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* **192**, 295 - 302.
- Renz-Polster, H. Krautzig, S. (2008) Basislehrbuch Innere Medizin. 4. Aufl. Urban & Fischer, München, Jena. 356 - 357.
- Riedelsheimer, B., Welsch, U. (2010) Färbungen. In: Mulisch, M., Welsch, U. (Hrsg.). Romeis Mikroskopische Technik, 18. Aufl. Springer Akademischer Verlag Heidelberg. 199 - 206.
- Rollins, B. J. (2000) MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, and MCP-5. In: Oppenheim, J. J., Feldmann, M. (Eds.). Cytokine Reference. Vol. 2. Academic Press, San Diego. 1145 - 1157.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., Hafler, D. A. (2010) Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nature* **10**, 490 - 500.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). *The Journal of Immunology* **155**, 151 - 164.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775 - 787.
- Salmi, M., Jalkanen, S. (2005) Cell surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nature Reviews Immunology* **5**, 760 - 771.
- Sansonetti, P.J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology* **4**, 953 - 564.
- Särndal, C. E., Swensson, B., Wretman, J. (1992) Model Assisted Survey Sampling. Springer-Verlag, Berlin. S. 16.
- Savage, D. C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology* **31**, 107 - 133.
- Schaller, E., Macfarlane, A. J., Rupec, R. A., Gordon, S., McKnight, A. J., Pfeffer, K. (2002) Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 8035 - 8043.
- Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Krebs, C., Bannas, P., Rissiek, B., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2009) NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *The Journal of Immunology* **182**, 2898 - 2908.
- Schneider, B. E., Korb, D., Hagens, K., Koch, M., Raupach, B., Enders, J., Kaufmann, S. H. E., Mittrücker, H. W., Schaible, U. E. (2010) A role for IL-18 in protective immunity against Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Immunology* **40**, 396 - 405.

- Schuber, F., Lund, F. E. (2004) Structure and enzymology of ADP-Ribosyl cyclases: Conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Current Molecular Medicine* **4**, 249 - 261.
- Schwarz, N. (2009) Aktivierung des P2X7-Purinrezeptors der Maus (*Mus musculus*; Linnaeus, 1758) durch kovalent und nicht-kovalent gebundene Liganden. Naturwissenschaftliche Dissertation. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg.
- Schwarz, N., Fliegert, R., Adriouch, S., Seman, M., Guse, A. H., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2009) Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. *Purinergic Signalling* **5**, 139-149.
- Segal, A. W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* **23**, 197 - 223.
- Seman, M., Adriouch, S., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2004) Ecto-ADP-Ribosyltransferases (ARTs): Emerging actors in cell communication and signalling. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 857 - 872.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., Koch-Nolte, F. (2003) NAD-Induced T cell death: ADP-Ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* **19**, 571 - 582.
- Shevach, E. M. (2009) Mechanisms of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**, 636 - 645.
- Singh, B., Read, S., Asseman, C., Malmström, V., Mottet, C., Stephens, L. A., Stepankova, R., Tlaskalova, H., Powrie, F. (2001) Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunological Reviews* **182**, 190 - 200.
- States, D. J., Walseth, T. F., Lee, H. C. (1992) Similarities in amino acid sequences of *Aplysia* ADP-Ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 495.
- Stefan, C., Jansen, S., Bollen, M. (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: Unity in diversity. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 542 - 550.
- Steinman, R. M., Banchereau, J. (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419 - 426.
- Strober, W., Fuss, I. J., Blumberg, R. S. (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual Review of Immunology* **20**, 495 - 549.
- Takedatsu, H., Michelsen, K. S., Wei, B., Landers, C. J., Thomas, L. S., Dhall, D., Braun, J., Targan, S. R. (2008) TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T helper (T<sub>H</sub>) 1 and T<sub>H</sub>17 activation. *Gastroenterology* **135**, 552 - 567.
- Uhlig, H. H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tannapfel, A., Fontenot, J. D., Ramsdell, F., Powrie, F. (2006) Characterization of

- Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and IL-10-secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells during cure of colitis. *The Journal of Immunology* **177**, 5852 - 5860.
- Varol, C., Zigmond, E., Jung, S. (2010) Securing the immune tightrope: Mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nature Reviews Immunology* **10**, 415 - 426.
- Viegas, M. S., do Carmo, A., Silva, T., Seco, F., Serra, V., Lacerda, M., Martins, T. C. (2007) CD38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of Th1 immune responses against *Mycobacterium avium*. *Microbes and Infection* **9**, 847 - 854.
- Wang, J., Nemoto, E., Dennert, G. (1997) Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored Ecto-ADP-Ribosyltransferase. In: Haag, F., Koch-Nolte, F. (Eds.). ADP-Ribosylation in animal tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **419**. Plenum Press, New York. 191 - 202.
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E. (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology* **25**, 821 - 852.
- Xavier, R. J., Podolsky, D. K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427 - 434.
- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., Oppenheim, J. J. (2002) Mammalian defensins in immunity: More than just microbicidal. *Trends in Immunology* **23**, 291 - 295.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389 - 395.
- Zaunders, J. J., Dyer, W. B., Munier, M. L., Ip, S., Liu, J., Amyes, E., Rawlinson, W., De Rose, R., Kent, S. J., Sullivan, J. S., Cooper, D. A., Kelleher, A. D. (2006) CD127<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CD38<sup>+++</sup> CD4<sup>+</sup> Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to Vaccinia virus and precede development of Interleukin-2<sup>+</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of Virology* **80**, 10151 - 10161.
- Zhao, Y. J., Lam, C. M. C., Lee, H. C. (2012) The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Science Signalling* **5**, ra67, 1 - 11.
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D. E., Leonard, W. J., Littman, D. R. (2007) IL-6 programs T<sub>H</sub>-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* **8**, 967 - 974.
- Zilber, M. T., Gregory, S., Mallone, R., Deaglio, S., Malavasi, F., Charron, D., Gelin, C. (2000) CD38 expressed on human monocytes: A coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *PNAS* **97**, 2840 - 2845.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker. Ich danke für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, für die Diskussionsbereitschaft sowie für die ständige und freundschaftliche Mühe um mein Fortkommen. Ein ganz besonderer Dank auch an Frau Valéa Schumacher für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden sowie für die organisatorische und praktische Unterstützung bei den Versuchen.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte, Herrn Prof. Dr. Friedrich Haag sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Mittrücker und des gesamten Instituts danke ich für die Unterstützung, für die zahlreichen Tipps bei praktischen Problemen, für den bereichernden Gedankenaustausch und besonders für das hervorragend gute Arbeitsklima im Institut.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Catherine Meyer-Schwesinger aus der Nephrologie sowie Frau Mariola Reszka und Herrn Dr. Joachim Velden aus dem Institut für Pathologie für die Herstellung und Färbung der Paraffinschnitte sowie für die Erstellung der histopathologischen Befunde.

Frau Astrid Peters und Herrn Dr. Gunter Zahner aus der Nephrologie danke ich für die umfangreiche Unterstützung bei der Etablierung und Verbesserung der Real-Time PCR. Ein Dank auch an Herrn Hartwig Wieland aus der Kardiologie und Frau Kristin Klätschke aus der Klinischen Chemie für die Unterstützung bei der RNA-Aufreinigung und der Konzentrationsbestimmung. Ein großer Dank auch an Frau Christiane Beig und alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Versuchstierhaltung.

Ich danke Frau Prof. Dr. Gisa Tiegs für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ und die damit einhergehende finanzielle und fachliche Förderung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen beiden Schwestern, deren Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat. Ein großer Dank an meine Schwester Christiane für das Korrekturlesen und die zahlreichen Tipps zur Formatierung der Arbeit.

Lebenslauf



## Publikation

- 2009            Posterpublikation:  
32nd Symposium of the North German Immunologists, Borstel  
Schneider, M., Velden, J., Schumacher, V., Mittrücker, H. W.  
„The role of CD38 in murine colitis.“

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....