

Aus der Medizinischen Klinik für
Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Subzellulär-differenzielle Expression von MICA-Allelen
in einem Zöliakie-Zellkulturmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alice Eleonor Itzlinger

aus Wien

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
Abstract	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Zöliakie	1
1.1.1 Historisches	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Klinik	3
1.1.3.1 Klinische Verlaufsformen	3
1.1.3.2 Komplikationen	6
1.1.4 Pathophysiologie	6
1.1.4.1 Gluten	6
1.1.4.2 Genetische Grundlagen	7
1.1.4.3 T-Zell-Antwort bei Zöliakie	8
1.1.5 Diagnostik	10
1.1.6 Therapie	12
1.1.6.1 Die glutenfreie Diät (GFD)	12
1.1.6.2 Neue Therapiemodelle	13
1.2 MICA und NKG2D	15
1.2.1 Expression des NKG2D-Rezeptors	16
1.2.2 Expressionsmuster von NKG2D-Liganden	17
1.2.2.1 Der NKG2D-Ligand MICA	17
1.2.2.2 Bedeutung des MICA bei der Zöliakie	20
1.2.2.3 Biologische Merkmale von MICA in Abhängigkeit vom Genotyp	21
1.3 Assoziation von MICA-Allelen und klinischem Verlauf der Zöliakie	22
1.4 Studienergebnisse von Kamel 2014 und weiterführende Analysen zur subzellulären Lokalisation von MICA	23
2 Zielsetzung	26
3 Materialien und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Materialien und Geräte	27

3.1.2	Chemikalien und Primer	29
3.1.3	Antikörper	31
3.1.4	Lösungen.....	33
3.1.3	Experimentier-Kits	37
3.1.5	Anwenderprogramme	38
3.1.6	Epithel- und Expressionszelllinien	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Erhalt der MIC-cDNAs und Konstruktion der MICA/B-Vektoren	39
3.2.2	Plasmidsubklonierung	40
3.2.3	Transformation	42
3.2.4	Plasmidpräparation mittels Mini-Prep.....	43
3.2.5	Restriktionsanalyse mit PstI	43
3.2.6	Plasmidpräparation mittels Midi-Prep.....	44
3.2.7	Konzentrationsbestimmung der DNA	44
3.2.8	Zellkultur mit Caco-2-bbe-Zellen	44
3.2.9	Transiente Transfektion der Caco-2-bbe-Zellen.....	45
3.2.9.1	Nukleofektion.....	45
3.2.9.2	Lipofektion	46
3.2.10	Stabile Transfektion der Caco-2-bbe-Zellen.....	46
3.2.10.1	Abtötungskurve	47
3.2.11	Immunfluoreszenzfärbungen	48
3.2.12	Fluoreszenzmikroskopie.....	48
3.2.13	Konfokale Mikroskopie	49
3.2.14	Western Blot.....	50
3.2.15	Durchflusszytometrie	53
3.2.16	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands.....	54
3.3	Statistik.....	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Feststellung der Sequenz der MICA/B-Konstrukte	56
4.2	Nachweis der MICA/B- und HA-Expression in Caco-2-bbe- und HEK-Zellen mittels Western Blot	57
4.2.1	MICA- und HA-Expression in HEK- <i>versus</i> Caco-2-bbe-Zellen	57
4.2.2	Vergleich der MICA/B- und HA-Expression in Caco-2-bbe-Zellen.....	58
4.3	Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelloberflächen-MICA <i>versus</i> intrazellulär exprimiertem MICA.....	59
4.3.1	Durchflusszytometrie von Saponin-permeabilisierten MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen nach MICA-Färbung	60

4.3.2	Durchflusszytometrie von MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen nach MICA-Oberflächenfärbung	61
4.4	Darstellung der subzellulären Lokalisation des MICA- und MICB-Proteins mittels konfokaler Mikroskopie	62
4.4.1	Transiente Expression der MICA/B-Proteine	62
4.4.2	Stabile Expression der MICA/B-Proteine	63
4.5	Untersuchungen zur Epithelbarriere bei MICA/B-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	69
5	Diskussion	71
5.1	Differenzielle Expression von MICA*008 und MICA*019	71
5.1.1	Sortierung in die apikale und basolaterale Membran	71
5.1.2	Durchflusszytometrische Analyse der MICA-Expression auf der Zelloberfläche	73
5.1.3	Kolokalisation mit Membranproteinen	73
5.1.4	Vergleich mit Befunden der Dissertation von Kamel 2014	74
5.2	Polymorphismus von MICA und Assoziation mit Autoimmunerkrankungen.....	75
5.3	Auswirkung des MICA-Genotyps auf die Klinik der Zöliakie	75
5.4	Vergleich von MICA-Lokalisationsstudien in der Literatur mit den Ergebnissen dieser Arbeit	77
6	Schlussfolgerungen und Ausblick	79
6.1	Offene Fragen und weiterführende Experimente	79
6.2	MICA als Target in der immunmodulierenden Therapie der Zöliakie	80
	Literaturverzeichnis	81
	Eidesstattliche Versicherung	94
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	95
	Curriculum Vitae.....	96
	Publikationsliste.....	98
	Danksagung.....	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	DNA-Sequenz Exon 5 des MICA-Gens	18
Abb. 2:	Hydrophobizitätsplot von MICA*001 und MICA*008.....	19
Abb. 3:	Molekülstruktur von MICA voller Länge im Vergleich zu der trunkierten Variante MICA-A5.1	20
Abb. 4:	Interaktion von MICA mit IELs in Abhängigkeit vom Genotyp	21
Abb. 5:	Vektorkarte von MICA*008 und MICA*019.....	39
Abb. 6:	Abtötungskurve.....	47
Abb. 7:	Sequenzierung der Allele MICA*008 und MICA*019.....	56
Abb. 8:	Restriktionsfragmentanalyse der Plasmid-DNAs mit PstI in Agarosegel.....	57
Abb. 9:	Vergleich der MICA- und HA-Expression in Lysaten von MICA-/HA-exprimierenden und Wildtyp-Caco-2-bbe- und HEK-Zellen.....	58
Abb. 10:	Western Blot mit Lysaten von MICA/B- und HA-MICA/B-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	58
Abb. 11:	Durchflusszytometrie mit Darstellung der intrazellulären versus oberflächlichen MICA-Expression mit permeabilisierten und nicht-permeabilisierten MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen.....	60
Abb. 12:	Diagramm mit Darstellung des Verhältnisses von intrazellulär versus oberflächlich exprimiertem MICA*008 und MICA*019 in der Durchflusszytometrie	61
Abb. 13:	Anteil des oberflächlich exprimierten MICA*008 und MICA*019 in der Durchflusszytometrie.	61
Abb. 14:	Färbung von MICA, HA und ZO-1 in transient MICA*008- und HA-MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	63
Abb. 15:	Färbung von MICA und ZO-1 in stabil MICA*008- versus MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	64
Abb. 16:	MICA*019-exprimierende Zellen in Gegenfärbung zu ZO-1	65
Abb. 17:	Z-Stack eines MICA*008-exprimierenden Zelllayers	65
Abb. 18:	Intrazelluläre und submembranöse MICA-Expression von MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	66
Abb. 19:	Differenzielles Muster von ZO-1 in stabil MICA*008- versus MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	66
Abb. 20:	MICA*019 in Gegenfärbung zu Occludin in stabil MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	67
Abb. 21:	MICA*019 in Gegenfärbung zu E-Cadherin und Occludin in stabil MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	67
Abb. 22:	MICA*019 in Gegenfärbung zu rab11.....	68

Abb. 23: MICB in Gegenfärbung zu ZO-1	69
Abb. 24: Messung des transepithelialen Widerstands an MICA*008- und MICA*019- exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen	70

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Oslo-Klassifikation der Zöliakie.....	5
Tab. 2:	Marsh-Oberhuber-Kriterien, modifiziert anhand der aktuellen AWMF-Leitlinie zu Zöliakie 2014.....	11
Tab. 3:	Zöliakie-assoziierte Erkrankungen.....	11
Tab. 4:	Neue Therapiemodelle für Zöliakie.....	14
Tab. 5:	Zelluläres Expressionsmuster des NKG2D-Rezeptors	16
Tab. 6:	Biologische Eigenschaften des trunkierten MICA-Allels MICA*008 und des Allels voller Länge MICA*019	22
Tab. 7:	Materialien und Geräte	27
Tab. 8:	Chemikalien	29
Tab. 9:	Primer	31
Tab. 10:	Primäre Antikörper.....	32
Tab. 11:	Sekundäre Antikörper.....	33
Tab. 12:	Puffer und Lösungen	33
Tab. 13:	Experimentier-Kits	37
Tab. 14:	Anwenderprogramme	38
Tab. 15:	Epithel- und Expressionszelllinien	39
Tab. 16:	Differenzielle Kolo-kalisation von MICA*008 und MICA*019 mit Membran- und intrazellulären Proteinen.....	68
Tab. 17:	Korrelation von MICA-A5.1 mit der Prävalenz von Zöliakie und dem Auftreten eines symptomatischen Verlaufes und Assoziation zu einem Kopplungsungleichgewicht	76

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
APC	Allophycocyanin
APCs	engl. antigen-presenting cells
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bbe	engl. brush border enzymes
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Caco-Zellen	engl. human colon carcinoma cell line
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. complementary DNA
CD	engl. cytoplasmic domain
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DGP	Deamidierte Gliadinpeptide
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
E. coli	Escherichia coli
EATL	Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
EZD	Extrazelluläre Domäne
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	engl. forward scatter
GFD	Glutenfreie Diät
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat

HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IEC	engl. intestinal epithelial cells
IELs	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobase
KLR	engl. killer cell leptin like receptor
LB	engl. lysogeny broth
LD	engl. linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LP	engl. leader peptide
LSM	engl. laser-scanning microscopy
MHC	engl. major histocompatibility complex
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	engl. non-essential amino acid
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2D	engl. natural killer group 2, member D
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCF	Polycarbonatfilter
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
POCT	engl. point-of-care-test
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab	Ras-related in brain
rb	engl. rabbit
RCD	engl. refractory celiac disease
rpm	engl. rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	engl. sodium dodecyl sulfate polyacrymide gel electrophoresis
SEM	engl. standard error of the mean
sMICA	engl. soluble MICA

SOB	engl. super optimal broth
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TBST	TRIS-buffered saline with Tween-20 (Polysorbat-20)
TCR	engl. T-cell receptor
TE	TRIS-EDTA
TER	engl. transepithelial resistance
TEMED	Tetramethylethylendiamid
tTG2	engl. tissue transglutaminase 2
TJ	Tight Junction
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRIS-HCl	TRIS-Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt
WB	Western Blot
xg	engl. g-force
ZO-1	Zonula Occludens 1
z.T.	zum Teil

Zusammenfassung

Subzellulär-differenzielle Expression von MICA-Allelen in einem Zöliakie-Zellkulturmodell

Einführung: Die Expression von MICA, einem atypischen MHC-Klasse-I-Molekül, wird in der Zöliakie durch Gliadinpeptide und sekundär durch Interleukin-15 erhöht. Als Ligand des NKG2D-Rezeptors auf intraepithelialen Lymphozyten (IELs) führt die MICA/NKG2D-Interaktion zur Lyse des intestinalen Epithels. MICA-Allele zeigen einen hohen Polymorphismus. In der Literatur ist beschrieben, dass viele Zöliakiepatienten das trunkierte MICA-Allel A5.1 aufweisen (1) und die Klinik oft einen abgemilderten, symptomatischen Verlauf annimmt. Zur Untersuchung der differenziellen zellulären Kompartimentierung des trunkierten MICA-Allels MICA*008 im Vergleich zu dem nicht trunkierten Allel MICA*019 und der pathophysiologischen Folgen auf die Interaktion mit IELs, exprimierten wir die verschiedenen MICA-Allele in einem Zellmodell aus intestinalen Epithelzellen (IEC).

Ziele: In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die differenzielle Kompartimentierung der MICA-Isoformen MICA*008 und MICA*019 in einem humanen IEC-Zellsystem nachvollziehbar ist. Stabil MICA*008-, MICA*019- und MICB-exprimierende Zellklone sollten generiert und hierbei die mögliche Interaktion von MICA-exprimierenden Epithelzellen und IELs diskutiert werden.

Methoden: Mittels Subklonierung wurden MICA/B-Konstrukte (MICA*008 als trunkiertes Allel, MICA*019 als nicht-trunkiertes Allel sowie MICB als Kontrolle) generiert und in Caco-2-bbe-Zellen transient sowie stabil exprimiert. Neben Wildtypkonstrukten wurden Konstrukte mit einem HA-Tag hergestellt. In der konfokalen Mikroskopie nach Immunfärbung sowie durchflusszytometrisch wurde die differenzielle Kompartimentierung charakterisiert, mittels Western Blotting wurde die Expression des trunkierten MICA*008 untersucht. Stabil MICA*008- und MICA*019-exprimierende Caco-2-bbe-Zellen wurden hinsichtlich ihrer epithelialen Barrierefunktion (transepithelialer Widerstand, TER) untersucht.

Resultate: Die nicht-trunkierten Allele MICA*019 und MICB werden membranös exprimiert, während das trunkierte MICA*008 hauptsächlich intrazellulär lokalisiert. MICA*008 zeigte sich im Zytosol sowie submembranös in vesikelartigen Formationen, eine Kolokalisation mit Zellmembranproteinen fand sich nicht. Eine apikale Sortierung von MICA*008 konnte nicht eindeutig beobachtet werden. MICA*019 fand sich in der basolateralen Zellmembran und zeigte deutliche Kolokalisationen mit basolateralen Membranproteinen. Im Western Blot zeigten

Banden das Vorliegen kleinerer MICA*008-Moleküle im Vergleich zu den nicht-trunkierten MICA/B-Proteinen. In der Durchflusszytometrie sahen wir ein vom Genotyp abhängiges Verhältnis von intrazellulärer zu oberflächlicher MICA-Expression. In TER-Messungen zeigten MICA*008-exprimierende Zellen geringere Werte.

Schlussfolgerungen: Es konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Kompartimentierung von MICA Genotyp-abhängig ist. Das bei Zöliakiepatienten häufig vorkommende Allel MICA*008 wird – anders als das Wildtyp-Allel des MICA – nicht transmembranös exprimiert, sondern lokalisiert im Zytosol und submembranös. Der gehäuft vorkommende symptomatische Verlauf der Zöliakie bei Trägern des MICA-A5.1-Allels könnte somit als Konsequenz der verminderten Aktivierung des NKG2D-Rezeptors verstanden werden. Perspektivisch sollten die stabil MICA*008- und MICA*019-exprimierenden IEC-Konstrukte hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber NK-Rezeptor-verursachter Lyse untersucht werden.

Abstract

Differential subcellular expression of MICA alleles in a celiac disease cell culture model

Introduction: In celiac disease, MICA is upregulated in the presence of gliadin peptides and secondarily by IL-15. MICA acts as ligand for the NKG2D receptor expressed on intraepithelial lymphocytes (IELs). The interaction of the ligand with its receptor leads to epithelial lysis and is a crucial factor in the development of an epithelial barrier defect in celiac disease. As shown in a preceding study (1), many celiacs are carriers of the truncated allele MICA-A5.1 (MICA*008). Since the clinical course of these carriers is often oligosymptomatic, we expressed this allele in intestinal epithelial cells (IEC) and compared the subcellular localization of MICA*008 to the non-truncated MICA*019 and MICB alleles.

Aims of the study: This study examines the differential subcellular localization of MICA proteins by visualizing MICA in transfected Caco-2-bbe cells. We aimed to reconstruct the interaction between IELs and MICA-expressing intestinal epithelial cells and thus to shed a light on how the MICA genotype affects the subcellular MICA localization.

Methods: MICA*008 (MICA-A5.1, truncated allele), MICA*019 (non-truncated allele), and MICB were subcloned into the vector pCI-puro, and transiently as well as stably expressed in Caco-2-bbe cells. The subcellular localization of MICA/B was examined by confocal microscopy after immunostaining, western blotting and flow cytometry. Stably MICA*008- and MICA*019-expressing Caco-2-bbe cells were examined for barrier function (transepithelial resistance, TER).

Results: Confocal microscopy confirmed the differential compartmentalization of the MICA alleles: MICA*008 localized intracellularly, whereas MICA*019 and MICB were predominantly expressed on the cell membrane. Furthermore we observed a submembranous vesicular arrangement of MICA*008. Colocalization with apical or basolateral membrane proteins has not been observed in MICA*008-expressing cells. MICA*019 localized in the basolateral cell membrane and displayed colocalizations with membrane proteins. Western blotting revealed a specific band of the truncated molecule MICA*008 in comparison to the larger MICA*019 protein. Flow cytometry confirmed that the ratio of intracellular to surface MICA expression is genotype-dependent. In TER measurements, MICA*008-expressing cells showed significantly lower values.

Conclusion: The localization of MICA is dependent on the MICA genotype. MICA*008 localized in the cytosol whereas MICA*019 was found in the cell membrane. This supports the

hypothesis that an altered clinical course with absent or reduced gastrointestinal symptoms in MICA-A5.1 carriers is secondary to a lack of activation of the NKG2D receptor. In perspective, stable constructs of MICA*008 and MICA*019 should be analyzed regarding their viability in the presence of NK receptor-bearing cells to examine the interaction.

1 Einleitung

1.1 Zöliakie

Die Zöliakie ist eine T-Zell-vermittelte, Gluten-induzierte Fehlregulation des Immunsystems, welche auf der Basis einer genetischen Disposition entsteht. In der Konsequenz dieser Störung wird eine überschießende Immunreaktion auf einen Bestandteil des Glutens, das Gliadin, ausgelöst und diese geht mit einer autoimmun verursachten Destruktion der Enterozyten mit resultierender Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie des Duodenums einher. Die Folge der Destruktion der epithelialen Barriere der Darmmukosa ist die Malabsorption. Die Malabsorption ist zentral in der Symptomatik der Zöliakie und führt typischerweise zu Symptomen wie Diarrhoen, abdominalen Schmerzen und Gewichtsverlust. Andererseits gibt es Patienten, die sich mit einem sehr abgemilderten, sogenannten *symptomatischen* klinischen Verlauf der Zöliakie präsentieren. Die Ätiologie der glutensensitiven Enteropathie ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Man geht heute von einem komplexen Zusammenspiel von Genetik, Umwelt und immunologischen Faktoren aus. Therapeutisch gilt die glutenfreie Diät als einzig wirksame Maßnahme (2).

1.1.1 Historisches

Die Agrikultur von Getreide begann in der neolithischen Ära, etwa 9.500 vor Christus, mit dem Übergang der Jäger- und Sammlerkulturen zu sesshaften Gemeinschaften mit domestizierten Tieren und Pflanzen. Die ersten erhaltenen Aufzeichnungen der Zöliakie stammen von dem griechischen Arzt Aretaios von Kappadokien, welcher im 2. Jahrhundert nach Christus ein malresorptives Syndrom mit chronischen Diarrhoen beschrieb, und dieses *koiliakós* benannte, im Griechischen „vom Bauch stammend“ (3). In dessen Fallbeschreibung wird ein Patient vorgestellt, der unter Bauchschmerzen litt, von der Konstitution „leptosom, bleich und zu schwach zum Arbeiten“ war. Nach Auffassung Aretaios nahm die Erkrankung ihren Ursprung in dem „Abhandensein von Hitze im Magen“, welche nötig wäre, um Nahrungsbestandteile aufzubrechen und im Körper zu verteilen. In der zeitnäheren westlichen Medizin erlangte diese Beschreibung erst Aufmerksamkeit, als Francis Adams 1856 eine Übersetzung der Schriften Aretaios in der *Sydenham Society* publizierte (3). Der britische Pädiater Samuel Gee studierte die Aufzeichnungen und machte eigene Beobachtungen an Patienten. Er konstatierte die enge Beziehung der Klinik mit der Diät und machte spezifische therapeutische Vorschläge, ohne jedoch jemals Gluten oder Getreide als Auslöser zu identifizieren (4). Während in den folgenden Jahren verschiedene Nahrungsmittelbestandteile als Ursache der Erkrankung vermutet, diverse Diätregime vorgeschlagen und kurzzeitig mitunter eine „Bananen-Diät“ zur Therapie

der Zöliakie propagiert wurden (5), gelang es erst dem niederländischen Arzt Willem Dicke, den Zusammenhang zwischen der Ingestion von Getreide und der Entstehung der Zöliakie herzustellen. Zu dieser Schlussfolgerung gelang der Arzt nach der Beobachtung, dass sich eine Mehrheit der Patienten während der Holländischen Hungersnot 1944 – während welcher kaum Getreide vorhanden war – klinisch verbesserte und es zu einer drastisch verminderten Mortalitätsrate von erkrankten Kindern kam, die just wieder anstieg, als Getreide wieder erhältlich war (6,7). Eine im Lancet erschienene Studie identifizierte 1952 erstmals den Weizenbestandteil Gluten als auslösendes Agens (8). 1954 entdeckte man die villöse Atrophie des Dünndarms durch Biopsien, welche während einer Operation entnommen wurden (9), gefolgt von der Entdeckung des Anti-Gliadin-Antikörpers 1961 als nicht-invasiver serologischer Testparameter (10) und der Identifizierung der Gewebstransglutaminase als Autoantigen der Zöliakie von Dieterich et al. in der Arbeitsgruppe von Schuppan an dem Campus Benjamin Franklin der Charité (11). Diese Entdeckungen kennzeichneten Meilensteine, die den Weg zum diagnostischen Standard mittels Serologie und endoskopischen Biopsien ebneten (12).

1.1.2 Epidemiologie

Während die Angaben zur Prävalenz der Zöliakie in Studien stark variieren, war in den letzten zwei Jahrzehnten dennoch ein eindeutiger Anstieg der Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung zu verzeichnen. Aus epidemiologischen Studien geht hervor, dass ein großer Teil der weltweit an Zöliakie erkrankten Menschen nach wie vor undiagnostiziert ist und die wahre Prävalenz um ein Vielfaches höher ist als angenommen (13–15). In Europa liegt die Prävalenz bei etwa 1 %, allerdings mit signifikanten regionalen Unterschieden (16). In Finnland findet sich eine Prävalenz von etwa 2 bis 3 % (16), während in Deutschland im allgemeinen Screening etwa 0,9 % mit Zöliakie diagnostiziert werden (17). Der direkte Vergleich zwischen diesen Ländern ist insbesondere daher von Interesse, da sie eine ähnliche Verteilung vermuteter kausaler Faktoren (Menge an Glutenkonsum und Vorkommen von HLA-DQ2 und -DQ8) aufweisen (16,18). Insgesamt weisen Studien auf einen tatsächlichen deutlichen Anstieg der Prävalenz der Zöliakie hin (19). In den USA beträgt die aktuelle Prävalenz 0,7 % (20,21). 1974 betrug die Prävalenz in den USA laut einer Studie nur 0,2 % und hat sich hiermit vervielfacht (22). Ein vielfach diskutierter Grund hierfür ist die Hygienehypothese, wonach welcher aufgrund der verbesserten hygienischen Umstände ein Auftreten von autoimmunen Erkrankungen häufiger wird (23). Andererseits wird auch davon ausgegangen, dass durch die sensitivere Diagnostik mehr – zuvor unerkannte – Zöliakiker diagnostiziert werden.

1.1.3 Klinik

Die Zöliakie zeichnet sich durch eine variable klinische Präsentation aus. Im Folgenden findet sich ein Überblick der klinischen Verläufe.

Das klassische Bild der Zöliakie ist charakterisiert durch Symptome der Malabsorption, welche durch die epitheliale Destruktion der Darmmukosa entsteht: Hierzu gehören Diarrhoe, Steatorrhoe, Wachstumseinschränkungen, Gewichtsverlust sowie abdominelle Schmerzen und ein geblähtes Abdomen. Häufig manifestiert sich die Erkrankung auch durch indirekte Konsequenzen der Malabsorption wie Anämie, Müdigkeit oder Osteoporose. Die Zöliakie kann aber auch monosymptomatisch sein – beispielsweise können Patienten nur an Diarrhoen leiden – oder aber klinisch inapparent verlaufen. Die Ursache für diese variable klinische Manifestation und die Pathophysiologie einer Reihe an atypischen klinischen Manifestationen sind nach wie vor ungeklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung (24). Zu intestinalen Symptomen zählen Motilitätsstörungen des Darmes, Durchfälle, ein geblähtes Abdomen, Nausea, Meteorismus und abdominelle Schmerzen. Zu extraintestinalen Symptomen zählen beispielsweise Anämie, Osteomalazie oder Osteoporose, Zahnschmelzveränderungen, periphere Neuropathien, Muskelschwäche, Nachtblindheit, Hämatome, Ödeme, dermatologische Veränderungen wie die Dermatitis herpetiformis Duhring und rezidivierende orale Aphten (25).

Während der letzten Jahrzehnte kam es zu einem Wandel der klinischen Präsentation als Konsequenz von weitläufigem serologischen Screening und erhöhter Aufmerksamkeit gegenüber dem vielfältigen Erscheinungsbild der Krankheit (13,24,26). Während vor einigen Jahrzehnten nur Patienten diagnostiziert wurden, die sich mit klassischen Symptomen präsentierten, werden heute auch eine Vielzahl von Patienten mit klinisch weitaus diskreteren Befunden oder gar asymptomatischem Verlauf in Screenings identifiziert. Diarrhoe kommt nunmehr in weniger als 50 % der Patienten bei Erstdiagnose vor, während in den 1960er Jahren bei nahezu jeder Patient bei Erstvorstellung an Durchfällen litt (26).

1.1.3.1 Klinische Verlaufsformen

Die Nomenklatur der klinischen Verlaufsformen der Zöliakie war in der Vergangenheit uneinheitlich und führt nach wie vor zu Verwechslungen. Es besteht starker Konsensus über die Wichtigkeit der Verwendung einer einheitlichen Nomenklatur, wie sie im Folgenden dargestellt ist (2,25).

1.1.3.1.1 Klassische Zöliakie

Synonym zu „typische Zöliakie“ beschreibt dieser Begriff einen klinischen Verlauf, welcher primär durch die Folgen der Malabsorption geprägt ist: Patienten mit klassischer Zöliakie präsentieren abdominelle Schmerzen, Diarrhoe, Gewichtsverlust und andere Folgen der Malabsorption wie Anämie oder Osteoporose. Die pädiatrische Form der klassischen Zöliakie geht zudem mit Reifungsstörungen, wie z.B. Wachstumsverzögerung, verspäteter Menarche und Pubertät, voluminösen Diarrhoen und einem aufgetriebenem Abdomen bei Laktasemangel einher (27).

Die Bezeichnung „typische Zöliakie“ soll zugunsten des Begriffes „klassische Zöliakie“ verlassen werden (28). Berücksichtigt werden muss nämlich, dass diese Form der Zöliakie nicht, wie der Name „typisch“ suggerieren könnte, die häufigste Form der Zöliakie ist; vielmehr ist der Begriff historisch erwachsen. Während sich bis vor einigen Jahrzehnten beinahe alle Patienten mit Symptomen einer klassischen Zöliakie vorstellten, präsentiert sich heute die Mehrheit der Patienten mit symptomatischer Zöliakie (siehe 1.1.3.1.2). Vielmehr als eine tatsächliche Verlagerung der Häufigkeiten in der klinischen Manifestation von klassischer und nicht-klassischer Zöliakie, liegt dieser epidemiologische Wandel darin begründet, dass die Diagnostik durch Serologie und Biopsien sensitiver wurde, die Variabilität des klinischen Bildes besser bekannt und der Schwellenwert zur Einleitung der Diagnostik niedriger sind (24,29,30).

1.1.3.1.2 Symptomatische Zöliakie

Früher wurde diese Form der Zöliakie „atypische“, „oligosymptomatische“ oder auch „overt“ Zöliakie genannt. Die Begriffe werden durch die Bezeichnung „symptomatische Zöliakie“ zusammengefasst und ersetzt (25,28). Dieser Verlauf ist durch unspezifische extraintestinale und gastrointestinale Symptome geprägt. Patienten mit symptomatischer Zöliakie präsentieren sich mit einem diskreteren klinischen Bild – z.B. mit einer monosymptomatischen Malabsorption – oder stellen sich ohne Symptome der Malabsorption vor, beispielsweise mit Verstopfung und ohne Gewichtsverlust. Zu den gastrointestinalen Symptomen zählen auch paradoxe Symptome wie Konstipation, Reflux, Reizdarm-ähnliche Symptome (31,32) oder Leberenzym erhöhungen (33,34); extraintestinale Symptome strecken sich von neurologischen Defiziten (35,36), Depression (37), Gluten-Ataxie (38,39), Fertilitätsstörungen (40,41) bis hin zu dermatologischen Manifestationen wie der Dermatitis Herpetiformis Duhring (42). Ungeklärt ist, weshalb ein Teil der Zöliakiepatienten einen klinisch stark ausgeprägten Befund der Malabsorption hat, während andere Patienten keine oder nur wenig gastrointestinale Symptome und Folgen der Malabsorption präsentieren. Diese Frage ist unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.1.3.1.3 Asymptomatische Zöliakie

Patienten mit asymptomatischer Zöliakie sind klinisch unauffällig, zeigen in der Endoskopie allerdings das zöliakietytische Bild der duodenalen Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie. Diese Gruppe von Patienten wird häufig innerhalb von Screening-Programmen, z.B. bei erkrankten Verwandten oder bei dem Vorliegen einer anderen Autoimmunerkrankung, diagnostiziert (20,43,44). Obgleich Symptome weder berichtet, noch auf spezifische Nachfrage angegeben werden, zeigen viele Individuen mit asymptomatischer Zöliakie in der Auswertung verschiedener Fragebögen eine leicht reduzierte Lebensqualität (45). In Anbetracht dieser Tatsache ist es naheliegend, dass ein Teil der „asymptomatischen“ Zöliakiker objektiv betrachtet an einer subklinischen Zöliakie leidet.

1.1.3.1.4 Potenzielle Zöliakie

In dieser Verlaufsform zeigen Patienten keine Symptome sowie eine blande Histologie der Darmmukosa, sind jedoch seropositiv für zöliakiespezifische Antikörper. Da ein erhöhtes Risiko zu einer Manifestierung der Erkrankung besteht, ist ein regelmäßiges Screening dieser Patienten unerlässlich. Eine glutenfreie Diät (GFD) wird Individuen mit potenzieller Zöliakie nicht empfohlen, allerdings regelmäßige Verlaufsuntersuchungen (25,46,47).

1.1.3.1.5 Refraktäre Zöliakie

Patienten mit refraktärer Zöliakie (RCD, *engl. refractory celiac disease*) leiden trotz strikter GFD über zwölf Monate weiterhin an Malabsorptionssymptomen und intestinaler Zottenatrophie. Immunhistologisch unterteilt sich diese Erkrankung in eine refraktäre Zöliakie Typ I mit Vorkommen von IELs normalen Phänotyps sowie in eine refraktäre Zöliakie Typ II mit Nachweis einer klonalen T-Zell-Population in der molekularpathologischen Untersuchung der intestinalen T-Zell-Rezeptor-Ausstattung und Prälymphomcharakter (48).

Tab. 1: Oslo-Klassifikation der Zöliakie, angelehnt an Ludvigsson et al. (28)

Zöliakieform	Klassisches Malabsorptionssyndrom	Unspezifische Symptome oder monosymptomatische Malabsorption	Antikörper tTG2-AK	HLA-DQ8 oder -DQ2
Klassisch	+	+/-	+	+
Symptomatisch	-	+	+	+
Potenziell	-	-	+	+
Refraktär	+	+/-	+	+

1.1.3.2 Komplikationen

Während bei Kindern eine frühe Diagnose vor – teils irreversiblen – Komplikationen wie Wachstumsverzögerung, Knorpelschäden und reduzierter Knochendichte schützt (46,49,50), ist auch bei Erwachsenen das frühzeitige Erkennen einer Zöliakie essenziell, um Komplikationen wie Malabsorption und Osteoporose, aber auch einer reduzierten Lebensqualität, mehr jährlichen Krankheitstagen und einer häufigeren Inanspruchnahme von medizinischen Diensten, vorzubeugen (51–53). Eine schwere Komplikation ist die refraktäre Zöliakie. Diese ist gekennzeichnet durch das Persistieren klinischer Symptome und histologischer Veränderungen der Dünndarmmukosa trotz strikter Adhärenz zur GFD für mindestens zwölf Monate (48). Die RCD Typ I geht mit einer klonalen Vermehrung von phänotypisch normalen IELs einher. Zum anderen existiert die RCD Typ II, die durch Proliferation von klonalen, immunphänotypisch aberranten Lymphozyten gekennzeichnet ist. Die RCD Typ II ist stark mit der Entwicklung eines Enteropathie-assoziierten-T-Zell-Lymphoms (EATL) assoziiert, einer lymphoproliferativen Erkrankung, die aus intraepithelialen T-Zellen des Dünndarms entsteht und mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht (48,54,55).

1.1.4 Pathophysiologie

In der Pathogenese spielen sowohl genetische Voraussetzungen, immunologisch vermittelte Signalwege als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Grob gliedern lässt sich die Krankheitsgenese der Zöliakie, indem man (1) auf Gluten als definiertes auslösendes Agens, (2) auf das Vorliegen einer genetischen Veranlagung und (3) auf die zugrundeliegenden T-Zell-immunologischen Mechanismen eingeht (56).

1.1.4.1 Gluten

Aus dem Lateinischen, *gluten*, Kleber, oder im Englischen, *glue*, stammend, umfasst dieser Begriff die Speicherproteine Prolamin und Glutelin. Gluten kommt in Weizen, Roggen, Dinkel und verwandten Spezies wie Emmer, Einkorn und Kamut vor. Gluten ist essenziell in der Sprossung und Entwicklung des Getreidekorns: Glutenproteine entsprechen dem größten Anteil an Speicherproteinen, welche in den stärkehaltigen Endospermzellen des sich entwickelnden Getreides abgelagert werden. Diese bilden eine kontinuierliche proteinartige Matrix in den Zellen des reifen Trockenkorns und bilden ein zusammenhängendes viskoelastisches Netz, sobald Mehl mit Wasser gemischt wird (57).

Beim Weizen wird die Prolaminfraktion als Gliadin, die Glutelinfraktion als Glutenin bezeichnet. Prolamine sind alkohollöslich, während Gluteline alkoholunlöslich und nur in alkalischer

Lösung löslich sind. Beide Fraktionen bestehen aus Proteinkomponenten, die von einem hohen Glutamin- und Prolingehalt gekennzeichnet sind (58).

Weizenprolamine (Gliadine) sind hauptsächlich monomerisch vorliegende Proteine mit einem Molekulargewicht von rund 20.000 bis 75.000 Dalton. Disulfidbrücken sind zur Quervernetzung innerhalb der Ketten vorhanden (59–61).

Glutenine sind aneinander gelagerte Proteine, welche mittels Disulfidbrücken verbunden sind; ihr Molekulargewicht reicht von 500.000 bis über 10 Millionen Dalton. Werden die Disulfidketten getrennt, weisen die aufgeteilten Glutenin-Proteine eine ähnliche Alkohollöslichkeit wie Gliadine auf (58,59).

Weizen ist ein besonders stark glutenhaltiges Getreide mit einem Glutengehalt von 7,5 - 9,4 g/100 g Trockengewicht (62). Wegen dessen viskoelastischen Eigenschaften wird Gluten nicht nur gerne in Getreideprodukten wie Brot und Pasta verwendet, sondern auch als Bindemittel in Suppen, Soßen und Wurst. Dadurch beläuft sich die durchschnittlich konsumierte Menge an Gluten in Europa und den USA täglich auf rund 15 bis 20 g (63). Die von Zöliakiepatienten tolerierte Menge liegt mit 10 - 100 mg pro Tag rund 200 Mal niedriger, schwankt allerdings nicht unerheblich zwischen Patienten (46,64,65).

1.1.4.2 Genetische Grundlagen

Wirft man einen Blick auf die Konkordanz zwischen monozygoten (paarweise Konkordanz nach Greco et al. 75 %, nach Nisticò et al. 71,4 %) und dizygoten Zwillingen (paarweise Konkordanz nach Greco et al. 11 %, nach Nisticò et al. 9.1% (66,7)), verdeutlicht sich die Relevanz genetischer Faktoren für die Genese der Zöliakie. Bis heute sind sechs Haupthistokompatibilitätskomplex-Loci (*engl. major histocompatibility complex, MHC*) und etwa 40 Nicht-MHC-Loci bekannt, die eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen. Den größten genetischen Einfluss spielt der HLA-Genotyp (68). HLA-DQ2 und HLA-DQ8 werden als MHC-Rezeptoren auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, vor allem auf dendritischen Zellen, B-Zellen sowie Makrophagen, exprimiert. Bei oraler Ingestion werden Glutenpeptide von diesen HLA-Molekülen präsentiert. Beinahe alle Patienten mit Zöliakie weisen den HLA-Typen HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 auf (56,69,70). HLA-DQ2 oder -DQ8 kommt in etwa einem Drittel der Bevölkerung vor (71) – der Genotyp alleine bedingt daher keineswegs die Erkrankung; nur 4 % der HLA-DQ2-positiven Individuen entwickeln eine Zöliakie (72). Das Entstehen einer Zöliakie ohne Vorliegen eines HLA-DQ2 oder DQ8-Allels ist extrem selten (69). Intestinale CD4+ T-Zellen, welche aus Dünndarmbiopsien von Zöliakiepatienten isoliert wurden, reagieren spezifisch auf Glutenpeptide, welche durch HLA-DQ2 oder DQ8 präsentiert wurden (73,74).

1.1.4.3 T-Zell-Antwort bei Zöliakie

Glutenpeptide, welche von DQ2-/DQ8-restringierten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert werden, induzieren eine spezifische CD4+ T-Zell-Antwort. Beide Rezeptoren haben eine Affinität zu bestimmten Gliadinoktapeptiden. Allerdings steigt die Affinität weiter, wenn negative Ladungen integriert werden (75,76). Glutenpeptide weisen keine negativen Ladungen auf, weshalb sie in ihrer nativen Form mit geringer Affinität an HLA-DQ2 und HLA-DQ8 binden. Aus diesem Grund sind CD4+ T-Zellen, die spezifisch für native Glutenpeptide sind, sehr selten (73,74). An diesem Punkt kommt die Gewebstransglutaminase tTG2 (*engl. tissue transglutaminase 2*) ins Spiel: Dieses Enzym modifiziert Glutenpeptide, so dass sie mit höherer Affinität an HLA-Rezeptoren binden können (75,76). Mittels Deamidierung werden negativ geladene Carboxylgruppen generiert und die Affinität erhöht. Neben der Affinitätserhöhung kommt es dabei auch zu einer Vergrößerung des glutenspezifischen CD4+ T-Zell-Repertoires (63,76). Durch diese Mechanismen kommt es zu einer stärkeren Antwort von gliadinspezifischen T-Zellen (61,76). Die Gewebstransglutaminase befindet sich in inaktiver Form allerdings intrazellulär (63) und wird erst bei intestinalen Gewebeschäden in den Extrazellularraum sezerniert (77,78). Folglich muss angenommen werden, dass es – bereits vor Aktivierung der Gewebstransglutaminase und der Modifikation von Glutenpeptiden – eine Noxe gibt, welche das intestinale Gewebe schädigt (63). Tjon et al. diskutieren, dass, obwohl die CD4+ T-Zell-Antwort gegen native Glutenpeptide selten ist, ebendiese die Kette an inflammatorischen Vorgängen initiieren könnte (63). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Präsentation von nativen Glutenpeptiden durch HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 eine CD4+ T-Zell-vermittelte Interferon- γ -Produktion induziert. IFN- γ führt wiederum zu einer höheren Expression von HLA-DQ auf Zellmembranen und dadurch zu vermehrter Präsentation von Glutenpeptiden (79,80). Unter Glutenexposition entwickelt sich dieser Vorgang zu einem selbstverstärkenden Zyklus, der zu einer kaskadenartigen Amplifizierung der inflammatorischen Antwort und Schädigung der Darmmukosa führt (75,78,79,81,82).

Besonders der erste Schritt, die Initiierung dieser Kaskade, ist nicht abschließend geklärt. Einige Arbeitsgruppen diskutieren auch die Möglichkeit, dass Infektionen im Gastrointestinaltrakt der erste Schritt der Kette sind und eventuell auch mit dem Infektions-assoziierten Untergang an Epithelzellen zum Verlust der oralen Toleranz gegen native Glutenpeptide führen (63).

1.1.4.3.1 Bedeutung von intraepithelialen Lymphozyten (IELs) in der Pathogenese der Zöliakie

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte in den 90er Jahren gezeigt werden, dass IELs ein zytotoxisches Potenzial besitzen (83,84), allerdings war lange nicht geklärt, durch welche Mechanismen diese Zytotoxizität reguliert wird. Intraepitheliale Lymphozyten migrieren aus der

Lamina propria in die intestinale Epithelzellschicht und spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Epithels (63,85,86). Die IEL-Population im Dünndarm besteht aus TCR $\alpha\beta$ + und TCR $\gamma\delta$ + T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK). Die größte Zellpopulation stellen CD8+ TCR $\alpha\beta$ + Zellen dar (86). Die meisten IELs mit T-Zell-Rezeptoren exprimieren außerdem mehrere NK-Zell-Rezeptoren, die sich von denjenigen NK-Zell-Rezeptoren, die von T-Zellen im Blut exprimiert werden, unterscheiden (85). NK-Zell-Rezeptoren fungieren als T-Zell-Kostimulatoren, indem sie den Schwellenwert für die Aktivierung der T-Zellen unter Zellstress herabsetzen und eine effektivere immunologische Antwort ermöglichen (87). In der aktiven Zöliakie sieht man eine stark erhöhte Anzahl an CD8+ TCR $\alpha\beta$ + und TCR $\gamma\delta$ + Lymphozyten in der Darmmukosa. Sowohl IELs von Zöliakiepatienten als auch von gesunden Kontrollen exprimieren NK-Zell-Rezeptoren. Im Gegensatz zu IELs gesunder Kontrollen allerdings, zeichnen sich die NK-Zell-Rezeptoren von Zöliakiepatienten durch einen signifikant größeren Anteil an aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren aus (85,87,88). In gesundem Dünndarmgewebe exprimieren T-Zellen hauptsächlich die NK-Rezeptoren CD94/NKG2, NKR-P1A, KIR2D/3D, NKp46, Pen5 und CD56. In der aktiven Zöliakie werden selektiv CD94/NKG2C und NKG2D (*engl. natural killer group 2, member D*) überexprimiert (85).

Gleichzeitig werden von intestinalen Epithelzellen in Zöliakiepatienten die Proteine MICA/B und HLA-E, Liganden für NKG2D und CD94/NKG2C, hochreguliert (89,90). Die Ligand-Rezeptor-Interaktion kurbelt die weitere Zytolyse und IFN- γ -Produktion an (89,90). Während bereits bekannt war, dass MICA/B von Enterozyten unter Zellstress exprimiert wird (90), konnte von Meresse et al. und Hüe et al. gezeigt werden, dass die Expression des atypischen MHC-Moleküls MICA auch in intestinalem Gewebe von Zöliakiepatienten erhöht ist (88,91). Hüe et al. beschreiben eine erhöhte Expression von MICA von Enterozyten aus intestinalen Biopsien, welche *in vitro* mit Gluten und spezifischen Glutenpeptiden kultiviert wurden (91). Ebenso induzierend wirkt Interleukin-15 (IL-15) auf die MIC-Expression in glutenexponierten Enterozytenkulturen (91); IL-15-Antikörper hingegen bewirken eine Hemmung des immunogenen Effektes von Gluten (92). Dies legt nahe, dass IL-15 eine zentrale Rolle in der Regulation von MIC hat. Während Meresse et al. eine erhöhte NKG2D-Rezeptor-Expression in aktiver Zöliakie beobachten könnten, wurde diese Beobachtung nicht von Hüe et al. bestätigt (88,91,93). Beide Arbeitsgruppen beschreiben allerdings, dass IELs epitheliale Zellen via NKG2D lysieren können. Die Artikel waren Meilensteine im Verständnis der Pathophysiologie der Zöliakie, indem sie zeigten, dass die villöse Atrophie in aktiver Zöliakie durch IEL-medierte Zerstörung von Enterozyten vermittelt wird und die MICA-NKG2D-Interaktion dabei von essenzieller Bedeutung für die Zytotoxizität auf das Epithel ist und von IL-15 verstärkt wird.

Zusammenfassen lässt sich, dass, während glutenspezifische CD4+ T-Zellen die Immunantwort in der Lamina propria des Intestinums induzieren, IELs aktivierende NK-Rezeptoren exprimieren, die das Potenzial haben, im Rahmen einer Antwort des nicht-adaptiven Immunsystems einen Defekt der epithelialen Barriere zu setzen. Die Bedeutung des NKG2D-Liganden MICA in der Pathogenese der Zöliakie wird tiefergehend im zweiten Teil der Einleitung (Kapitel 1.2) erläutert.

1.1.5 Diagnostik

Die Kriterien der European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) bieten die Grundlage für den diagnostischen Standard der Zöliakie, auf die sich auch die deutsche AWMF-Leitlinie von 2014 stützt (1,25,94). Nach den Empfehlungen von 2012 wird das größte Gewicht auf die Serologie gelegt. Besonders wichtig ist, dass sich der Patient zum Zeitpunkt der Diagnostik glutenhaltig ernährt. Wurde vom Patienten eine glutenfreie Diät bereits initiiert, wird eine Glutenbelastung empfohlen, da sich die serologischen Parameter bei Aufnahme einer GFD innerhalb von Wochen normalisieren können (95). Wird eine Zöliakie klinisch vermutet, wird folgendes Vorgehen empfohlen:

1. Serologie

An erster Stelle der Diagnostik der Zöliakie steht die Serologie: Bei klinischem Verdacht sollen primär Gewebstransglutaminase-IgA-Antikörper (tTG-IgA-Ak) oder Endomysium-IgA-Antikörper (EmA-IgA-Ak) untersucht werden und darüber hinaus eine Messung des Gesamt-IgA im Serum erfolgen, da ein selektiver IgA-Mangel unter Zöliakiepatienten eine häufige Komorbidität ist (96). Ebenfalls erhältlich sind heute Point-of-Care-Tests (POCTs), die durch die Detektion von IgA- und IgG-Antikörpern gegen deamidierte Gliadinpeptide (DGP) innerhalb von zehn Minuten eine mögliche Zöliakie identifizieren können. Während der POCT-Test in vorausgehenden Studien eine hohe Sensitivität (> 95 %) und Spezifität (> 94 %) bei Erwachsenen aufwies (97,98), zeigte eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte prospektive multizentrische Studie eine Sensitivität von nur 72 % in Kindern, die möglicherweise durch niedrig-positive DGP-Titer in falsch-negativen Fällen zustande kommt (99).

2. Histologie

Die Sicherung der Diagnose gelingt mit einer duodenalen Biopsie und der histologischen Untersuchung. Bei positiver Serologie soll eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) mit Entnahme von Biopsien aus dem Duodenum erfolgen. Zur Validierung der Histologie werden die Marsh-Kriterien angewandt (100), welche durch Oberhuber et al. erweitert (101) und Corazza

und Villanacci et al. vereinfacht wurden (102). In Deutschland kommt meist die Marsh-Oberhuber-Klassifikation zur Anwendung.

Tab. 2: Marsh-Oberhuber-Kriterien, modifiziert anhand der aktuellen AWMF-Leitlinie zu Zöliakie 2014 (25,100,101)

Marsh	IELs/100 Enterozyten Duodenum	Kryptenhyperplasie	Villöse Atrophie
0	< 25	keine	keine
1	> 25	keine	keine
2	> 25	vorhanden	keine
3a	> 25	vorhanden	milde Atrophie
3b	> 25	vorhanden	ausgeprägte Atrophie
3c	> 25	vorhanden	komplette Atrophie

3. HLA-Bestimmung und Assoziation mit anderen Erkrankungen

Der diagnostische Wert einer HLA-Genotypisierung liegt in dem hohen negativen prädiktiven Wert: In Patienten, die weder HLA-DQ2 noch HLA-DQ8 positiv sind, ist eine Zöliakie extrem unwahrscheinlich. Auf der anderen Seite ist zu berücksichtigen, dass der positive prädiktive Wert der HLA-Genotypisierung sehr gering ist, da ein hoher Prozentsatz der gesunden Bevölkerung HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 positiv ist, ohne Zöliakie zu haben oder jemals zu entwickeln (69). Die Prävalenz von HLA-DQ2 beträgt in der Allgemeinbevölkerung bis 40 %, von HLA-DQ8 bis 20 %, abhängig von verschiedenen ethnischen Gruppen und Ländern (103).

Bei gewissen Erkrankungen, dessen Auftreten mit dem Vorkommen von Zöliakie assoziiert ist, sollte an eine Zöliakie gedacht werden und diese, selbst in Abwesenheit zöliakietypischer Symptome, ausgeschlossen werden. Die folgende Tabelle nennt Zöliakie-assoziierte Erkrankungen, deren Auftreten eine Zöliakiediagnostik veranlassen sollte.

Tab. 3: Zöliakie-assoziierte Erkrankungen (25,104–107)

Zöliakie-assoziierte Erkrankungen	
Autoimmunerkrankungen	Hashimoto-Thyreoiditis
	Diabetes mellitus Typ 1

Zöliakie-assoziierte Erkrankungen	
	Autoimmunhepatitis
	Kollagenosen (Sjögren-Syndrom, Systemischer Lupus erythematodes)
	Primär biliäre Cholangitis
	Morbus Addison
Neurologisch-psychiatrische Erkrankungen	Migräne
	Depression und Angststörungen
	Epilepsie
	Anorexie
Hauterkrankungen	Dermatitis Herpetiformis Duhring
	Psoriasis
Genetische Syndrome	Trisomie 21
	Monosomie X
Weitere	Selektiver IgA-Mangel
	Reizdarmsyndrom
	Transaminasenerhöhungen
	Mikroskopische Kolitis
	Lymphoproliferative Erkrankungen
	Osteomalazie oder Osteoporose

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Die glutenfreie Diät (GFD)

Die einzige effektive Therapie der Zöliakie bleibt bis heute die lebenslange, strikte GFD. Zu Beginn der GFD soll jedem Patienten eine professionelle Ernährungsberatung angeboten werden. Weizen, Dinkel, Ur-Dinkel, Gerste, Roggen, Einkorn, Emmer, Grünkern, Kamut, Triticale und sämtliche prozessierte Lebensmittel, welche die genannten Getreidearten enthalten,

dürfen nicht verzehrt werden (25). Der Konsum von Hafer wird heute von den meisten aktuellen Leitlinien nicht mehr ausgeschlossen (2,108).

Es muss streng darauf geachtet werden, nicht mit kontaminierten Lebensmitteln – beispielsweise in geteilten Haushalten oder Restaurants – in Kontakt zu kommen und keine Lebensmittel mit verstecktem Gluten wie Wurst oder Suppen zu konsumieren. Nach der Allergenkennzeichnungspflicht laut EU-Verordnung Nr. 1169/2011 müssen genannte glutenhaltige Getreide und deren Erzeugnisse gekennzeichnet werden (109). Glutenfreie Getreide, die weiterhin konsumiert werden dürfen, sind Reis, Mais und Hirse und die Mehlpflanzen Buchweizen, Quinoa, Amaranth, Kartoffeln, Maniok und Sojaprodukte. In jedem Fall ist auf einen strikten kontaminationsfreien Herstellungs-, Lagerungs- und Lieferungsprozess zu achten. Wiederholte, minimale Kontaminationen, die zu einem ungewollten Konsum von rund 10 mg Gluten pro Tag führen – dies entspricht etwa zehn Brotkrumen oder dem Drittel eines Croutons – führen bei einzelnen Individuen bereits zu klinischem und histologischem Krankheitsrezidiv (25,46,64,110).

In der Mehrzahl der Patienten zeigt sich bereits innerhalb zwei Wochen nach Beginn der GFD eine Verbesserung der Symptome; serologische Parameter normalisieren sich üblicherweise innerhalb weniger Monate (25,105); die Normalisierung der intestinalen Mukosa dauert meist länger (111,112). Die klinische Signifikanz einer persistierenden intestinalen Inflammation ist nicht geklärt, einige Studien weisen allerdings darauf hin, dass sie nicht mit erhöhter Morbidität assoziiert ist (113,114). Während Patienten mit klinisch oder histologisch manifester Zöliakie zweifelsfrei von einer GFD profitieren und eine fehlende Diätadhärenz mit Komorbiditäten wie Osteoporose, Depression und Ernährungsmangelzuständen assoziiert ist, ist unklar, ob auch Patienten mit potenzieller Zöliakie eine lebenslange GFD einhalten müssen. Neuere Studien legen nahe, dass Individuen mit potenzieller Zöliakie keine GFD befolgen müssen (46,47,115). Da sich in Individuen mit potenzieller Zöliakie allerdings eine manifeste Zöliakie entwickeln kann, ist es unabdingbar, diese Patienten in regelmäßigen Abständen zu untersuchen und das Diätregime eventuell anzupassen (46).

1.1.6.2 Neue Therapiemodelle

Das Einhalten einer strikten GFD stellt viele Patienten vor Schwierigkeiten. Sie ist schwer einzuhalten, kann soziale Aktivitäten einschränken, ist kostspielig und stellt eine deutliche Einschränkung der nutritiven Vielfalt dar (116–119). Daher wurde in den vergangenen Jahrzehnten intensiv nach ergänzenden therapeutischen Möglichkeiten gesucht, die beispielsweise die inflammatorische Antwort auf minimalen Konsum von Gluten durch Kontamination neutralisieren können.

In Tab. 4 sind verschiedene Strategien dargestellt; die Übersicht orientiert sich an einer Publikation von Schuppan et al. zu neuen Therapiemodellen der Zöliakie (56). Der Tabelle zu entnehmen ist ein persönlicher, nicht vollständiger Auszug aus den in der Publikation diskutierten neuen Therapiemodellen. Von besonderem Interesse sind diese therapeutischen Überlegungen für die vorliegende Arbeit, da perspektivisch auch NKG2D-Liganden wie MICA als therapeutisches Target diskutiert werden können; innerhalb der Krebsforschung gibt es zur Therapie mittels spezifischer MICA-Modulation bereits Studien (120). In der Therapie der Zöliakie liegen diesbezüglich noch keine Studien vor, dennoch ist auch eine Immunmodulation von MICA bei Zöliakie denkbar.

Tab. 4: Neue Therapiemodelle für Zöliakie, angelehnt an Schuppan et al. (56)

Ziel / Target	Methode
Intraluminale Therapien	
Weizen	Weizenvarianten mit niedriger Immunogenität, Test an Dünndarmbiopsien und Gliadin-reaktiven T-Zelllinien
Mehl	Behandlung von Mehl mit Lactobazillen
Transepitheliale Aufnahme	
Epitheliale Tight Junctions	ZOT-Rezeptor-Antagonist AT1001
Modifikation der adaptiven Immunantwort	
tTG2	Transglutaminase-Inhibitoren
HLA-DQ2	Blockierung von DQ2
Immunmodulatoren	
Mikrobiom	Hakenwurminfektion (Modulierung des Mikrobioms und der intestinalen Immunantwort durch parasitäre Infektion)
	Gluten-Impfung (Nexvax2) (eingestellt nach Phase II-Testung)
Biologicals (Systemische T-Zell- oder Zytokin-Inhibitoren)	
Small intestine homing T-cells	CCR9-Antagonisten (Ccx282-B, CCX025)

Ziel / Target	Methode
Intraluminale Therapien	
Klonale intestinale IELs	Autologe Knochenmarkstransplantation und mesenchymale Stammzelltransplantation
Mukosale Zerstörung in refraktärer Zöliakie	Anti-TNF- α , anti-IFN- γ (HuZAF), Anti-CD52 (Alemtuzumab)

1.2 MICA und NKG2D

In diesem Kapitel soll näher auf den NKG2D-Liganden MICA und seine Rolle in der Pathogenese der Zöliakie eingegangen werden.

NK-Zellen exprimieren aktivierende und inhibierende Rezeptoren, mit deren Hilfe sie gesunde von infizierten oder transformierten Zellen unterscheiden. Zu den aktivierenden Rezeptoren gehören KLR (*engl. killer cell leptin like receptor*), NKG2C und NKG2D. Letztere werden auch auf IELs exprimiert. Der NKG2D-Rezeptor ist ein homodimerer Rezeptor, der von NK-Zellen und CD8+ T-Zellen ($\alpha\beta$ und $\gamma\delta$) exprimiert und vom KLRK1-Gen kodiert wird (87,90,121). Der Rezeptor NKG2D besteht aus zwei Typ-II-Transmembran-Proteinen, welche über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und eine kurze intrazelluläre Domäne aufweisen, welche selbst keine Signaltransduktion auslösen kann (87,122). Zur Weiterleitung von Signalen dienen dem Rezeptor zwei Adapterproteine, DAP10 und DAP12 (123), die jeweils als Homodimere anliegen. Der gesamte Komplex ist daher ein Hexamer (124). Als charakteristisches Merkmal aktivierender Immunrezeptoren enthält NKG2D einen geladenen Aminosäurerest in seiner Transmembrandomäne. NKG2D ist auf dem entwicklungsbiologisch hochkonservierten Gen KLRK1 kodiert und weist einen sehr geringen Polymorphismus auf. Dahingegen erkennt der Rezeptor ein großes Repertoire an zellstressinduzierbaren Proteinen als Liganden: Dazu zählen die Proteine MICA, MICB und ULBP1-6, welche einen bemerkenswert hohen Polymorphismus zeigen (125–127), sowie Rae1 (RAET1E, RAET1G, RAET1H, RAET1I, RAET1L, RAET1N) und H60 (128). MICA und MICB werden vor allem von Enterozyten exprimiert (89). Die Interaktion von MICA und MICB mit NKG2D-Rezeptoren auf IELs kann die Lyse der MICA/B-exprimierenden Zellen induzieren (89).

NKG2D-Liganden werden nicht ubiquitär, sondern selektiv von Zellen unter bestimmten Zuständen von Zellstress wie viraler Infektion, oxidativem Stress, DNA-Schäden, Proteasom-Inhibition und maligner Transformation exprimiert (90,129–132). MICA/B wird von epithelialen Tumoren, Melanomen und Neuroblastomen exprimiert; ULBPs hingegen vor allem in Gliomen,

Melanomen und Leukämie (133). NKG2D-defiziente Mäuse zeigen eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung maligner Tumore (134). Diefenbach et al. konnten *in vivo* im Mausmodell zeigen, dass Zellen, welche die NKG2D-Liganden Rae1 oder H60 exprimieren, von NK-Zellen sowie CD8+ T-Zellen erkannt und lysiert werden (128).

Demhingegen bedingt die Sekretion von löslichen NKG2D-Liganden eine Modulation des NKG2D-Rezeptors: Groh et al. demonstrierten anhand der NKG2D-Liganden MICA/B, dass die Bindung löslicher Liganden die Expression des Rezeptors herunterreguliert (135). Tumorzellen nutzen dies, um der Immunüberwachung zu entkommen: Sie sezernieren lösliche NKG2D-Liganden in die Blutbahn, welche an NKG2D-Rezeptoren binden und folglich deren Expression vermindern. Hohe Konzentrationen von löslichem MICA (sMICA) im Serum sind assoziiert mit reduzierter NKG2D-Expression und sonach einer ineffizienteren Tumordetektion des Immunsystems (135,136).

1.2.1 Expression des NKG2D-Rezeptors

NKG2D wird von verschiedenen lymphatischen und myeloischen Zellreihen exprimiert. In Tab. 5 ist das Expressionsmuster von NKG2D im menschlichen Organismus dargestellt.

Tab. 5: Zelluläres Expressionsmuster des NKG2D-Rezeptors, angelehnt an Raulet et al. (121)

Zelltyp	NKG2D-Rezeptor-Expression in humanen Zellen
NK-Zellen	100 %
CD8+ $\alpha\beta$ T-Zellen	Vor Aktivierung: nicht exprimiert Nach Aktivierung: ~100 % Antigenspezifische Gedächtniszellen: ~100 %
CD4+ $\alpha\beta$ T-Zellen	Physiologischerweise nicht exprimiert, hochreguliert bei autoimmunen Prozessen
NK-T-Zellen	Expression vorwiegend auf CD4- NK-T-Zellen (137)
$\gamma\delta$ T-Zellen	Periphere $\gamma\delta$ T-Zellen: ~100 % Intestinale intraepitheliale $\gamma\delta$ Zellen: ~100 %
Makrophagen, Monozyten	Keine Expression

1.2.2 Expressionsmuster von NKG2D-Liganden

NKG2D-Liganden werden unter verschiedenen zellulären Umständen und in einem für den Liganden spezifischen Muster exprimiert, weshalb angenommen werden kann, dass sich ihre pathophysiologische Funktion und ihre Rolle in zellulären Signalkaskaden unter Zellstress unterscheiden (121). MICA und MICB werden im gesunden Organismus hauptsächlich von intestinalen Epithelzellen exprimiert, was am ehesten als Konsequenz einer permanenten Stimulation der physiologischen Bakterienflora im Darm zu verstehen ist (90,129). Außerdem wird die Expression von NKG2D-Liganden von Zellen, die in Kontakt mit Pathogenen kommen, hochreguliert. Die Induktion der MICA/B-Expression in Zellen, die mit CMV infiziert wurden, wurde in Kulturen von primären Fibroblasten und endothelialen Zellen beobachtet (138). Die Expression von MICA wird außerdem nach der Bindung des Adhäsins *AfaE* aus *Escherichia coli* (*E. coli*) mit dem zellulären CD55-Rezeptor (131) und von Zellen, welche mit dem *Mycobacterium tuberculosis* infiziert sind (139), induziert.

1.2.2.1 Der NKG2D-Ligand MICA

Während typische MHC-I-Moleküle Antigene präsentieren und so zu einer Aktivierung von Immunzellen führen, stellt die Expression von atypischen MHC-Klasse-I-Molekülen, wie dem NKG2D-Liganden MICA, selbst, das heißt (d.h.) ohne Präsentation eines Antigens, ein Signal für die Lyse der Zelle dar. Oberflächlich exprimiertes MICA fungiert daher selbst als NKG2D-Rezeptor-Ligand (87).

MICA weist einen sehr hohen Polymorphismus auf; bis heute wurden bereits über 60 Allele identifiziert (140–145). Die Bedeutung dieser genetischen Variabilität ist weitgehend unbekannt. Das MICA-Gen (Chromosom 6, Bande 6p21.33) findet sich in der HLA-Region; diese wiederum liegt kodiert im Chromosom 6p21.3 und erstreckt sich, unterteilt in drei Regionen – Klasse I, Klasse III und Klasse II – über ein Segment von 4000 Kilobasen (kb) (140,146–148). Die MICA-cDNA-Sequenz ist 1382 bp lang und besteht aus sechs Exons (146,148). Der ORF (*engl. open reading frame*, Leserahmen) kodiert für ein Protein aus 383 Aminosäuren, welches eine Molekülmasse von 43 kDa hat (149). Zusammen mit der Glykosylierung auf der Zelloberfläche liegt die Proteingröße zwischen 65 und 75 kDa (1,90). Bemerkenswert ist der hohe Polymorphismus in den Mikrosatelliten der Transmembran-Region in Exon 5 von MICA (146). Mikrosatelliten bestehen aus repetitiven Sequenzen von zwei bis drei Basen und kommen in allen bekannten eukaryoten DNA-Sequenzen vor; die Anzahl der Mikrosatelliten im MICA-Gen ist individuell (146). Die Transmembranregion kodiert eine Reihe an hydrophoben Aminosäuren und ist essenziell zur Verankerung des Proteins in der Zellmembran. Mizuki et al. beschrieben schon 1997 mehrere Alanin-kodierende Mikrosatellitenallele in der MICA-Transmembrandomäne, die sich in ihrer Anzahl an GCT/AGC Tandems unterscheiden (146). Die Allele haben

eine unterschiedliche Anzahl an GCT-Wiederholungen, welche 4-10 Alanine in der Transmembrandomäne kodieren (146,150).

Die vorliegende Arbeit untersucht das Allel MICA-A5.1; A5.1 steht hierbei für Alanin 5.1. Dieses Allel enthält eine zusätzliche Guanin-Insertion, die zu einer Rastermutation (*engl. frameshift*) des Leserahmens und zu einem verfrühten Stopp-Codon in der Transmembrandomäne selbst führt (151) (siehe Abb. 1). Dies hat ein trunkiertes Genprodukt zur Folge: Die Allele, welche den MICA-A5.1 Polymorphismus tragen, kodieren ein Glykoprotein, welches weder Transmembrandomäne noch zytoplasmatischen Schwanz hat (151). Dieser soll eine Bedeutung bei der Sortierung des Proteins zur basolateralen Membran in polarisierten Enterozyten haben (151). Unter den MICA-A5.1 Allelen zusammengefasst werden die Allele MICA*008, 023 und 028. Die Guaninininsertion nach zwei der insgesamt fünf GCT-Triplets bedingt die Leserastermutation (151). Große Teile der Transmembran- und zytoplasmatischen Region werden nicht translatiert. Das trunkierte MICA*008 hat eine Molekulargröße von nur 38 kDa, verglichen mit 43 kDa in MICA-Proteinen voller Länge (1,129,141,146).

1. GTT GCT GCT GCT GCT (GCT GCT...) ATT TTT GTT A
2. GTT GCT GCT GGC TGC TGC TAT TTT TGT TA

Abb. 1: DNA-Sequenz Exon 5 des MICA-Gens. 1.: MICA-Allele voller Länge, 2.: MICA-Allel MICA-A5.1 mit der markierten Guanin-Insertion (1)

MICA*008 ist aus der Gruppe der A5.1 Allele das am besten untersuchte Genprodukt. Das Allel MICA*008 tritt mit einer Prävalenz von 20 – 40 % in der Bevölkerung auf (152–155) und zeichnet sich durch andere biologische Eigenschaften als die MICA-Allele voller Länge aus. Einige Virusarten, darunter CMV und das Kaposi-Sarkom-assoziierte-Herpes-Virus, unterdrücken die Expression vieler MICA-Moleküle in infizierten Zellen. MICA*008 hingegen ist resistent gegen die Repression der Expression durch diese Viren. Dies könnte sich als evolutionärer Vorteil erwiesen haben, welcher zur weiten Verbreitung der trunkierten MICA-A5.1-Allele geführt hat (156,157).

Suemizu et al. konnten zeigen, dass MICA-Proteine voller Länge in die basolaterale Membran sortiert werden, wo auch die Interaktion der Enterozyten mit intraepithelialen T-Lymphozyten und NK-Zellen stattfindet. Eine dihydrophobe Leucin-Valin-Tandemsequenz dient hierbei als das basolaterale Sortierungssignal. Demzufolge scheint es naheliegend, dass das trunkierte MICA*008-Protein, dem ebendiese Sequenz fehlt, nicht erfolgreich in die basolaterale Membran sortiert werden kann (151).

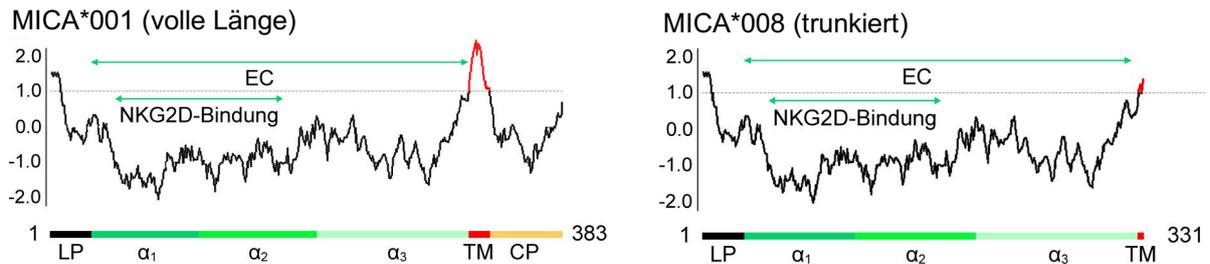


Abb. 2: Hydrophobizitätsplot von MICA*001 und MICA*008. Der trunkierten Variante MICA*008 fehlt die Transmembrandomäne sowie die zytoplasmatische Domäne. LP: leader peptide (Signalsequenz), TM: Transmembrandomäne, CP: zytoplasmatische Domäne, EC: Extrazelluläre Domäne. X-Achse: Anzahl Aminosäuren im Protein. Y-Achse: Hydrophobizität. Abbildung übernommen aus Kamel, 2014 (1)

Abb. 2 zeigt einen Hydrophobizitätsplot des MICA-Proteins voller Länge MICA*001 und des trunkierten Allels MICA*008 (1). Mittels eines Hydrophobizitätsplots nach Kyte kann eine Vorhersage über die transmembranen Bereiche eines Proteins gemacht werden. Mittels dieser Methode kann die durchschnittliche Hydrophobizität eines Sequenzbereiches bestimmt werden. Befinden sich mehrere hydrophobe Aminosäuren in Folge, spricht dies für das Vorhandensein einer Transmembrandomäne (158). Kamel stellte in ihrer Dissertation 2014 den in Abb. 2 gezeigten Hydrophobizitätsplot für das MICA-Protein voller Länge MICA*001 und dem trunkierten MICA*008 her (1). In diesem wird, wie in der Literatur beschrieben (151,159), bestätigt, dass sowohl die Transmembrandomäne als auch der zytoplasmatische Anteil des trunkierten Proteins fehlen, wie in Abb. 3 schematisch skizziert.

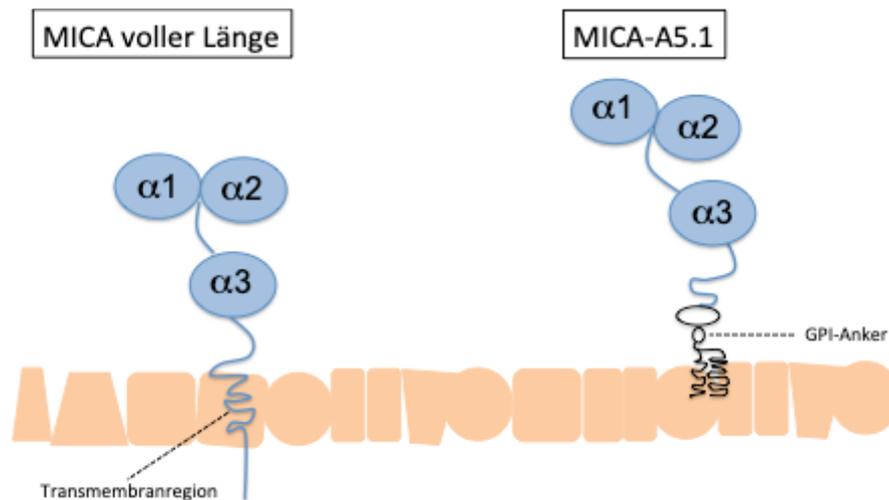
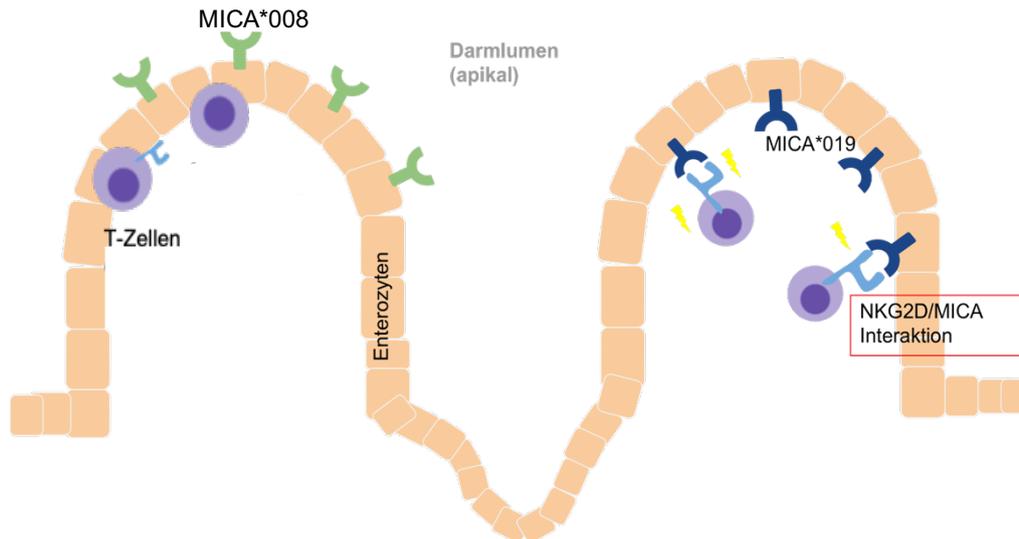


Abb. 3: Molekülstruktur von MICA voller Länge im Vergleich zu der trunkierten Variante MICA-A5.1 (160)

1.2.2.2 Bedeutung des MICA bei der Zöliakie

In der Pathogenese der Zöliakie nimmt das atypische MHC-Molekül MICA eine Schlüsselfunktion ein. MICA wird wie bereits beschrieben als typischer NKG2D-Ligand unter zellulärem Stress hochreguliert (87). Bei der Zöliakie stellen die durch die tTG2 deamidierten Gliadinpeptide (11) in Kombination mit einer erhöhten IL-15-Sekretion durch das intestinale Epithel und dendritische Zellen diesen Zellstress dar (61,81,91).

MICA interagiert mit dem auf intraepithelialen Lymphozyten exprimierten NKG2D-Rezeptor, was die Lyse intestinaler Epithelzellen zur Folge hat (87,91) und so zur veränderten Dünndarmarchitektur bei Zöliakie beiträgt. Hüe et al. konnten zeigen, dass MICA auf der Zelloberfläche von Dünndarmepithelien in Patienten mit Zöliakie verstärkt exprimiert und von Gliadin induziert wird (91). Die dadurch signifikant verstärkte Aktivierung von intraepithelialen Lymphozyten führt zu einer zytotoxischen Aktivität gegen das Epithel. Zudem werden CD8+ T-Zellen aktiviert und verstärken die Epitheldestruktion. Die villöse Atrophie der Zöliakie kann daher als IEL-vermittelte Destruktion der Enterozyten mitunter als Folge der verstärkten NKG2D/MICA-Interaktion verstanden werden, welche durch die gliadinabhängige Expression von MICA auf Dünndarmepithel ausgelöst wird (91).



*Abb. 4: Interaktion von MICA mit IELs in Abhängigkeit vom Genotyp. MICA*008 wird nicht basolateral exprimiert und kann somit nicht mit intestinalen Lymphozyten interagieren.*

Abb. 4 stellt die Interaktion NK-Rezeptor-tragender IELs mit Epithelzellen in Abhängigkeit von der Expression des MICA-Allels dar. Das trunkierte MICA-Protein MICA*008 (links im Bild) wird, in der Literatur beschrieben, apikal, also lumenseitig exprimiert. Darüber hinaus wird auch eine intrazelluläre Lokalisation in Vesikeln beschrieben (in Abb. 4 nicht abgebildet) (151,159). Die Interaktion mit den IELs in der epithelialen Darmmukosa findet somit nicht statt. Rechts sieht man die Interaktion zwischen MICA*019 und dem NKG2D-Rezeptor auf IELs, welcher ein kostimulatorisches Signal zur Zellyse darstellt.

1.2.2.3 Biologische Merkmale von MICA in Abhängigkeit vom Genotyp

MICA-Allele voller Länge und trunkierte MICA-Allele weisen biologische Unterschiede auf. Während MICA*008 und MICA*019 in der extrazellulären Domäne fast identisch sind, unterscheiden sie sich in ihrer C-terminalen Region (159,161). MICA*008 als Prototyp der Allelfamilie MICA-A5.1 enthält aufgrund der Leserastermutation und der resultierenden Trunkierung des Proteins keine Transmembrandomäne. Darüber hinaus fehlt auch die zytoplasmatische Domäne des Proteins (1). In der Literatur beschrieben ist, dass MICA*008 in polarisierten Zellen in die apikale Membran transportiert, während MICA*019 in die basolaterale Membran sortiert wird. Zudem wurde die intrazelluläre Lokalisation von MICA*008 in Exosomen beobachtet (151,161).

Suemizu et al. zeigten, dass der durch die Frameshift-Mutation veränderten Sequenz das basolaterale Sortierungsmotiv fehlt, d.h. diejenige DNA-Sequenz, die posttranslational für die

basolaterale Sortierung des Proteins kodiert (151). Die Arbeitsgruppe stellte daher die Hypothese auf, dass das trunkierte MICA durch das fehlende basolaterale Sortierungsmotiv in die apikale Zellmembran sortiert wird.

Ashiru et al. beschrieben zwei mögliche posttranslationale Wege von MICA innerhalb der Zelle: MICA*008 kann zum einen als lösliches Protein im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und nach weiterer Prozessierung über einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) an der Membran befestigt werden. Ein GPI-Anker kann posttranslational im ER an das C-terminale Ende eines Proteins angefügt werden und verankert Glykoproteine an der extrazellulären Seite der Zellplasmamembran. Zum anderen kann MICA*008 als lösliches Protein in Exosomen geschleust und danach via Exozytose sezerniert werden (159,161).

In der folgenden Tabelle sind die biologischen Eigenschaften der MICA-Allele aufgezeigt.

Tab. 6: *Biologische Eigenschaften des trunkierten MICA-Allels MICA*008 und des Allels voller Länge MICA*019, angelehnt an Ashiru et al. (159)*

Eigenschaften	MICA*008	MICA*019
Apikal/Basolateral	Apikal (151)	Basolateral (151)
Vorkommen in Lipid Rafts	90 % (161)	nein (161)
Reifungsrate	3 h (159)	30 min (159)
Ausschleusung in Exosomen	ja (161)	nein (161)
Prävalenz	20 – 40 % (152–155)	10 % (152–155)
Membranverankerung	GPI-Anker (159)	Transmembranös (159)
NKG2D-Downregulierung	ja (+ + +) (161)	ja (+) (161)

1.3 Assoziation von MICA-Allelen und klinischem Verlauf der Zöliakie

MICA wird von Darmepithelzellen auch im physiologischen Zustand exprimiert (90), in Patienten mit Zöliakie finden sich im Epithel der duodenalen Zotten allerdings signifikant höhere Level an MICA als in Kontrollen (89,91). Die MICA-Expressionslevel von Zöliakiepatienten, welche eine strenge glutenfreie Diät befolgen, sind vergleichbar mit jenen der Kontrollen (91). Die höchsten Werte erreichen Patienten mit refraktärer Zöliakie, selbst bei strenger Einhaltung der Diät (1,91). Wie erläutert, führt die Interaktion von MICA mit NKG2D-Rezeptoren der IELs sowohl über direkte Signaltransduktion des NKG2D/DAP10-Komplexes zu einer Lyse der

Enterozyten durch NK-Zellen als auch als kostimulatorisches Signal zur TCR-vermittelten Lyse (91). Wie in Abb. 4 demonstriert, ist die basolaterale Membran der Ort der Interaktion zwischen intraepithelialen Immunzellen des Darms und Enterozyten. Insofern scheint es naheliegend, dass die basolaterale Lokalisation des MICA-Proteins eine Bedingung zur Bindung an den NKG2D-Rezeptor der Immunzellen ist.

Lopez-Vasquez et al. beschreiben eine signifikante Häufung des MICA-A5.1-Allels in Patienten mit symptomatischer Zöliakie (64 % versus 21 %, $p = 0,004$) (162,163). Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass die unterschiedliche Klinik eine Folge der differenziellen subzellulären Lokalisation von MICA sein könnte. Die reduzierte MICA/NKG2D-Wechselwirkung könnte zu einer verminderten Lyse der Enterozyten führen und so den modifizierten Krankheitsverlauf im Sinne einer symptomatischen Zöliakie erklären.

1.4 Studienergebnisse von Kamel 2014 und weiterführende Analysen zur subzellulären Lokalisation von MICA

In einer vorangehenden Studie zur Lokalisation von MICA von Kamel 2014 aus unserer Arbeitsgruppe (AG Schumann, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin) wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss verschiedene MICA-Allele auf die Klinik der Zöliakie haben (1). Dabei konnten die im Folgenden beschriebenen Beobachtungen gemacht werden; eine zentrale Fragestellung, die unbeantwortet blieb, war allerdings die eindeutige Zuordnung der MICA-Allele (MICA-A5.1 versus nicht-trunkiertes MICA) zu einem Zellkompartiment.

Kamel führte zu einer immunhistochemischen Färbung als auch Immunfluoreszenzfärbungen an Biopsien aus duodенaler Schleimhaut von Zöliakiepatienten durch. Zum anderen wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Caco-2-Zellen (*engl. human colon carcinoma cell line*) untersucht (1).

Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten aus Patientenbiopsien

In allen Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten aus Patientenbiopsien zeigten sich die MICA- und MICB-Proteine im epithelialen, nicht aber im subepithelialen duodenalen Gewebe. In Enterozyten aus Biopsien von Zöliakiepatienten wurde vor allem ein apikales MICA/B-Bandsichtbar, allerdings war auch ein schwächeres basolaterales MICA/B-Signal zu beobachten. Auch intrazellulär zeigte sich MICA/B-Signal, welches vesikelartig imponierte. Gegenfärbungen mit dem membranassoziierten ZO-1 legten nahe, dass sich MICA/B-Proteine vor allem submembranös verteilen. Färbungen mit intestinaler alkalischer Phosphatase,

welche membranös lokalisiert ist, zeigten allerdings kolocalisierende Anteile, sodass zu mutmaßen ist, dass zumindest ein Teil der MICA/B-Proteine auch innerhalb der Membran zu finden ist. Die Befunde zeigten sich sowohl in Biopsien von Patienten mit und ohne Allelen von trunkiertem MICA. Mittels Gegenfärbungen mit Markern für intrazelluläre Kompartimente (Caveolin, CD71-Transferrinrezeptor, Clathrin, Golgin, Hrs, IgA, rab2b, rab5, rab11 und Tubulin) sollte festgestellt werden, aus welchem Kompartiment das intrazelluläre MICA/B-Signal stammt. Es konnten dabei keine eindeutigen Kolokalisationen gefunden werden. Allerdings konnte man in einer Gegenfärbung mit MUC-2 als Antikörper für intestinale Becherzellen beobachten, dass sich MICA/B vor allem in der Nähe von intraepithelialen Becherzellen findet (1).

Ein Nachteil der beschriebenen Färbung war die Tatsache, dass der damals initial zur Verfügung stehende Antikörper nicht zwischen MICA und MICB unterscheiden konnte. Es wurde daher eine Färbung mit einem spezifischen MICB-Antikörper durchgeführt, um zu sehen, welchen Anteil MICB an der MICA/B-Färbung hat. Hier zeigte sich ein vorwiegend apikales, submembranöses Signal (1).

Immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten von Patientenbiopsien

Ein Vorteil der Immunhistochemie ist, dass durch diese Methode auch schwache Farbsignale mittels einer chemischen Reaktion (Streptavidin-Biotin-Methode) verstärkt dargestellt werden können. Immunhistochemische Färbungen von MICA an Biopsien zeigten ein vom Genotyp abhängiges apikales beziehungsweise (bzw.) basolaterales Signal im Sinne eines deutlich stärkeren apikalen Signals in Patientenbiopsien mit dem trunkierten MICA-A5.1-Allel (1). Dies unterstützt die Beobachtungen von Suemizu et al. (151). Die Beobachtungen waren allerdings nur in den immunhistochemischen Färbungen an Kryoschnitten und nicht in Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten und Caco-2-Zellen möglich (1).

Immunfluoreszenzfärbungen in der Zellkultur

In Immunfluoreszenzfärbungen von Caco-2-Zellen zeigte sich ein apikales als auch basolaterales MICA/B-Signal. Auch hier imponierte MICA/B submembranös und stellte sich etwas weiter basal als ZO-1 dar. Lipid Rafts wurden mit GM1 und CTX-B dargestellt und zeigten apikal eine Kolokalisation mit MICA/B. Da MICA und MICB jedoch eine große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, war eine spezifische Färbung nicht möglich (1).

Zusammenfassend blieb also die Frage ungeklärt, ob sich die differenzielle Expression des trunkierten MICA-Proteins von der des MICA-Proteins voller Länge unterscheidet und somit einen Einfluss auf die MICA/NKG2D-Interaktion haben könnte.

2 Zielsetzung

Bislang ist die eindeutige Lokalisation der atypischen MHC-Proteine MICA und MICB nicht gelungen. Ein Teil des Problems war die mangelnde Spezifität der verfügbaren Antikörper gegen MIC-Proteine. Ein weiterer Teil war der zu niedrige endogene Level von MICA und MICB im Zellkulturmodell mit intestinalen Epithelzellen. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit transient als auch stabil MICA- und MICB-exprimierende intestinale Epithelzellen hergestellt werden und anhand dieser die differenzielle Expression der MIC-Proteine und ihrer Allele untersucht werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die subzelluläre Lokalisation des trunkierten MICA-Allels MICA*008 im Vergleich zum MICA voller Länge MICA*019. Zur optimierten Darstellung der MIC-Proteine in der Immunfluoreszenz soll zudem ein Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) in die Sequenz im Rahmen der Subklonierung inseriert werden.

Mittels bildgebender Methoden sowie durchflusszytometrisch soll analysiert werden, ob (1) die in der Literatur beschriebene Kompartimentierung von MICA*008 in die apikale Zellmembran und MICA*019 in die basolaterale Zellmembran in einem Zellmodell mit humanen Darmepithelzellen bestätigt werden kann und (2) ein vom Genotyp abhängiges Expressionsmuster auf der Zelloberfläche besteht.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Materialien und Geräte

In der folgenden Tabelle sind die in den der Doktorarbeit zugrundeliegenden Experimenten verwendeten Geräte und ihre Verbrauchsmittel mit Angabe der produzierenden Firma und dem Herkunftsland aufgeführt.

Tab. 7: *Materialien und Geräte*

Geräte und Verbrauchsmittel	Firma, Herkunftsland
Amaxa-Küvette	Lonza, Schweiz
Auflichtmikroskop C2	Olympus, Deutschland
Dako Pen, wasser- und alkoholabweisender Stift	Agilent, USA
Deckgläser, verschiedene Größen	Menzel-Glaeser, Deutschland VWR Avantor, USA
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	Agilent, USA
Elektrophorese Gel Imager	Intas, Deutschland
Elektrophoresekammer MaxiWide	G&P Kunststofftechnik, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, USA
Feinwaage R 200 D	Sartorius, Deutschland
Filterpapier	Mitsubishi, Japan
Gel-Blotting-Papier	Whatman, Vereinigtes Königreich
Hamilton Mikroliterspritze Typ 701SN/J	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Laboratory Medical Centrifuge 3000	Lab4You, Deutschland
Lab-Tek Nunc Chambered Coverglass	Merck, Deutschland
Lab-Tek Nunc Chamber Slide System	Merck, Deutschland
Well-Platten (6-, 12-, 24-well-Platten)	Nalge Nunc International, Dänemark
Lumineszenzbild-Analysator LAS 1000	Fuji, Japan
Magnetrührfisch	Merck, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmittel	Firma, Herkunftsland
Mikroreaktionsgefäße 0,5/1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop Zeiss LSM 780	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikrotiterplatte 96-well	Sarstedt, Deutschland
Mikrotiterplatten-Lesegerät Tecan Spectra Classic	Tecan, Deutschland
Millicell-Polycarbonat (PCF)-Zellkulturfilter, 0,4 µm	Millipore, Irland
Mini Centrifuge	Labnet International, USA
Monovetten	Sarstedt, Deutschland
Nano Drop Spektrophotometer ND 1000	peqLab Biotechnologie, Deutschland
Neubauer Zählkammer HECHT 97647	Schreck Hofheim, Deutschland
Nucleofector Amaxa TM II	Lonza, Schweiz
Petrischalen	Nalge Nunc International, Dänemark
Pinzette	Teqler NetMed S.à.r.l., Luxemburg
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 5/10/25 ml	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Transfermembran	NEN-Life Sciences, Deutschland
Reaktionsgefäße 2,5/15/50 ml	Sarstedt, Deutschland
Schüttler HT CH-4103	Infors AG, Schweiz
Taumelschüttler WT-12	Biometra, Deutschland
Temperierbecken	Haake, Deutschland
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, USA
Thermal Cycler C 1000	Bio Rad, USA
Trockenblockthermostat	Grant, Deutschland
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Widerstandsmessgerät	D. Sorgenfrei, Deutschland
Zentrifuge Avanti J25	Beckman, Deutschland
Zentrifuge Z233MK	Hermle, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmittel	Firma, Herkunftsland
Zellbrutschrank Kelvitron T	Heraeus, Deutschland
Zellkulturbank BSB 4A	Gelaire, Australien
Zellkulturflaschen 10 ml, 50 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zellschaber	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

3.1.2 Chemikalien und Primer

In der folgenden Tabelle sind die von mir verwendeten Chemikalien mit Angabe der produzierenden Firma und dem Herkunftsland aufgeführt.

Tab. 8: Chemikalien

Substanz	Firma, Herkunftsland
Ampicillin	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Acrylamid	Merck, Deutschland
Agarose	Biozym, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Deutschland
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Casein (gewonnen aus boviner Milch)	Merck, Deutschland
Cutsmart Puffer	New England Biolabs, USA
DAPI-Antikörper	Boehringer-Mannheim, Deutschland
DNA-Ligase T4	New England Biolabs, USA
Dulbecco's Minimum Essential Medium	BioChrom AG, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Deutschland
Ethanol 80 %	Chemsolute, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Deutschland
Ficoll	Sigma Aldrich, USA
Glycin	Serva, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Deutschland

Substanz	Firma, Herkunftsland
High Fidelity DNA Polymerase <i>Phusion</i>	New England Biolabs, USA
High Fidelity-Puffer <i>Phusion</i>	New England Biolabs, USA
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Methanol	Merck, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Deutschland
Nhe1-Restriktionsenzym	New England Biolabs, USA
Non-Essential Amino Acid Solution (NEAA)	Merck, Deutschland
Not1-Restriktionsenzym	New England Biolabs, USA
Nukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Orthoborsäure (Acidum boricum)	Merck, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	
PBS ^{+Ca/Mg} -Lösung	Merck, Deutschland
PBS ^{-Ca/Mg} -Lösung	Merck, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Polysorbat-20 (Tween)	Merck, Deutschland
Pro-Tags-Mount-Flour	Biocyc GmbH & Co. KG, Deutschland
Protein-Assay-Reagenzien BCA	Pierce, USA
Proteinstandard SDS-7B	Merck, Deutschland
PstI-Restriktionsenzym	New England Biolabs, USA
Puffer NEB 3.1	New England Biolabs, USA
Puromycin-Dihydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Reaktionspuffer für die T4-DNA Ligase	New England Biolabs, USA
Saponin	Sigma Aldrich, USA
Serumalbumin, bovines (BSA)	AppliChem, Deutschland
SOC-Medium	Merck, Deutschland
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Life Technologies, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan-Base	Merck, Deutschland

Substanz	Firma, Herkunftsland
Triton X-100	Boehringer, Deutschland
Trypsinlösung	Gibko Invitrogen, USA
Ziegen-Serum	Zymed, Deutschland

Primer

Folgend werden die in der PCR verwendeten Primer sowie Firma, Herkunftsland und die vom Hersteller empfohlene Annealing-Temperatur genannt.

Tab. 9: Primer

Gen	Forward Sequenz und Annealing-Temperatur	Reverse Sequenz und Annealing-Temperatur	Firma, Herkunftsland
MICA*008	5'-AAA AGC TAG CCC CAA GCT TGG TAC CGA G-3' (72 °C)	5'-TAG ATG CAT GCT CGA GCG-3' (56 °C)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
MICA*019	5'-AAA AGC TAG CAT GGG GCT GGG CCC GGT C-3' (76 °C)	5'-GAT GCA TCG AGC GGC-3' (61 °C)	
MICB	5'-AAA AGC TAG CAT TCG GCT TGC GTC GAC G-3' (72 °C)	Reverse 1: 5'-CTA GGC GCC CTC AGT GGA-3' (61 °C) Reverse 2: 5'AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA AGT GCC GTG ATT CC-3' (79 °C)	

3.1.3 Antikörper

Folgend findet sich eine Auflistung der in den Immunfärbungen, Western Blot-Experimenten und in der FACS-Analyse (Durchflusszytometrie, *engl. fluorescence-activated cell sorting*) verwendeten Antikörper. Den Tabellen zu entnehmen ist das Zielprotein, das Experiment, in dem der Antikörper zur Verwendung kam, die Verdünnungsstufe, in der der Antikörper appliziert wurde und die Firma, von der der Antikörper erworben wurde, sowie deren Herkunftsland. Unter primären Antikörpern finden sich Antikörper, welche direkt an das zu untersuchende Protein binden. Die sekundären Antikörper binden in einem zweiten Färbeschritt an den primären Antikörper und sind an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt.

Primäre Antikörper

Tab. 10: Primäre Antikörper. *m* = mouse; *rb* = rabbit; *α* = anti; *IF* = Immunfluoreszenz; *WB* = Western Blot; *FACS* = fluorescence-activated cell sorting)

Antikörper	Zielprotein	Experiment	Verdünnung	Firma, Herkunftsland
m-α-MICA	MICA	IF WB	1:25 1:100	R&D, USA
m-α-MICA	MICA	IF	1:50	Santa Cruz Biotechnology, USA
m-APC-α-MICA	MICA	FACS	1:1000	R&D, USA
m-α-MICB	MICB	IF WB	1:50 1:100	R&D, USA
rb-α-MICA/B	MICA, MICB	IF	1:50	Santa Cruz Biotechnology, USA
m-α-HA	HA	IF WB	1:100 1:500	Santa Cruz Biotechnology, USA
m-α-HA	HA	IF WB	1:200 1:500	Cell Signaling Technology, USA
m-α-Occludin	Tight Junction: Occludin	IF	1:100	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
rb-α-EEA1	Frühe Endosomen	IF	1:1000	Abcam, Vereinigtes Königreich
rb-α-rab8	Endosomen im Trans-Golgi Netzwerk	IF	1:100	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
m-α-rab11	Recycling- Endosomen	IF	1:50	Becton, Dickinson & Company, USA
m-α-E-Cadherin	Epitheliales Cadherin (E-Cadherin)	IF	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA
m-α-ZO-1	Tight Junction: Zonula occludens 1 (ZO-1)	IF	1:50	Becton, Dickinson & Company, USA
rb-α-ZO-1	Tight Junctions: ZO-1	IF	1:50	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Phalloidin-Alexa- Fluor-594	Zytoskelett: Aktin	IF	1:50	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Sekundäre Antikörper

Tab. 11: Sekundäre Antikörper. m = mouse; rb = rabbit; α = anti

Antikörper	Firma, Herkunftsland
Alexa Fluor 488 goat α -m	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Alexa Fluor 594 goat α -rb	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

3.1.4 Lösungen

Im Folgenden sind die Puffer, Lösungen und Pipettieransätze zusammen mit dem Experiment, in dem diese zur Anwendung kamen, aufgeführt. Die jeweiligen Stammlösungen und Ansätze orientieren sich zu weiten Teilen an den Protokollen des Labors des Instituts für Klinische Physiologie der Charité, Campus Benjamin Franklin.

Tab. 12: Puffer und Lösungen. Die jeweiligen Ansätze sind den Empfehlungen/Protokollen des Labors für Klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin, entnommen und weichen z.T. geringfügig davon ab.

0,6 – 1,2 % Agarosegel zur Elektrophorese		
0,6 – 1,2 g	Agarose	
100 ml	1 x TBE Puffer	
8,5 % Acrylamid-Trenngel zum Western Blot		
200 μ l	SDS (10 %)	
200 μ l	APS (10 %)	
4,7 ml	Tris	
9,2 ml	H ₂ O	
5,7 ml	Acrylamidlösung (30 %)	
10 μ l	TEMED	
Blockierlösung zur Immunfluoreszenzfärbung		
5 – 7,5 g	Serumalbumin, bovines (BSA) oder alternativ Milchpulver	
30 ml	Ziegen Serum (6 %)	ad 500 ml PBS ^{+Ca/Mg}
Blockierlösung zum Western Blot		
5 g	BSA oder alternativ Milchpulver	ad 100 ml TBST-Puffer
BCA-Protein-Assay-Reagenz zur Proteinquantifizierung im Western Blot		

196 x	Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , Bicinchoninsäure (BCA), Natriumtartrat, 0,1 M NaOH	Lösung A
4 x	Kupfer(2)sulfat (4 %)	Lösung B
Elektrophoresepuffer zur Elektrophorese		
500 ml	10 x Puffer West	
50 ml	10 % SDS	ad 500 ml Aqua _{bidest}
Gesamtlysepuffer zur Proteinisolierung		
150 mM	Natriumchlorid	
10 mM	Tris-Cl	
0,1 %	SDS	
0,5 %	Triton X-100	
1 Tablette	Complete Mini (Roche)	
IELs-Isolierungspuffer zur Durchflusszytometrie		
5 ml	PBS ⁻	
1 mM	DTT	
1 mM	EDTA	
Kulturmedium für Caco-2-bbe-Zellen		
500 ml	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	
55 ml	FKS (Fetales Kälberserum)	
5,5 ml	Penicillin-Streptomycin	
5 ml	NEAA	
5 ml	10 µM HEPES	
Laemmli-Puffer zum Western Blot		
0,125 M	Tris	
20 %	Glycerol	
10 %	2-Merkaptoethanol	
4 %	SDS	
0,004 %	Bromphenolblau	
Laufpuffer zum Western Blot		
30,3 g	Tris	
144,2 g	Glycin	

10 g	SDS	ad 1000 ml Aquabidest
Lysogeny-Broth-Agar-Medium (LB-Medium) zur Transformation		
5 g	Hefeextrakt	
10 g	Trypton	
5 g	NaCl	
15 g	Agar	ad 1000 ml Aquabidest
LumiLight Reagenz zum Western Blot		
5 ml	Enhancerlösung	
5 ml	Peroxidlösung	
Lysepuffer zur Proteinisolierung		
2 ml	Tris-Cl	
0,5 ml	MgCl ₂	
120 µl	EGTA	
200 µl	EDTA	
10 Tabletten	Complete Mini (Roche)	ad 100 ml H ₂ O
Paraformaldehydlösung (2 %) zur Fixierung von Zellen		
4 ml	PFA (16 %)	
30 ml	PBS ^{+Ca/Mg}	
PBS/Polysorbat-20 (Tween) zum Western Blot		
1 Tablette	PBS	
0,5 ml	Polysorbat-20 (Tween)	ad 500 ml Aquabidest
PCR-Mastermix zur Polymerisierung		
105,6 µl	PCR Grade Water	
32,5 µl	10 x Phusion High Fidelity Puffer	
3,2 µl	dNTP Mix (10 mM)	
3,2 µl	DNA (10 ng/µl)	
1,5 µl	Phusion High Fidelity DNA Polymerase	
PCR-Mastermix zur Restriktion zur Herstellung von Sticky Ends		
70 µl	Cutsmart	
3,5 µl	Nhe1	
3,5 µl	Not1	
2 µl	DNA (25 ng/µl)	ad 63 µl H ₂ O

PCR-Mastermix zur Ligation		
1 µl	Vektor	
1 µl	DNA-Ligase T4 Puffer	
0,5 µl	DNA-Ligase T4	
7,5 µl	DNA (25 ng/µl)	
Permeabilisierungslösung zur Immunfluoreszenz		
0,5 – 2 ml	Triton-X 100	ad 100 ml PBS ^{+Ca/Mg}
Restriktionsverdau-Mastermix		
Puffer NEB 3.1	39 µl	
PstI	3,24 µl	ad 87,75 µl Aqua _{bidest}
Sammelgel zum Western Blot		
9,8 ml	Sammelgellösung	
100 µl	APS	
100 µl	SDS	
10 µl	TEMED	
Sammelgelpuffer zum Western Blot		
0,25 M	Tris	
0,2 %	SDS	
SOB-Medium (Super Optimal Broth) zur Transformation		
20 g	Trypton	
5 g	Hefeextrakt	
20 mM	Glucose	
0,2 g	KCl	
0,6 g	NaCl	
10 mM	MgSO ₄	
10 mM	MgCl ₂	ad 1000 ml Aqua _{bidest}
10x Westpuffer zum Western Blot		
30,4 g	Tris	
144 g	Glycin	ad 1000 ml Aqua _{bidest}
10x TBE Puffer zur Elektrophorese		
0,02 M	EDTA	
0,89 M	Tris	

0,89 M	Borsäure	ad 1000 ml Aqua _{bidest}
10x TBS zum Western Blot		
1,5 M	NaCl	
30 mM	KCl	
250 mM	Tris	ad 1000 ml Aqua _{bidest}
TBS-T zum Western Blot		
100 ml	TBS 10x	
1 ml	Polysorbat-20	ad 1000 ml Aqua _{bidest}
Transferpuffer zum Western Blot		
100 ml	10 x Westpuffer	
100 ml	Methanol	ad 1000 ml Aqua _{bidest}
Trenngelpuffer zum Western Blot		
0,2 %	SDS	
0,75 M	Tris	

3.1.3 Experimentier-Kits

Im Folgenden sind kommerziell erhältliche, vorgefertigte Kits, der Name des Experiments, in dem das Kit zu Verwendung kam, sowie der Name und das Herkunftsland der produzierenden Firma aufgelistet.

Tab. 13: Experimentier-Kits

Name des Experimentier-Kits	Name des Assays	Firma, Herkunftsland
Amaya Nucleofector Kit	Nukleofektion	Lonza, Schweiz
Kit Lumi-Light	Western Blot	Roche, Deutschland
NucleoSpin und PCR Purifikation	PCR	Clontech, USA
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit QIAGEN Plasmid Plus Mini Kit	Gewinnung von Plasmid-DNA	QIAGEN, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit		

3.1.5 Anwenderprogramme

Die folgenden Programme kamen in der vorliegenden Arbeit zur Verwendung. Name, Firma sowie Herkunftsland des Programmes zusammen mit dem Experiment, in dem dieses zur Verwendung kam, sind aufgeführt.

Tab. 14: Anwenderprogramme

Name des Programmes	Name des Assays	Firma, Herkunftsland
AIDA Image Analyzer for Windows	Western Blot, Auswertung der Immundetektion	Raytest, Deutschland
FlowJo	Durchflusszytometrie	Becton, Dickinson & Company, USA
GraphPad PRISM	Statistische Analyse	GraphPad Software Inc., USA
ImageJ/Fiji	Bildprozessierung, Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	Wayne Rasband, USA
Microsoft Power Point Microsoft Excel Microsoft Word	Erstellen von Graphiken Statistik, Erstellen von Graphen Schreiben der Monographie	Microsoft, USA
SnapGene Viewer	Darstellung von Genkarten	GSL Biotech LLC, USA
ZEN	Konfokale Mikroskopie, Auswertung	Carl Zeiss AG, Deutschland
Zotero	Zitieren	Roy Rosenzweig Center, George Mason University, USA

3.1.6 Epithel- und Expressionszelllinien

Im Folgenden sind die in der Doktorarbeit verwendeten Epithel- und Expressionszelllinien sowie deren Ursprungsgewebe aufgeführt.

Tab. 15: Epithel- und Expressionszelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Herkunft
Caco-2-bbe	Humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen	ATCC, USA
HEK	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Erhalt der MIC-cDNAs und Konstruktion der MICA/-B-Vektoren

Die MICA*008, MICA*019 und MICB-cDNAs wurden uns freundlicherweise von Dr. Mar Valés-Goméz (Spanish National Research Council, Department of Immunology and Oncology, Madrid, Spanien) im Rahmen einer Kooperation überlassen. Im Folgenden wurde die cDNAs der verschiedenen MICA/-B-Konstrukte aus dem spanischen Mutterkonstrukt extrahiert und in den Säugetier-Expressionsvektor pCI-puro inseriert.

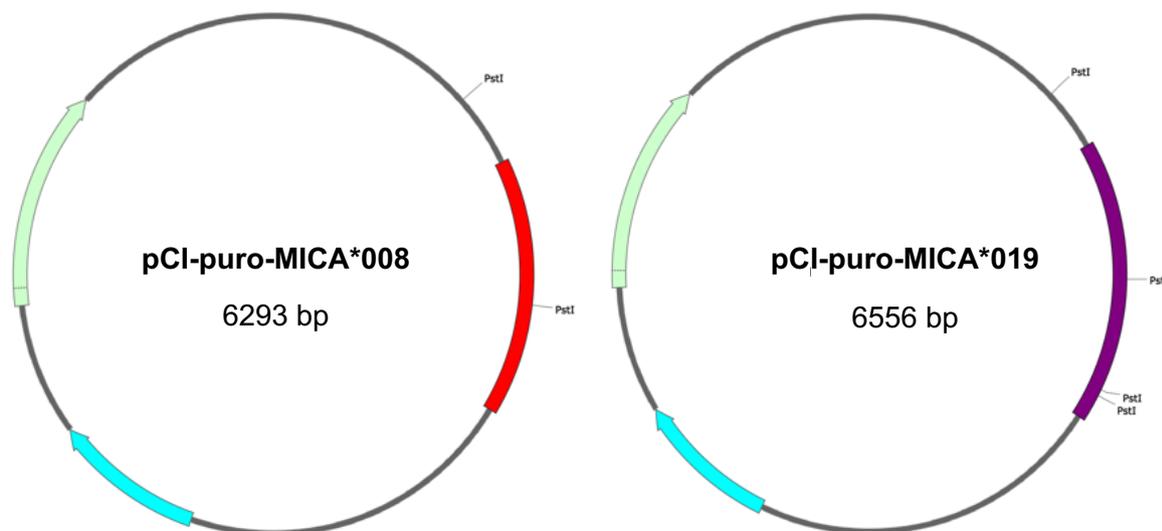


Abb. 5: Vektorkarte von MICA*008 und MICA*019. Links: MICA*008 (rot), rechts: MICA*019 (violett). Ampicillinresistenz türkis, Puromycinresistenz hellgrün. Die Vektorkarten wurden mit dem Programm SnapGene erstellt. Dargestellt sind außerdem die Schnittstellen des Restriktionsenzym PstI, welches für den Kontrollrestriktionsverdau (siehe Abb. 8) verwendet wurde.

In den Vektorkarten erkennt man die Struktur der MICA-DNAs und insbesondere die Stelle, an der das jeweilige Konstrukt eingefügt wurde.

3.2.2 Plasmidsubklonierung

Mittels Subklonierung können Gene von einem Vektor in einen anderen transferiert werden. Dies erfolgte in mehreren Schritten.

PCR

Um das MICA/-B-Gen aus dem spanischen Muttervektor zu amplifizieren, wurde die PCR-Methode verwendet. Im ersten Schritt wurden dabei die DNA-Doppelstränge für 30 s bei einer Temperatur von 98 °C denaturiert und so in Einzelstränge gespalten. Anschließend binden ausgewählte Oligopeptide (Primer) nach Absinken der Temperatur auf 64 °C für 15 s an die Sequenz der DNA, die kopiert werden soll. Dieser Schritt wird Hybridisierung genannt. Es folgte die Elongation; hierbei synthetisierte die DNA-Polymerase bei 72 °C für 25 s mit dNTPs den komplementären DNA-Strang. Die Denaturierung, Hybridisierung und Elongation können mittels Temperaturregulation initiiert und beendet werden; der Zyklus wurde zur Amplifikation der DNA 25-mal wiederholt.

Restriktionsverdau des PCR-Produkts und des Zielvektors pCI-puro mit Nhe und Not1

Um DNA-Sequenzen an einer definierten Stelle zu schneiden, können Restriktionsendonukleasen verwendet werden. Dies sind Enzyme, die DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen – sogenannten Restriktionsstellen – erkennen und schneiden können. Im Rahmen einer Klonierung wird die Restriktionsendonuklease so ausgewählt, dass nach dem Restriktionsverdau eine Ligation mit dem gewünschten Vektor in korrekter Orientierung möglich ist.

Aus dem Ursprungsvektor wurde die gewünschte DNA-Sequenz mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten und danach mittels Gelelektrophorese gereinigt. In der vorliegenden Arbeit kamen die Restriktionsenzyme Nhe1 und Not1 nach Vorgabe der Hersteller zur Anwendung. Parallel dazu wurde durch dieselben Restriktionsenzyme, welche zum Schneiden der DNA-Sequenz aus dem Ursprungsvektor verwendet wurden, der Zielvektor verdaut, um an den Schnittstellen mittels eines Ligaseenzymes das gewünschte Gen einfügen zu können.

Gelelektrophorese der DNA-Fragmente des Restriktionsverdaus und Isolieren des gesuchten Segments unter UV-Licht

Nach dem Restriktionsverdau sind mehrere Fragmente entstanden; um das zu untersuchende Fragment zu isolieren, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Elektrophorese beschreibt die Bewegung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld durch eine kondensierte Phase. Die Geschwindigkeit der Bewegung der Nukleinsäuren ist

von mehreren Eigenschaften abhängig: Von Größe, Masse und Ladung der Teilchen und gleichzeitig der Viskosität des Mediums. Beim Agarose-Gel hängt die Größe der Poren von der Konzentration der Agarose ab. Zur Herstellung eines 1,2 % Agarose-Gels wurden 1,2 g Agarose eingewogen und in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml TBE-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung in einer Mikrowelle für 2 min bei 800 W erhitzt. Der Erlenmeyerkolben wurde aus der Mikrowelle genommen, vorsichtig geschwenkt und abermals für 1 min bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt, wobei die Lösung kurz zum Kochen gebracht wurde. Die heiße Lösung wurde in den Gelschlitten im Gießstand gegossen. Ein Kamm wurde an der äußeren Aussparung eingesetzt. Anschließend kühlte das Gel für mindestens 30 min aus. Währenddessen wurden der DNA-Größenstandard und die zu untersuchenden Proben vorbereitet.

Nach Erkalten des Gels wurde der Gelschlitten aus dem Gießstand entfernt und in der Elektrophoresekammer platziert. Die Elektrophoresekammer wurde mit TBE-Puffer ausgefüllt, bis das Gel mit 1-2 mm Puffer bedeckt war. Folgend wurden die Proben in die Täschchen des Gels geladen und die Elektrophoresekammer mit dem Transformator verbunden. Eine Spannung von 120 V wurde angelegt, bis die Bromphenolblau-Front 3 cm vom Rand entfernt war. Anschließend wurde das Gel in eine Ethidiumbromid-Färbelösung überführt und in dieser 20 min inkubiert und danach in destilliertes Wasser überführt. Im letzten Schritt wurde eine Photographie des mit Ultraviolett-Licht (UV-Licht) exponierten Gels hergestellt und die Größen anhand eines Größenmarkers ausgewertet. Es wurde darauf geachtet, die Belichtungszeit minimal zu halten, da UV-Licht DNA-Schäden hervorrufen kann.

Elution der DNA aus Agarose-Gel

Zur Elution und Reinigung der DNA aus dem Agarose-Gel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Die zu präparierenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Auf 100 mg Gel wurden je 400 µl Puffer QC hinzugegeben und die Lösung für 10 min bei 50 °C bis zur Auflösung der Agarose inkubiert und anschließend mit dem Vortexer geschüttelt. 500 µl Isopropanol wurden beigemischt und die Lösung geschwenkt. Die Lösung wurde auf ein 2 ml-Sammelgefäß gestellt und 1 min bei 2380 xg (*engl. g-force*) zentrifugiert (entsprechend 5000 rpm, *engl. rotations per minute*, in der Zentrifuge Z233MK, Hermle), der Überstand verworfen. 0,5 ml Puffer QC wurden hinzugefügt und die Suspension abermals zentrifugiert, der Überstand verworfen. Zum Waschen wurden 750 µl Puffer PE hinzupipettiert, bei Raumtemperatur (RT) für 2 min inkubiert und danach für 1 min bei 2380 xg zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden 50 µl Puffer EB hinzugefügt und die Lösung für 1 min bei 2380 xg zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde aufgefangen.

Ligation in pCI-puro

Mittels Ligation wurden die PCR-Amplifikate nun in den Vektor eingeschleust. Mittels der T4-DNA Ligase (New England Biolabs) wurden die DNAs in den eukaryoten Expressionsvektor pCI-puro geschleust. Dieser weist einen CMV-Promotor und zudem eine Ampicillin- sowie Puromycinresistenz auf. Durch die Puromycinresistenz wurde eine spätere Selektion von Zellen in puromycinhaltigem Medium ermöglicht. Die Ligation erfolgte über 36 h bei 14 °C.

3.2.3 Transformation

Im Zuge der Transformation als Teilschritt des Klonierens wurde die rekombinante DNA nach Ligation in den Zielvektor in kompetente Bakterien (*E. coli* XL-1 Blue, Agilent, USA) geschleust und auf diese Weise propagiert. Da bei der bakteriellen Zellvermehrung ebenfalls der inserierte Vektor vervielfacht wird, dient die Methode der Amplifikation des DNA-Fragments.

Herstellung kompetenter Bakterien zur Elektroporation

Als elektrokompente Zellen wurde der *E. coli*-Stamm XL-1 Blue verwendet. Ein Erlenmeyerkolben mit 5 ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie *E. coli* inokuliert und 12 h bei 37 °C im Bakterenschüttler (Inkubatorschüttler HT CH-4103, Infors) bei 400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden hiervon 2,5 ml in 500 ml LB-Medium pipettiert und bis zum Erreichen einer OD_{595nm} von 0,5 bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt (Inkubatorschüttler HT CH-4103, Infors). Danach wurde die Suspension gekühlt (5 min, 4 °C) und für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (2000 xg, Zentrifuge Avanti J25, Beckmann). Das Bakterienpellet wurde zweimal in 40 ml 4 °C kaltem Aqua_{bidest} gewaschen und abzentrifugiert. Im letzten Waschschrift wurde das Pellet mit 40 ml 4 °C 10 % Glycerin resuspendiert und erneut abzentrifugiert (2000 xg, 5 min, 4 °C, Zentrifuge Avanti J25, Beckmann). Abschließend wurde dem Pellet 1 ml 10 % Glycerin hinzugefügt und auf 80 µl Aliquots in Mikroreaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Transformation mittels Elektroporation

50 µl der auf -80 °C gefrorenen Zellsuspension wurden auf Eis angetaut. Die DNA, 2 µl Ligationprodukt, wurde hinzugefügt. Die Zell-DNA-Suspension wurde in die Elektroporationskuvette überführt und für 5 ms mit einem 1,8 kV Puls versetzt. 800 µl SOC in RT wurden unmittelbar hinzugefügt und die Lösung für 1 Stunde mit 25 xg (Zentrifuge Z233MK, Hermle) bei 37 °C geschüttelt. Abschließend wurden 50 µl der Lösung auf einer LB-Agar-Platte mit 50 µg/ml Ampicillin gleichmäßig verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Auf allen Platten wurden nach einer Wachstumszeit von 14 h zahlreiche (> 40) Kolonien gesehen. 50 ml LB-Medium mit 100

µl Ampicillin wurden mit einzelnen Kolonien beimpft und für weitere 12 h bei 37 °C mit 400 rpm geschüttelt (Inkubatorschüttler HT CH-4103, Infors). Das LB-Medium mit den angewachsenen Bakterien wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4000 xg 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Avanti J25, Beckmann).

3.2.4 Plasmidpräparation mittels Mini-Prep

Um kleine Mengen an Plasmiden (etwa 20 µg laut Angaben des Herstellers QIAGEN, USA) aus den transformierten Bakterien zu isolieren, eignet sich die Mini-Prep. Die Präparation wurde anhand des Protokolls des Herstellers QIAGEN, USA, durchgeführt. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Das in der Zentrifugation entstandene Bakterienpellet wurde zunächst in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und danach in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Danach wurden 250 µl Puffer P2 hinzugefügt und die Lösung fünf Mal invertiert. Im nächsten Schritt wurden 350 µl Puffer N3 vermischt und die Lösung abermals invertiert. Nach diesem Schritt imponierte die Lösung trübe. Die Lösung wurde nun für 10 min zentrifugiert (18.000 xg, Zentrifuge Z233MK, Hermle; dieselben Einstellungen wurden für sämtliche Zentrifugations-schritte des Mini-Prep-Protokolls verwendet). 800 µl des Überstands wurden nun in eine QIAprep-Säule (*QIAprep spin column*) überführt und für 60 sek zentrifugiert. Durch Zentrifugation in der Säule wird überschüssige Flüssigkeit nach unten abgepresst. Die durchgepresste Flüssigkeit wird in einem zweiten Teil der Säule abgefangen und verworfen. Der Lösung wurden 0,5 ml Puffer PB hinzugefügt und es wurde nochmals für 60 sek zentrifugiert. Derselbe Schritt wurde mit 0,75 ml Puffer PE wiederholt. Im letzten Schritt wurde die QIAprep-Säule in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und 50 µl Puffer EB hinzugefügt, für 1 min ruhen gelassen und abschließend 1 min zentrifugiert.

3.2.5 Restriktionsanalyse mit PstI

Die Restriktionsanalyse ist eine Methode zur Bestimmung der Identität von DNA. Die DNA wird zunächst mit Restriktionsenzymen behandelt und folgend durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. In der Gelelektrophorese werden Nukleinsäurestränge entsprechend ihrer Größe getrennt und können anschließend durch Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit kam das Restriktionsenzym PstI mit den in Abb. 5 dargestellten Schnittstellen nach Vorgabe der Hersteller zur Anwendung. Somit konnte vor der abschließenden Plasmidpräparation die Korrektheit der entstandenen DNA-Sequenz kontrolliert werden. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse mit PstI ist in Abb. 8 dargestellt.

3.2.6 Plasmidpräparation mittels Midi-Prep

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einem größeren Volumen (50 ml) und bis zu einer Menge von 250 µg eignet sich die Midi-Prep. In dieser Arbeit wurde das QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit verwendet, in dem sich alle Reagenzien und erforderlichen Tools befinden. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 aufgelöst, 4 ml P2 hinzugefügt, mehrmals invertiert und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurden dem Lysat 4 ml Lösung S3 hinzugefügt, die Suspension geschwenkt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. In dieser Phase schwimmt ein Präzipitat aus Proteinen, genomischer DNA und Detergenzien auf der Oberfläche der Lösung. Nach Zentrifugation (14.000 xg, 30 min, 4 °C, Zentrifuge Z233MK, Hermle) wurde der Überstand durch einen Faltenfilter auf eine Säule überführt, welche zuvor mit 4 ml QTB-Puffer äquilibriert wurde. Danach erfolgte das zweimalige Waschen der Säule mit je 10 ml Puffer QC. Um die Plasmide in Lösung zu bringen, wurden 5 ml Puffer QF hinzugegeben. 3,5 ml 100 % Isopropanol wurden hinzugefügt und die Lösung zentrifugiert (14.000 xg, 30 min, 4 °C, Zentrifuge Z233MK, Hermle). Anschließend wurde das Pellet mit 2 ml Ethanol (80 %) gewaschen, zentrifugiert (14.000 xg, 15 min, 4 °C) und vakuumgetrocknet. Die extrahierte DNA wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.7 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA in wässriger Lösung (Verdünnung 1:50) wurde in einem Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit A₂₆₀ entspricht 50 µg/ml Doppelstrang-DNA (dsDNA). Mittels Bestimmung der Absorption bei 280 nm und Bildung des Quotienten A₂₆₀/280 kann zudem der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Der Wert des Quotienten sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

3.2.8 Zellkultur mit Caco-2-bbe-Zellen

Als Zellmodell zur Expression von MICA*008, MICA*019 und MICB wurden Caco-2-bbe-Zellen verwendet. Die Abkürzung *bbe* steht hierbei für *brush border enzymes*. Dabei handelt es sich um eine Linie aus humanen epithelialen Kolon-Adenokarzinomzellen. Obgleich diese Linie aus Kolonzellen stammt, differenziert und polarisiert sie sich unter bestimmten Kultivierungsbedingungen, so dass sie phänotypisch, morphologisch und funktionell Dünndarmenterozyten entspricht (164,165). Während des Konfluierens beginnen sich Caco-2-bbe-Zellen zu polarisieren und bilden einen charakteristischen apikalen Bürstensaum (*engl. brush border*) mit Mikrovilli. Zudem exprimieren sie für Dünndarmzellen typische Tight Junctions, Mikrovilli und zahlreiche Enzyme und Transporterproteine wie Peptidasen, Esterasen, Laktase, Aminopeptidase N und Aufnahmetransporter für Aminosäuren, Gallensäuren und Carbonsäuren (166). Caco-2-bbe-Zellen entstammen der Caco-2-Linie und weisen eine spezifischere Expression der *brush border enzymes* auf (167,168).

Caco-2-bbe-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) in 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep), 1 % Non-Essential Amino Acid (NEAA) und 1 % HEPES in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂-Anteil kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Die Passagierung der Zellen erfolgte jeden siebten Tag mittels Trypsinierung. Dabei wurden zunächst 5 ml PBS⁻ in die Zellkulturflasche pipettiert und die Flasche leicht geschwenkt. Nach Entfernung des PBS⁻ wurden die Zellen mittels 1 ml Trypsin (Inkubationszeit etwa 8 min bei 37 °C) vom Boden gelöst und danach 10 ml Medium hinzugefügt. Durch acht- bis zehnmaliges schnelles Pipettieren des Mediums wurden die Zellen von dem Boden der Zellkulturflasche in DMEM abgelöst. Die Zellen wurden dann in ein 50 ml Falcon überführt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur neuen Aussaat wurden etwa 10.000 Zellen in 6 ml DMEM in eine Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.9 Transiente Transfektion der Caco-2-bbe-Zellen

Zur Etablierung wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet; zuerst erfolgte die Transfektion mittels Elektroporation. Dabei wird die Zellmembran durch Spannungspulse permeabel gemacht; da mittels dieser Methode nur eine Transfektionseffizienz von 10 bis 20 % erreicht werden konnte, wurde eine Transfektion mittels Lipofektion etabliert. Hierbei wird der Vektor durch Einschluss in Liposomen – Mizellen-ähnliche Strukturen – in den Zellkern geschleust.

3.2.9.1 Nukleofektion

Caco-2-bbe-Zellen wurden 24 h vor Nukleofektion passagiert und die Nukleofektion bei lichtmikroskopisch geprüfter Konfluenz von 70 % durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden Millicell-PCF Filter mit 0,4 µm-Porengröße in 6-well-Platten verwendet. Pro Ansatz wurden je 750.000 Zellen ausgesät und je 2 µg DNA verwendet. Nukleofektiert wurden MICA*008, HA-MICA*008, MICA*019, HA-MICA*019, MICB, HA-MICB und der Leervektor pCI-puro sowie der mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markierte Vektor pCI-puro-GFP als Kontrollen.

Nucleofector Solution T, Medium und FKS wurden auf RT gewärmt. Die Zellen wurden in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (90 xg, 10 min, Zentrifuge Z233MK, Hermle) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das entstandene Pellet in 100 µl Nucleofector Solution T wieder aufgelöst. Der Suspension wurden 2 µg DNA zugefügt und die Lösung in eine Amaxa-Elektroporationskuvette überführt. Als Nukleofektionsprogramm wurde im Nucleofektor Amaxa TM II der Modus B-024 gewählt. Die Kuvette wurde unmittelbar nach Abgabe des elektrischen Impulses aus dem Nucleofektor entfernt und 300 µl vorgewärmtes

Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde auf die Filter transferiert; 24 h nach Transfektion wurde puromycinhaltiges Medium verwendet. Die Fixierung der Zellen erfolgte zur Etablierung der optimalen Transfektionseffizienz nach 24, 48, 72 und 96 h.

3.2.9.2 Lipofektion

Die Lipofektion erfolgte mittels der Lipofektaminlösung *Lipofectamin 2000*. Dabei wurden 10^5 Zellen auf eine 24-well-Platte gesät und mit Vollmedium für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden zwei Lösungen in Mikroreaktionsgefäßen vorbereitet:

- A. 25 μ l Medium ohne FKS + 0,5 μ g DNA
- B. Mastermix Lipofektaminlösung: 160 μ l Medium ohne FKS + 12 μ l *Lipofectamin 2000*

Beide Lösungen wurden 5 min bei RT inkubiert, anschließend die verdünnte DNA-Lösung A mit der verdünnten Lipofektaminlösung B im Verhältnis 1:1 gemischt und 15 min zur Bildung von Mizellen bei RT inkubiert. Im letzten Schritt wurden je 300 μ l Vollmedium mit DNA-Lipid-Komplex-Lösung gelöst und die gesamte Lösung auf die 24-well-Platte verteilt. Nach 18 h wurden die einzelnen Wells der 24-well-Platte mit Medium aufgefüllt; nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel. Die Zellen wurden für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h inkubiert. Eine Inkubationszeit von 48 h etablierten wir als optimale Bedingung für die folgenden Färbungen. Mittels dieser Methodik wurde eine Transfektionseffizienz von 20 bis 30 % erzielt.

3.2.10 Stabile Transfektion der Caco-2-bbe-Zellen

Da transient transfizierte Zellen das fremde Plasmid nur über eine begrenzte Zeit in ihrem Genom tragen und das Protein exprimieren – üblicherweise 48 bis 96 h – wurden stabil MICA/B-exprimierende Zelllinien generiert. Diese erlauben aufgrund der flächendeckenden Expression von MICA/B im Epithelzelllayer eine einfachere und reproduzierbare Untersuchbarkeit der Zellen. Im Gegensatz zu transienten Transfektionen wird die DNA permanent in das Genom der Zellen integriert und somit bei Zellteilung auch an die Tochterzelle weitergegeben. Eine stabile Transfektion erfordert sowohl ein effizientes Einschleusen der Plasmide als auch eine Methode, um die Plasmid-tragenden Zellen zu selektieren. Dazu enthält das eingeschleuste Plasmid neben dem zu untersuchenden Gen DNA-Sequenzen, die für eine selektionierende Antibiotikaresistenz kodieren. Als Selektionsgen wurde eine Puromycinresistenz-kodierende Sequenz in den Vektor pCI-puro integriert. Mittels der Puromycinresistenz-kodierenden DNA im Zielvektor pCI-puro wurde eine Selektion in puromycinhaltigem Medium etabliert. Da die Transfektionseffizienz in der transienten Transfektion mittels Lipofektion deutlich höher war, wurde für die stabile Transfektion ausschließlich die Lipofektion nach oben

beschriebenem Protokoll verwendet. Nach Lipofektion wurden die Zellen nach 48 Stunden erstmals in dem Selektionsmedium mit Puromycin (Konzentration 10 µg/ml) kultiviert. Die Konzentration des Antibiotikums wurde in einem *Kill Curve* Experiment ermittelt (siehe 3.2.10.1). Sobald in der Kontrolle (GFP-transfizierte Caco-2-bbe-Zellen ohne Puromycinresistenz) keine Zelle mehr adhärent war – nach 5 Tagen – wurde die Puromycinkonzentration auf 2 µg/ml reduziert. 28 Tage nach Transfektion wurden einzelne Klone gepickt. Beim Picken von Klonen werden einzeln stehende Kolonien ausgewählt. Eine Kolonie wurde jeweils mit einer sterilen Spritze aufgenommen und dann zunächst in eine 96-well-Platte überführt. Bei Erreichen von Konfluenz (nach 6 Tagen) wurden die Klone auf eine 24-well-Platte, nach abermals 6 bis 7 Tagen auf eine 12- und 6-well-Platte überführt. Diese wurden in den folgenden Wochen in Zellkulturflaschen überführt und während dieser Zeit ohne Unterbrechung in Selektionsmedium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 – 3 Tage.

3.2.10.1 Abtötungskurve

Nach Transfektion wurden die Zellen in puromycinhaltiges Medium überführt. Die benötigte Konzentration des Antibiotikums wurde in einem *Kill Curve*-Experiment etabliert. Die Zellen wurden mit 2 ml Medium und einer Standardreihe steigender Antibiotikakonzentrationen behandelt. Das Medium wurde alle 48 h gewechselt und an den Tagen 1, 3 und 6 lichtmikroskopisch analysiert.

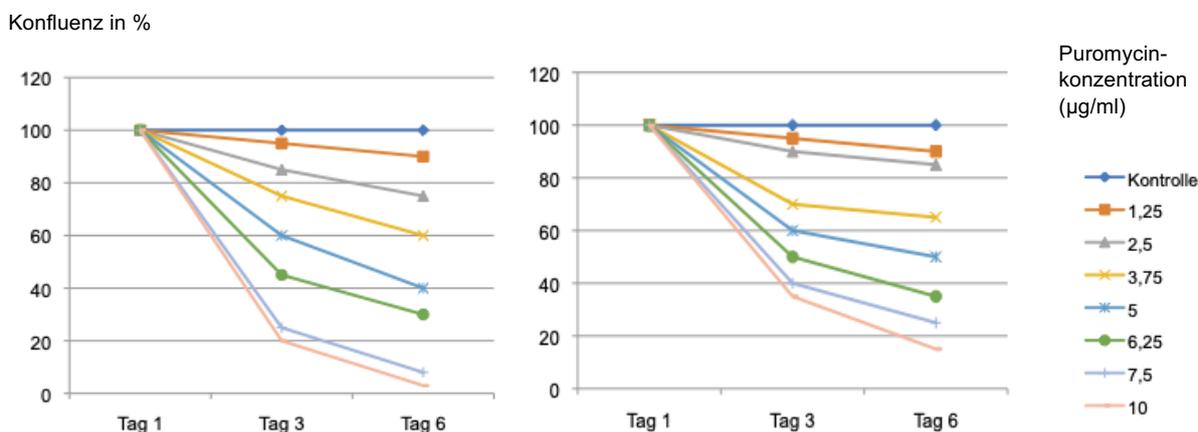


Abb. 6: Abtötungskurve mit GFP-transfizierten Caco-2-bbe-Zellen ohne Puromycinresistenz (links) und MICA*019-transfizierten Caco-2-bbe-Zellen mit Puromycinresistenz (rechts)

Selbst bei der höchsten Puromycinkonzentration von 10 µg/ml fanden sich in den puromycinresistenten Zellen vor allem randständig noch zahlreiche konfluente Zellkolonien, während bei den GFP-transfizierten Zellen ohne Puromycinresistenz keine lebenden Zellen mehr sichtbar waren. Es wurde etabliert, (1) transient transfizierte Zellen 24 h nach Transfektion in

puromycinhaltigem Medium (Konzentration 10 µg/ml) bis zur Fixierung nach 24, 36, 48, 72 oder 96 h zu inkubieren und (2) stabil transfizierte Zellen 48 Stunden nach Transfektion in puromycinhaltigem Medium mit einer Konzentration von 10 µg/ml zu inkubieren.

3.2.11 Immunfluoreszenzfärbungen

Die MICA/B-Zelllinien wurden nach dem folgenden Protokoll mit MICA und MICB-Antikörpern, Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker (ZO-1, E-Cadherin, Occludin), HA und intrazelluläre Marker (kleine Rab-GTPasen) gefärbt.

MICA*008, MICA*019, MICB, die entsprechenden HA-Konstrukte und die Kontrollen Leervektor (pCI-puro) und pCI-puro + GFP wurden zunächst zum Fixieren 15 min in 2 % PFA in PBS⁺ bei RT behandelt und durch Inkubation mit 0,5 % Triton X für 5 min bei RT permeabilisiert. Danach folgte die Blockierung mittels 6 % Ziegen-Serum und 1 % BSA in PBS⁺ für 60 min bei RT.

Der erste Antikörper m-α-MICA von R&D wurde 1:25 verdünnt, da entgegen der Anwendungshinweise des Herstellers eine höhere Dilution zu schlechteren Ergebnissen führte. Die optimalen Antikörperkonzentrationen wurden in Assays etabliert. Die jeweilig zur Anwendung kommenden Konzentrationen sind Tab. 10 und Tab. 11 zu entnehmen. Der Antikörper m-α-MICB von R&D und rb-α-MICA/B von Santa Cruz wurde zur Färbung von MICB Klonen verwendet. In Kontrollen (Caco-2-bbe-Zellen und mit dem Leervektor pCI-puro transfizierte Caco-2-bbe-Zellen) wurden Färbungen mit MICA- und MICB-Antikörpern durchgeführt. Es wurde mit Antikörpern gegen ZO-1, E-Cadherin, Occludin, und rab-Proteinen gegengefärbt. Zudem wurden die HA-Konstrukte mit HA- und MICA/B-Antikörpern gefärbt.

In sämtlichen Färbeschritten wurden die Filter jeweils mit 80 µl Antikörper-Lösung bedeckt. Die Filter wurden über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Alexa Ziege-α-rb488 und Ziege-α-m594) erfolgte über 60 min bei 37 °C. Im letzten Schritt wurden die Filter mit DAPI, das Zellkerne sichtbar macht, für 10 min bei RT im Dunkeln gefärbt und abschließend mit Pro-Tags-Mount-Flour in Deckgläsern eingedeckt. Sämtliche Waschschriffe erfolgten mit Blockierlösung mit Ziegen-Serum.

3.2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Sie beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenz, der spontanen Emission von Licht nach Anregung eines Moleküls durch elektromagnetische Strahlung. Bei der Anregung von fluoreszierenden Materialien mit Licht bestimmter Wellenlängen wird von den Fluoreszenzstoffen Licht längerer Wellenlänge abgestrahlt. Bei der Immunfluoreszenz werden Antigene von Antikörpern, die

fluoreszierende Eigenschaften aufweisen, gebunden und können somit in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Im Zuge der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen im ersten Schritt mit einem Antikörper behandelt, der an ein spezifisches Protein der Zelle bindet. Anschließend werden die Zellen mit einem zweiten Antikörper, der an den ersten Antikörper bindet, inkubiert. Der zweite Antikörper ist an ein Fluorochrom gebunden und kann mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden.

3.2.13 Konfokale Mikroskopie

Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird das ganze Präparat von einer Lichtquelle beleuchtet; somit werden alle Bereiche des Präparats zur selben Zeit durch das Licht angeregt und die Fluoreszenz von einem Detektor aufgezeichnet. Dabei entsteht ein großer Anteil an unfokussiertem Hintergrund, der durch Streulicht entsteht. Da es zu einer Überlagerung von Licht verschiedener Ebenen kommt, ist eine fokussierte Einstellung einzelner Ebenen der Z-Achse nicht möglich. Dieses Problem wird in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) einerseits mittels einer Lochblende und andererseits mithilfe eines das Präparat abfahrenden Punktlasers gelöst. Die Bezeichnung *konfokal* impliziert *mit dem gleichen Fokus* und beschreibt den Sachverhalt, dass der Punkt in der Mitte der Lochblende und der beleuchtete Punkt des Präparats zur gleichen Zeit im Fokus sind. Ein Laser wird mittels beweglichem Spiegelsystem über das Objekt bewegt und beleuchtet somit Zeile für Zeile das Präparat. Die emittierte Fluoreszenz wird durch das Objektiv auf eine Lochblende fokussiert, ehe das Licht vom Detektor registriert wird; diese zusätzliche Blende vor dem Detektor blendet das Licht, welches ober- und unterhalb der Fokusebene entsteht, aus. Da auf diese Weise ausschließlich Licht aus der Fokusebene den Detektor erreicht, ermöglicht die konfokale Mikroskopie eine erhebliche Reduktion von Streulicht. Letztlich bedingt dies eine sehr genaue Auflösung auf der Z-Achse und somit die Möglichkeit der Darstellung optischer Schnitte und einer 3D-Rekonstruktion des Objektes.

Durch die Einstellung des Durchmessers der Lochblende kann die Tiefenschärfe und in diesem Sinne die Dicke des optischen Schnittes eingestellt werden. Je kleiner der Durchmesser, desto höher ist die Blockierung von Licht aus anderen Ebenen und desto schärfer wird das Bild. Allerdings vermindert sich gleichsinnig die Signalstärke bei Reduzierung der Blendenweite. Durch das Scannen des Präparates auf mehreren Ebenen können Z-Stacks erstellt werden, die mittels einer Software zu einem 3D-Bild prozessiert oder in einem 2D-Bild dargestellt werden können. Sämtliche Fluoreszenzfärbungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop LSM 780 von Carl Zeiss durchgeführt und mit dem Programm ZEN von Carl Zeiss bearbeitet. Die verwendeten Laser-Wellenlängen waren 488 nm, 594 nm, 647 nm sowie 405 nm.

3.2.14 Western Blot

Mittels der Western Blot-Methode wurden die transient MICA/B-exprimierenden Zelllinien auf die Expression von MICA und MICB sowie HA untersucht. Im Rahmen eines Western Blot-Experiments erfolgt eine gelelektrophoretische Auftrennung der einzelnen Proteinkomponenten nach deren Größe, an die sich ein Proteintransfer entlang eines elektrochemischen Gradienten auf eine PVDF-Membran anschließt. Anschließend können die Proteine mit Antikörpern nachgewiesen werden. Es wurden insbesondere auf die differentiellen Proteingrößen der verschiedenen Allele als auch auf die relative Proteinmenge der verschiedenen Klone im Sinne einer differentiellen Bewertung der Expressionsstärke geachtet.

Zellyse

Im ersten Schritt erfolgte die Proteinextraktion mittels Lyse der Zellen. Dafür wurden die Zellen mit PBS⁺ auf Eis gewaschen. Danach wurden sie mit 200 µl kaltem Gesamtlyse-Puffer behandelt. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der Schale gelöst, die Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, resuspendiert und mittels Vortexer rigoros geschüttelt. Die Zellsuspension wurde 30 min bei 4 °C gekühlt. Zuletzt wurde die Zellsuspension mit Ultraschall für je 15 s weiter lysiert und danach eingefroren.

Proteinquantifizierung

Im zweiten Schritt wurde eine Proteinquantifizierung zur Feststellung der Proteinkonzentration in den Lysaten durchgeführt. Diese erfolgte mittels Anwendung des Bicinchoninsäure-Tests (BCA-Test). Dieser wird zur quantitativen Proteinbestimmung verwendet und beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion mit BCA als Detektionssystem. Hierbei wird Cu²⁺ durch Peptidbrücken zu Cu⁺ reduziert; der Anteil an Cu²⁺, der reduziert wird, ist dabei proportional zu der Proteinmenge, die sich in der Lösung befindet. Cu⁺ bildet dann mit BCA einen Farbkomplex, der Licht der Wellenlänge 562 nm absorbiert; somit kann indirekt die Konzentration des Proteins in der Lösung bestimmt werden.

In Mikrotiterplatten wurden 10 µl der Proben mit BCA-Gebrauchslösung im Verhältnis 1:20 vermischt. Als Kontrollen dienten 10 µl Lysepuffer und eine Standardreihe mit je 0 mg, 0,2 mg, 0,8 mg bzw. 1,2 mg BSA/ml. Die Lösungen wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und danach auf RT gekühlt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Tecan Spectra die Absorption bei 562 nm gemessen und dann mit dem Absorptionsspektrum der Standardreihe verglichen.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-PAGE (*engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode, mit der extrahierte Proteine anhand ihrer Masse in unterschiedliche Fraktionen in einem Acrylamidgel aufgetrennt werden können. SDS weist eine starke negative Ladung auf und lagert sich den zu untersuchenden Proteinen an, die folgend ebenso eine negative Ladung aufweisen. Im Folgenden wird der Ablauf und die Herstellung der verschiedenen Gele beschrieben.

Herstellung des Trenngels

Höherprozentige Trenngele eignen sich zur Auftrennung kleiner Moleküle. Aufgrund der erwarteten Größe der MICA/B-Proteine wurde ein 10 % Acrylamid-Gel verwendet. Acrylamid, destilliertes Wasser und Tris wurden gemischt; anschließend wurden 200 µl SDS zugegeben und die Lösung mittels eines Rührfisches gemischt. 200 µl APS wurden hinzugefügt, zuletzt erfolgte die Zugabe von TEMED. Um ein Gel zu gießen, wurde die Lösung mit einer Pipette aufgenommen und zwischen zwei Plattengläser pipettiert. Die oberen 2 cm wurden mit Ethanol aufgefüllt. Die Plattengläser wurden 30 min bei RT stehen gelassen, bevor das Ethanol abgossen wurde.

Herstellung des Sammelgels und Proteinauftrennung

Das Sammelgel wurde mit einer Pipette aufgezogen und in die Kammer gefüllt. Ein Kamm wurde eingeführt. Das Gel polymerisierte für 30 min bei RT und wurde danach in die Kammer gestellt und diese mit 1000 ml Elektrophoresepuffer befüllt. Die Proben wurden vorbereitet (Probe, Lysepuffer, 5x Laemmli). Nach Entfernung des Kammes folgte die Spülung der Taschen mit Elektrophoresepuffer, die Gele wurden in die Elektrodenhalterung in der Elektrophoresekammer gesetzt. Der Elektrophoresepuffer wurde eingefüllt und den Proben der SDS-Marker beifügt, 5 min bei 95 °C erhitzt, 20 s zentrifugiert und anschließend 20 µl per Probe mit einer Hamilton-Spritze pipettiert. SDS, zu Deutsch Natrium-Dodecyl-Sulfat, ist ein anionisches Tensid, das die Eigenladung von Proteinen überdeckt und diese somit eine negative Ladung aufweisen. Dies hat zum einen eine gegenseitige Abstoßung zur Folge und führt zu einer Linearisierung der Proteine. Zum anderen wandern die Proteine durch die negative Ladung in dem Spannungsfeld zum Plus-Pol. Danach folgte die Elektrophorese mit einer Spannung von 100 V für 65 min.

Membrantransfer

Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Zunächst wurde die PVDF-Membran 5 min in Ethanol getränkt und in Transferpuffer inkubiert. Im nächsten Schritt wurden das Gel, die PVDF-Membran, zwei Schwämme und zwei Membranfilter (Whatman) 5 min in Transferpuffer inkubiert und wie folgt in einer Plastikklemmvorrichtung zusammengesetzt: Klares Panel der Plastikklemmvorrichtung, Schwamm, Membranfilter, PVDF-Membran, Gel, Membranfilter, Schwamm, schwarzes Panel der Plastikklemmvorrichtung. Dieses wurde mit einem Kühlakku und Rührfisch in die Elektrodenkammer eingesetzt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Auf einem Magnetrührer erfolgte der Transfer bei 110 V und konstantem Strom von 0,4 A über 60 min.

Immundetektion mit POD-konjugiertem Zweitantikörper

Zum aktuellen Zeitpunkt befanden sich die Proteine also auf der PVDF-Membran. Nun galt es, die gesuchten Proteine mittels Immundetektion zu identifizieren. Dazu wurde die Membran mit Methanol befeuchtet und in PBS/Polysorbat (Tween) gewaschen. Es folgte die zweistündige Blockierung der Membran mit 5 % BSA unter konstantem Schütteln. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht unter ständig leichter Schaukelbewegung auf einer Western Blot-Wippe (Taumelschüttler) bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert und vor Behandlung mit dem sekundären Antikörper in TBST zwei Mal gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte mit den Peroxidase-gekoppelten Antikörpern.

In je 20 ml Entwicklerlösung (20 ml TBST + 0,4 g Entwicklerpulver) wurden 6,5 µl sekundärer Antikörper gelöst. Die Membran wurde in 20 ml Antikörperlösung für 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST/Tween erfolgte die Inkubation der Membran für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung bei RT im Dunkeln (Lumi-Light Kit von Roche; 1 ml Lösung 1 und 1 ml Lösung 2 wurden pro Blot vermischt), um die Peroxidase-Aktivität darstellbar zu machen. Dazu wurde das Lumi-Light-Kit von Roche nach Angaben des Herstellers verwendet. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesogen und die Membran zwischen zwei Transparentfolien gelegt. Im letzten Schritt erfolgte die Detektion der Banden im Lumineszenz-Detektor LAS 1000. In Expositionszeiten zwischen 20 s und 5 min wurde hier das Licht, welches bei Spaltung des Lumi-Light-Substrats emittiert wird, detektiert und auf diese Weise das Bandenmuster abgelesen.

3.2.15 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie untersuchten wir das Verhältnis des intrazellulär und membranständig exprimierten MICA/-B-Proteinlevels. Dies war für die Fragestellung der Arbeit insbesondere von Interesse, um zelluläre und subzelluläre Expressionsmuster der verschiedenen MICA/-B-Allele zu untersuchen.

Die Durchflusszytometrie beschreibt ein Messverfahren zur Einzelzellanalyse, in dem die Zellen zunächst mit Fluoreszenzmarkern gefärbt und anschließend in hoher Geschwindigkeit einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Dabei wird das Streu- und Fluoreszenzlicht separat detektiert. Durch die differenzielle Lichtstreuung und das aufgrund des Immundetektionsverfahrens für ein Protein spezifische Fluoreszenzsignal können die Zellen auf der Basis der Streuungseigenschaften zum einen und anhand der Expression einzelner Oberflächenproteine zum anderen erkannt und sortiert werden. Dazu werden die Zellen vor der Durchflusszytometrie im Rahmen der Immundetektion gefärbt, d.h. entweder mit einem primär markierten spezifischen Antikörper inkubiert oder – wenn keine primäre Markierung vorhanden ist – indirekt mit einem primären und einem fluoreszierenden sekundären Antikörper behandelt. In dieser Arbeit wurden in der Durchflusszytometrie ausschließlich direkte Antikörpermarkierungen verwendet.

Caco-2-bbe-Zellen in 6-well-Platten wurden mit MICA*008, MICA*019, MICB, den entsprechenden HA-Konstrukten und dem Leervektor pCI-puro als Kontrolle transient transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, 1 ml IELs-Isolierungspuffer pro Well zugegeben und bei 37° C für 20 min inkubiert. Die Zellen, die sich nun abgelöst hatten, wurden anschließend in einem Mikroreaktionsgefäß mit einer Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert und danach zu je 500 µl in zwei Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Beide Lösungen wurden mit 350 xg bei 4 °C 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Z233MK, Hermle) und der Überstand verworfen. In Gefäß A wurden die Zellen lebend gefärbt, d.h. die Färbung fand ohne vorangehende Fixierung mittels PFA und Permeabilisierung mittels Saponin statt. In Gefäß B erfolgte eine Zellfixierung vor Inkubation mit dem Antikörper.

In Gefäß A wurden 50 µl Allophycocyanin-(APC)-MICA-Antikörper (MICA FAB1300A-025, 1:1000) hinzugegeben und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 350 xg, 4 °C für 10 min (Zentrifuge Z233MK, Hermle). Der Überstand wurde verworfen und 1 ml PBS⁻ zugegeben, bevor abermals eine Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen erfolgte. Der Überstand wurde verworfen und die Lösung in 200 µl PBS⁻ resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Zu Gefäß B wurden 200 µl 4 % PFA zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die Zentrifugation mit 1500 xg, bei 4 °C für 5 min (Zentrifuge Z233MK, Hermle). Danach wurde

– wie in jedem folgenden Schritt nach Zentrifugation – der Überstand verworfen, 1 ml PBA hinzugefügt und abermals zentrifugiert. 50 µl APC-MICA-Antikörper in 10 % Saponin wurden hinzugefügt, für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und unter denselben Bedingungen wie eben genannt zentrifugiert. Mittels Saponin werden fixierte Zellen permeabilisiert, sodass neben der oberflächlichen MICA-Expression auch die intrazelluläre Expression untersucht werden kann. 1 ml PBA wurden zugegeben, zentrifugiert und die Lösung im Anschluss mit 200 µl PBA resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer Calibur (Becton Dickinson) analysiert (Einstellung: forward scatter gating, FSC) und mittels des Programmes FlowJo ausgewertet.

3.2.16 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands

Ein als Barriere funktionierender Epithelzelllayer bildet einen stabil messbaren, elektrischen Widerstand aus, wenn die Epithelzellen am apikalen Teil ihrer lateralen Membran *Tight Junctions* (TJ) ausbilden, d.h. eine für das jeweilige Epithel spezifische Zusammensetzung an Transmembranproteinen, insbesondere Claudinen, Occludin und Tricellulin. Diese regulieren den parazellulären Fluss von Ionen. Um die elektrische Leitfähigkeit für kleine Ionen ausreichend stark zu reduzieren, damit der elektrische Widerstand, der der Kehrwert der elektrischen Leitfähigkeit ist, messbar ansteigt, muss ein Epithel-Monolayer nahezu komplett konfluent sein. Die Messung des TER ist einfach zu handhaben und ein aussagekräftiger Parameter bei der Bestimmung der Barrierefunktion des Epithels gegenüber Ionen. Der Effekt der Expression verschiedener MICA-Allele auf die epitheliale Barrierefunktion wurde mittels wiederholter Widerstandsmessungen (Widerstand in Ωcm^2) bestimmt. Hierbei wurden Messungen mit Zellen in 0,4 µm PCF-Filtern in 6-well-Platten (jeweils 3-4 Filter pro Konstrukt) durchgeführt. Die Zellen wurden 48 h zur Konfluenz gebracht und anschließend an den Tagen 1, 3 und 5 gemessen; die Messungen wurden im Rahmen von drei Experimenten wiederholt.

3.3 Statistik

Bei der Auswertung der TER-Ergebnisse wurde der Mittelwert (Median) der Widerstände der jeweiligen Konstrukte sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Die Signifikanz der Werte wurde mittels des Mann-Whitney U-Tests ermittelt, die statistische Analyse erfolgte mittels des Programmes GraphPad PRISM.

In der Durchflusszytometrie wurde die relative Häufigkeit des oberflächlich exprimierten MICA*008 *versus* des oberflächlich exprimierten MICA*019 berechnet.

Eine quantitative Darstellung der Farbintensitäten und -verteilung in der Immunfluoreszenzfärbung war nicht möglich, da zur Aufnahme der Bilder keine standardisierten, sondern optimierte Farbeinstellungen verwendet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Feststellung der Sequenz der MICA/-B-Konstrukte

Die folgenden Konstrukte wurden entsprechend des in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 geschilderten Vorgehens hergestellt und nach Transformation in *E. coli* und Midi-Präparation isoliert:

- | | |
|-----------------|-----------------|
| (1) MICA*008 | (4) HA-MICA*019 |
| (2) HA-MICA*008 | (5) MICB |
| (3) MICA*019 | (6) HA-MICB |

Die DNAs wurden durch die *BIH Medical Genomics Core Facility, Charité Campus Benjamin Franklin*, sequenziert. Die Sequenzen wurden im Folgenden mittels des SnapGene-Programmes zusammengefügt und mit den humanen MICA/-B-Sequenzen der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* verglichen. Diese erwiesen sich als übereinstimmend. Auszugsweise finden sich in Abb. 7 die Sequenzabschnitte dargestellt, in denen sich MICA*008 und MICA*019 unterscheiden.

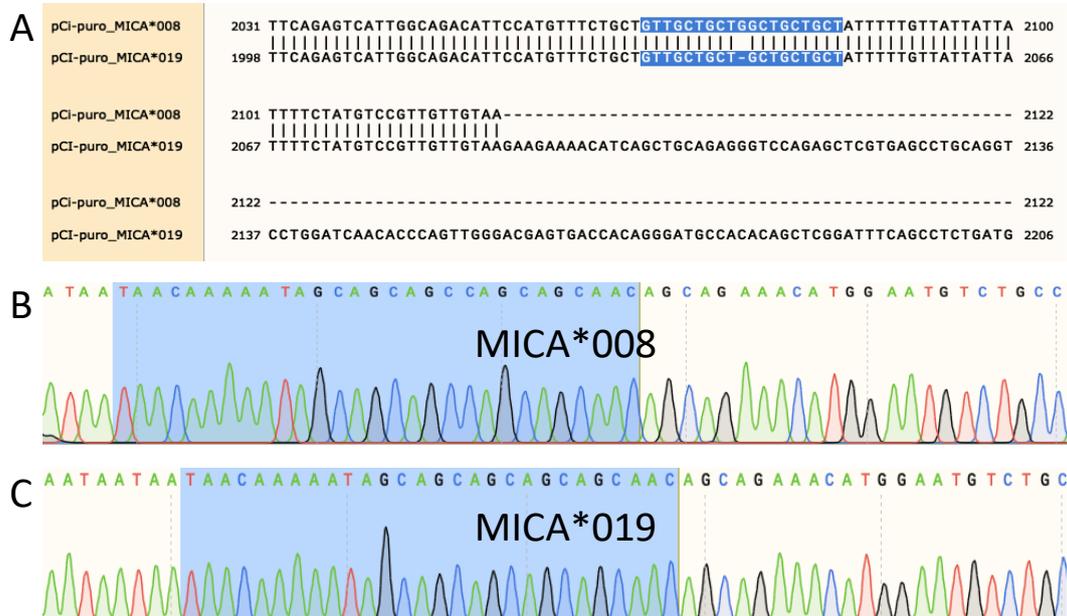


Abb. 7: Sequenzierung der Allele MICA*008 und MICA*019. Gezeigt wird der Sequenzabschnitt, in dem es zur Frameshift-Mutation durch eine Guanininsertion kommt. Bild A: Das Stopp-Codon, das zur Trunkierung des MICA*008-Proteins führt, ist zu sehen (NCBI Nucleotide BLAST). Bild B und C: Ergebnis der Sequenzierung der von uns verwendeten Konstrukte MICA*008 und MICA*019 mittels des Programmes SnapGene. Blau markiert ist die Region, in der es zur Frameshift-Mutation kommt.

Parallel wurden die Konstrukte zudem einem Kontroll-Restriktionsverdau unterzogen. Hierbei wurde das Restriktionsenzym PstI für sämtliche Konstrukte verwendet. Abb. 8 zeigt den erfolgreichen Verlauf dieser Restriktionsfragmentanalyse. In Abb. 5 sind die Vektorkarten von MICA*008 und MICA*019 mit den Schnittstellen des Restriktionsenzym PstI dargestellt.

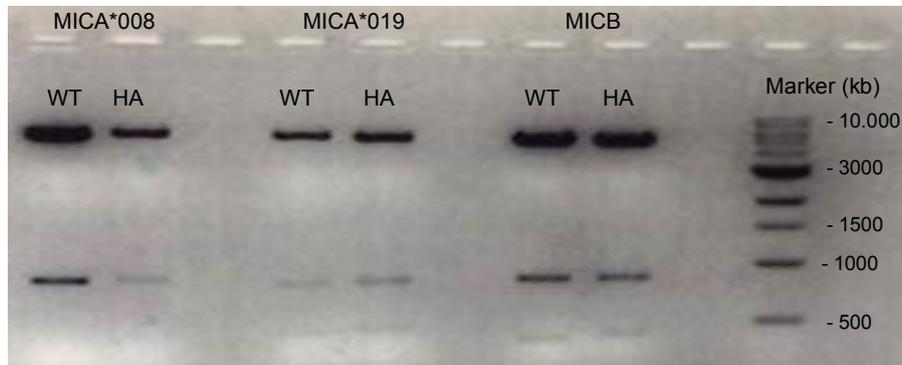


Abb. 8: Restriktionsfragmentanalyse der Plasmid-DNAs mit PstI in Agarosegel 1,5 %. Marker: 1 kb DNA-Ladder (New England Biolabs)

Wie zu erwarten, wiesen die Wildtyp- und HA-DNAs von MICA*008 eine Bande bei 5442 Basenpaare (bp) und eine weitere bei 850 auf. MICA*019 und HA-MICA*019 wiesen jeweils drei Banden, nämlich bei 5257 bp, bei 822 bp und bei 461 bp auf. MICB und HA-MICB zeigten jeweils drei Banden, die größte Bande bei 5178 bp, eine bei 856 bp und eine weitere bei 400 bp. Der geringe Größenunterschied zwischen HA-tragenden- und HA-freien-Konstrukten kann im Agarosegel der verwendeten Konzentration nicht aufgelöst werden.

4.2 Nachweis der MICA/B- und HA-Expression in Caco-2-bbe- und HEK-Zellen mittels Western Blot

4.2.1 MICA- und HA-Expression in HEK- versus Caco-2-bbe-Zellen

In dem in Abb. 9 dargestellten Western Blot wurden HEK-Zellen mit HA-MICA*008 transfiziert und zum Vergleich mit transfizierten Caco-2-bbe-Zellen dargestellt.

In Abb. 9 wurde mit einem HA-Antikörper detektiert. Dabei zeigte sich in den beiden HA-MICA*008-transfizierten Zelltypen HEK und Caco-2-bbe auf derselben Höhe (55 kDa) ein HA-Signal. HA-MICA*008-transfizierte Caco-2-bbe und HA-MICA*008-transfizierte HEK-Zellen zeigen somit das mit einem HA-Tag versehene MICA*008 auf derselben Höhe (55 kDa). Wie zu erwarten, ist bei der Färbung mit einem HA-Antikörper kein Signal bei Wildtyp-MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zelllysaten (Abb. 9, Spur 7) zu erkennen. Spur 4 zeigt HEK-

Zelllysate, welche mit einem HA-Vektor, d.h. ein mit mehreren HA-kodierenden Sequenzen versehener Vektor, als Kontrolle transfiziert wurden.

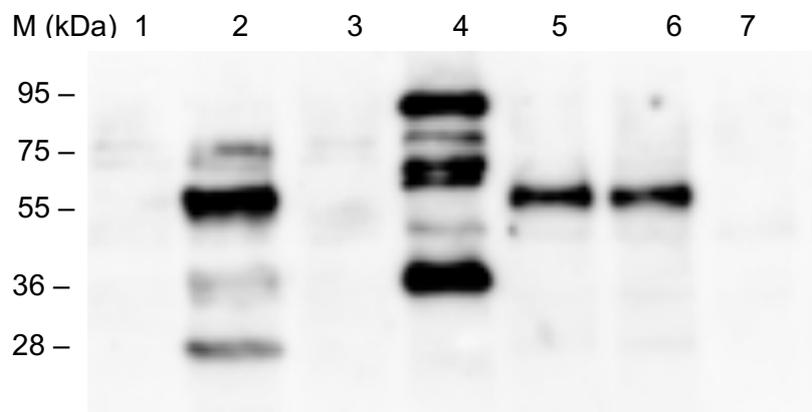


Abb. 9: Vergleich der MICA- und HA-Expression in Lysaten von MICA-/HA-exprimierenden und Wildtyp-Caco-2-bbe- und HEK-Zellen. Färbung mit einem HA-Antikörper. M = Marker in kDa. 1: Wildtyp-HEK-Zellen, 2: HA-MICA*008-HEK-Zellen, 3: Wildtyp-HEK-Zellen, 4: HA-Vektor-Probe-transfizierte HEK-Zellen, 5 und 6: HA-MICA*008-Caco-2-bbe-Zellen, 7: MICA*008-Caco-2-bbe-Zellen.

4.2.2 Vergleich der MICA/B- und HA-Expression in Caco-2-bbe-Zellen

Detektion mit MICA/B-Antikörper

In Abb. 10, Bild A, wurde mit einem MICA-Antikörper (R&D) gefärbt. HA-MICA*008 transfizierte Zellen zeigten eine diskrete Bande bei 48 kDa, MICA*008-Transfektate zeigten mehrere starke Banden: Bei 43 kDa, 48 kDa bis hin zu etwa 65 kDa. Die stärksten Banden finden sich bei 48 und 50 kDa.

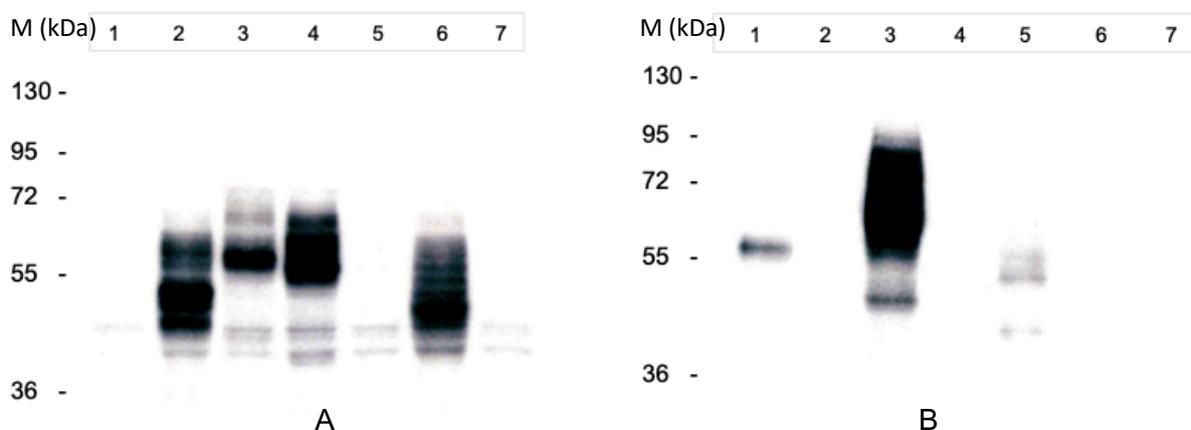


Abb. 10: Western Blot mit Lysaten von MICA/B- und HA-MICA/B-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. M = Marker in kDa. Folgende Spuren (1-7) kamen zur Darstellung: 1: HA-MICA*008, 2: MICA*008, 3: HA-MICA*019, 4: MICA*019, 5: HA-MICB, 6: MICB,

7: Leervektor. Bild A: Färbung mit MICA/B-Antikörper, Bild B: Färbung mit HA-Antikörper.

In HA-MICA*019-Transfektaten stellten sich in der Detektion mit einem MICA-Antikörper mehrere Banden zwischen etwa 55 und 75 kDa dar; die stärkste Bande lag bei 60 kDa sowie eine schwächere bei etwa 70 kDa dar. Interessant ist, dass die Färbung von HA-MICA*008 mit dem MICA-Antikörper quantitativ sehr gering ausfiel, diejenige von HA-MICA*019 allerdings ähnlich bzw. quantitativ nur geringfügig schwächer als diejenige der MICA*019-Transfektate war. Das Wildtyp-MICA*019 zeigt mehrere starke Banden zwischen 55 und 72 kDa. Die Banden – sowohl bei HA-MICA*019 als auch MICA*019 – wiesen die Expression des längeren MICA*019-Proteins nach.

HA-MICB zeigte eine Bande bei 43 kDa und bei 48 kDa, die allerdings jenen des Leervektors und somit der endogenen MICA/B-Expression von Caco-2-bbe-Zellen entsprechen könnten. MICB zeigte mehrere starke Banden, von 43 kDa bis hin zu etwa 70 kDa.

Sämtliche Transfektate zeigen analog zu mit dem Leervektor transfizierte Caco-2-bbe-Zellen je eine schwache Bande bei 43 sowie bei 48 kDa; die Ausnahme hiervon stellen HA-MICA*008-transfizierte Zellen dar; diese weisen bei 43 kDa keine Bande auf.

Detektion mit HA-Antikörper

Bild B aus Abb. 10 zeigt eine Färbung mit einem HA-Antikörper. Sämtliche HA-Transfektate zeigten eine Bande nach Detektion mit dem HA-Antikörper, während die Wildtyp-Konstrukte keine Bande zeigten. Bei Lysaten von HA-MICA*008-transfizierten Zellen zeigte sich eine Bande bei etwa 58 kDa. In Lysaten von HA-MICA*019-transfizierten Zellen zeigte sich ein sehr starkes Signal bei 72 kDa mit Ausstreckung von 58 - 90 kDa, sowie eine kleinere Bande bei etwa 48 kDa. HA-MICB-transfizierte Zelllysate zeigten mehrere Banden, je bei etwa 43, 52 und 55 kDa. Die Ursache für das Vorhandensein von Banden unterschiedlicher Größen ist die posttranslationale Modifikation durch Glykosylierung der MICA- und MICB-Proteine (1,90).

4.3 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelloberflächen-MICA versus intrazellulär exprimiertem MICA

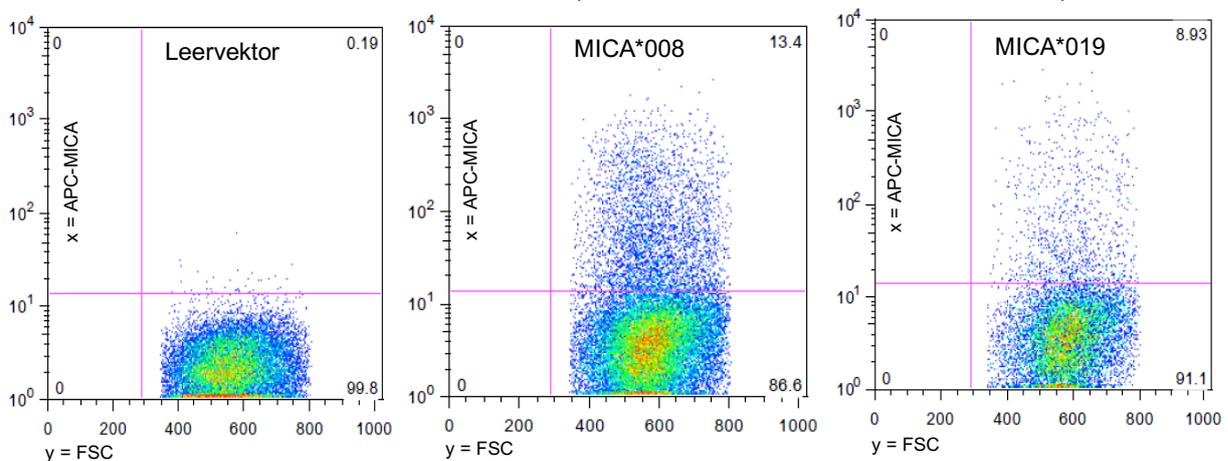
Caco-2-bbe-Zellen wurden transient mit MICA*008, HA-MICA*008, MICA*019 und HA-MICA*019 transfiziert und danach entsprechend des in Kapitel 3.2.15 erläuterten Vorgehens immungefärbt. In diesem Rahmen wurden die Zellen mittels Saponin nach PFA-Fixation

permeabilisiert. Es kommen durchflusszytometrisch sowohl intrazellulär-exprimiertes MICA als auch auf der Zelloberfläche exprimiertes MICA zur Darstellung.

4.3.1 Durchflusszytometrie von Saponin-permeabilisierten MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen nach MICA-Färbung

Aus der Durchflusszytometrie geht hervor, dass sich die MICA-Expression von MICA*008- und MICA*019-transfizierten Zellen deutlich von der MICA-Expression in der Leervektorkontrolle und damit von der endogenen Caco-2-bbe-MICA-Expression unterscheidet. Die Wildtypkonstrukte zeigten ein höheres Expressionslevel als die HA-Konstrukte (in Abb. 11 nicht gezeigt).

Bildreihe A: Permeabilisierte Caco-2-bbe-Zellen (intrazelluläres und oberflächliches MICA)



Bildreihe B: Nicht-permeabilisierte Caco-2-bbe-Zellen (oberflächliches MICA)

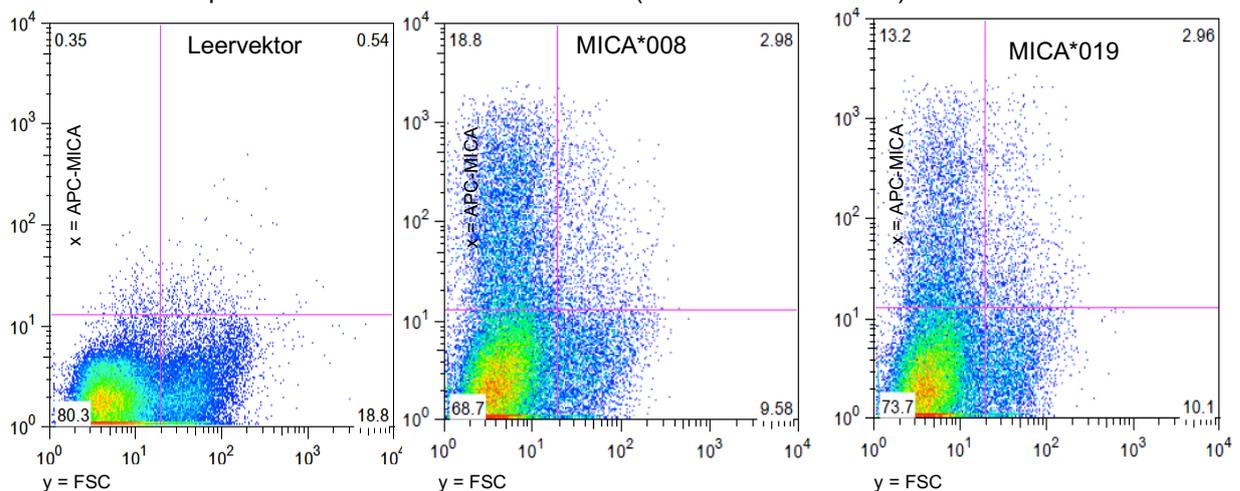


Abb. 11: Durchflusszytometrie mit Darstellung der intrazellulären versus oberflächlichen MICA-Expression mit permeabilisierten und nicht-permeabilisierten MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. x-Achse: APC-MICA. y-Achse: FSC (forward scatter). In der oberen Bildreihe (A) wird die durchflusszytometrische Darstellung von permeabilisierten Caco-2-bbe-Zellen gezeigt. Dabei kommt daher intrazellulär als auch

oberflächlich exprimiertes MICA zur Darstellung (MICA insgesamt). Die untere Bildreihe (B) zeigt die Durchflusszytometrie von nicht-permeabilisierten, MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen nach Oberflächenfärbung (MICA oberflächlich).

4.3.2 Durchflusszytometrie von MICA-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen nach MICA-Oberflächenfärbung

Zur Untersuchung der auf der Zelloberfläche exprimierten MICA-Moleküle wurden die Zellen vor der Durchflusszytometrie nicht permeabilisiert. Es zeigte sich ein endogenes niedriges MICA-Expressionslevel in den mit dem Leervektor transfizierten Caco-2-bbe-Zellen. MICA*008 exprimiert auf seiner Oberfläche geringfügig mehr MICA als MICA*019 (2.98 versus 2.96).

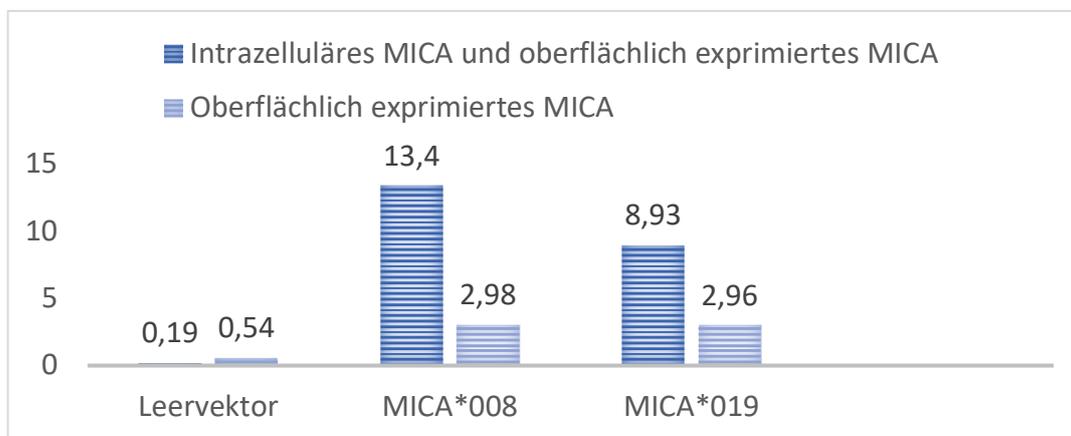


Abb. 12: Diagramm mit Darstellung des Verhältnisses von intrazellulär versus oberflächlich exprimiertem MICA*008 und MICA*019 in der Durchflusszytometrie (vgl. Abb. 11). Der endogene Expressionslevel von MICA in mit dem Leervektor pCI-puro transfizierten Caco-2-bbe-Zellen ist intrazellulär und oberflächlich sehr niedrig. Der Expressionslevel von MICA*008 ist mit 13,4 am höchsten. Der Anteil des oberflächlich exprimierten MICA*008 (2,98) ist im Vergleich zum Gesamt-MICA*008 (13,4) verhältnismäßig allerdings deutlich geringer als derjenige von MICA*019 (gesamt 8,93, oberflächlich 2,96).

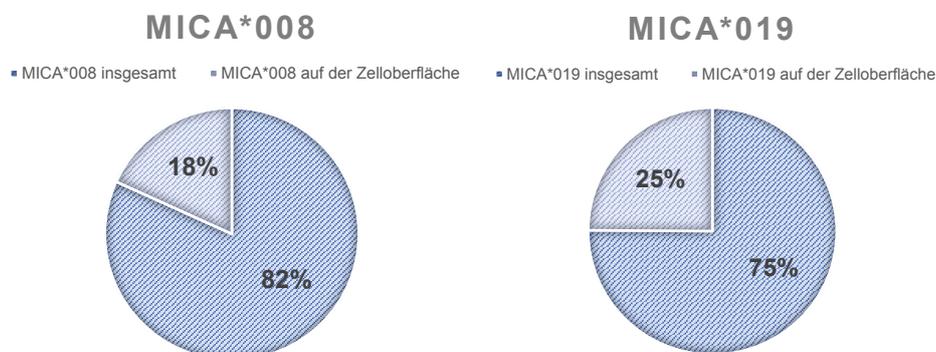


Abb. 13: Anteil des oberflächlich exprimierten MICA*008 und MICA*019 in der Durchflusszytometrie. MICA oberflächlich: hellblau schraffiert, MICA insgesamt: dunkelblau.

Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Expressionslevel von MICA insgesamt deutlich höher im MICA*008-Konstrukt war. Vergleicht man nämlich das Verhältnis der intrazellulären und oberflächlichen MICA-Expression von MICA*008 und MICA*019, so zeigt sich bei MICA*019 ein verhältnismäßig höherer Expressionslevel auf der Zelloberfläche (anteilig 18 % oberflächliches MICA-Protein bei MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen *versus* 25 % oberflächliches MICA-Protein bei MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen, siehe Abb. 13.).

4.4 Darstellung der subzellulären Lokalisation des MICA- und MICB-Proteins mittels konfokaler Mikroskopie

Transient MICA- oder MICB-exprimierende Caco-2-bbe-Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben mittels indirekter Immunfluoreszenz gefärbt und danach an einem Zeiss LSM 780 Konfokalmikroskop untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Konfokalmikroskopie präsentiert. Es lassen sich zusammenfassend folgende Beobachtungen machen:

1. MICA*008 findet sich im apikalen Zellsegment in Vesikeln direkt submembranös. Es konnte keine Kolokalisation mit dem apikalen membranassoziierten Protein ZO-1 beobachtet werden. In basolateralen Abschnitten findet sich MICA*008 intrazellulär sowie submembranös und zeigte in keiner Färbung Kolokalisationen mit basolateralen Membranproteinen. In vielen Färbungen konnten vesikelartige Strukturen gezeigt werden.
2. Dahingehend findet sich MICA*019 sowohl apikal als auch basolateral membranständig. Der größte Anteil von MICA*019 ist basolateral. Es finden sich Kolokalisationen zu ZO-1, E-Cadherin und Occludin. Geringe Anteile werden auch submembranös exprimiert.
3. MICB zeigt ein ähnliches Muster wie MICA*019.

4.4.1 Transiente Expression der MICA/-B-Proteine

Caco-2-bbe-Zellen wurden nach dem in Kapitel 3.2.9.2 beschriebenen Protokoll mittels Lipofektion transfiziert und wie in Kapitel 3.2.11 erläutert gefärbt.

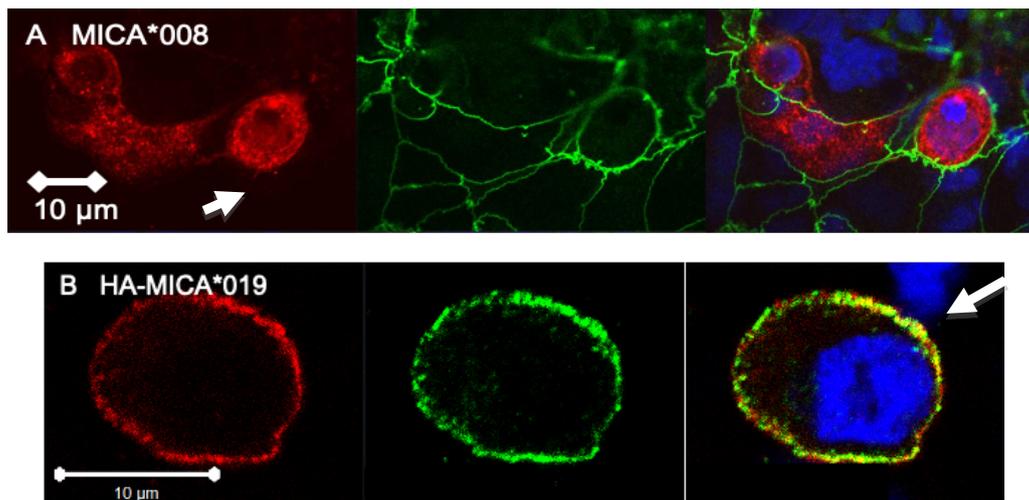


Abb. 14: Färbung von MICA, HA und ZO-1 in transient MICA*008- und HA-MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Bildreihe A: MICA*008 in Gegenfärbung zu ZO-1. MICA rot, ZO-1 grün, DAPI blau. Bildreihe B: Gegenfärbung von HA und MICA in HA-MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. MICA rot, HA grün, DAPI blau. MICA*008 befindet sich intrazellulär (siehe Bildreihe A, Pfeilspitze), während das HA-markierte MICA*019 membranständig ist (Bildreihe B, Pfeil)

Abb. 14 zeigt in Bildreihe A die intrazelluläre Verteilung des MICA*008-Proteins in einem apikalen Schnitt von MICA*008-exprimierenden Zellen. In den Aufnahmen zeigt sich ein körniges intrazelluläres Signal, das auf Vesikel deutet. Submembranös imponiert eine Anhäufung von vesikelartigen Strukturen (Abb. 14, Bildreihe A, Pfeilspitze). Eine membranöse Anordnung des Proteins ist nicht zu sehen, eine Kolo-kalisation mit dem apikalen ZO-1 findet sich nicht bzw. nur in sehr geringem Anteil.

Die subzelluläre Verteilung des MICA in MICA*019-exprimierenden Zellen unterscheidet sich deutlich. Während das MICA*008-Signal intrazellulär und nicht membranständig ist, findet sich das MICA*019-Signal überwiegend membranständig. Darüber hinaus zu erkennen ist die Kolo-kalisation von MICA und HA.

4.4.2 Stabile Expression der MICA/B-Proteine

In den Immunfluoreszenzfärbungen von den gemäß Kapitel 3.2.10 stabil transfizierten Caco-2-bbe-Zellen stellt sich die subzelluläre Verteilung analog zu der in transient transfizierten Zellen dar. Da sich kein Vorteil der HA-Markierung zeigte, wurde auf die Verwendung eines HA-Markers in weiterer Folge verzichtet. Zur Charakterisierung der subzellulären MICA-Kompartimentierung wurden Gegenfärbungen mit Membranproteinen und intrazellulären Proteinen durchgeführt.

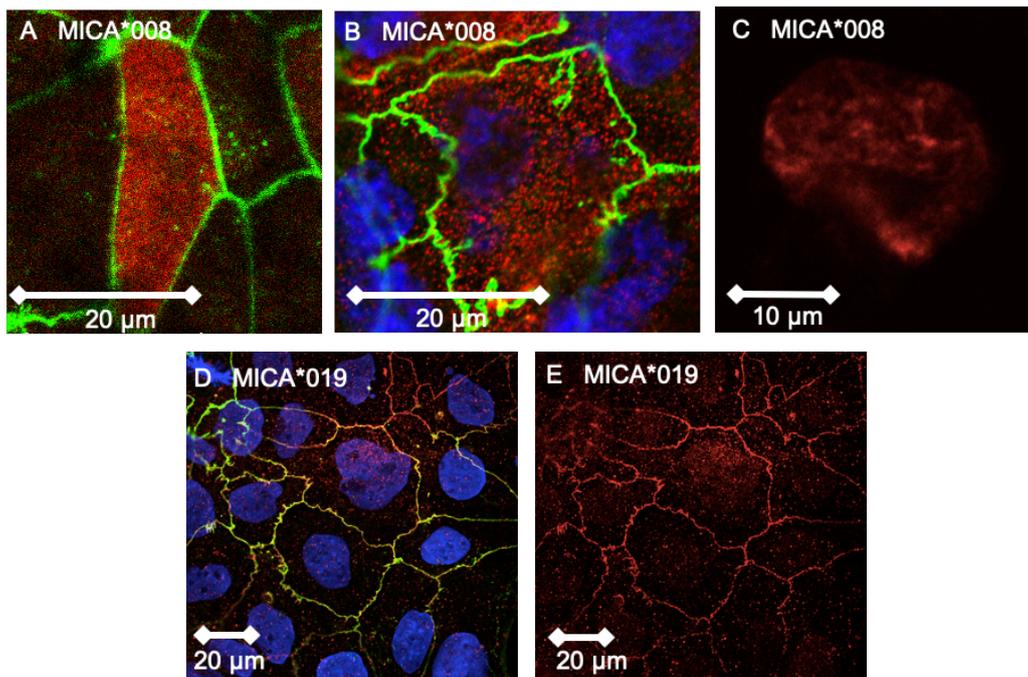


Abb. 15: Färbung von MICA und ZO-1 in stabil MICA*008- versus MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Bild A, B, C: MICA*008. Bild D, E: MICA*019. Bild E entspricht Bild D ohne den Kanal für ZO-1 und DAPI. MICA rot, ZO-1 grün, DAPI blau. MICA*008 ist intrazellulär und stellt sich teils vesikelartig dar. MICA*019 imponiert streng membranös.

In Abb. 15 wird die unterschiedliche Expression von MICA*008 und MICA*019 deutlich. Bild A, B und C zeigen die intrazelluläre Verteilung des MICA*008. Eine Assoziation zur Membran besteht nicht. In der Detailaufnahme in Bild B zeigen sich vesikelartige Formationen. Bild D und E zeigen die Expression von MICA*019, welches sich – anhand der Kolo-kalisation von MICA*019 und ZO-1 deutlich werdend – membranös befindet. Um zu bestätigen, dass die Fluoreszenz von ZO-1 und MICA nicht interferiert, wurde ein Lambda-Scan durchgeführt (Bild D und E). Mittels eines Lambda-Scans können die Spektraleigenschaften der jeweiligen Fluoreszenzstoffe bestimmt und eine Interferenz verschiedener Kanäle ausgeschlossen werden, indem nur Signale innerhalb eines benutzerdefinierten Wellenlängenbereichs aufgezeichnet werden.

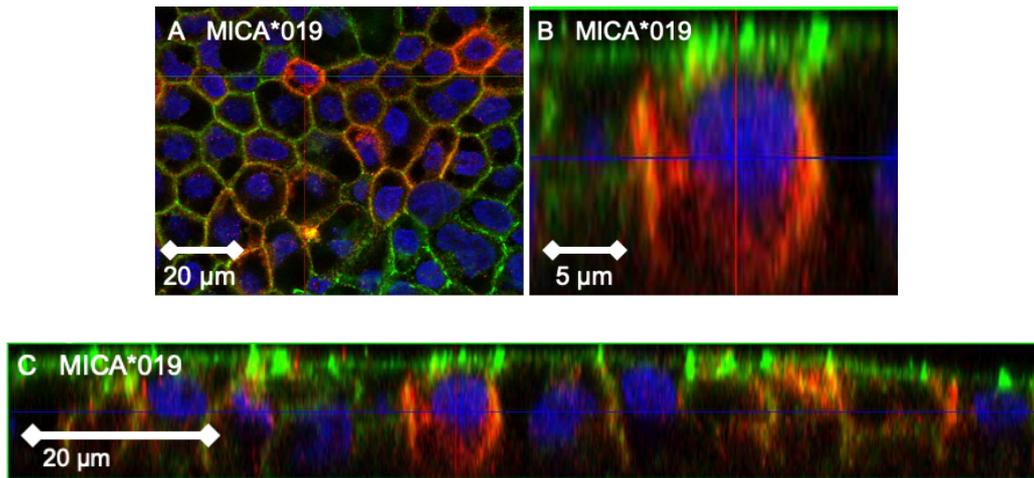


Abb. 16: MICA*019-exprimierende Zellen in Gegenfärbung zu ZO-1. Bild A: MICA*019-exprimierender Zelllayer. Bild B: Z-Stack, Detailaufnahme einer MICA*019-exprimierenden Zelle aus C. Bild C: Z-Stack MICA*019-exprimierender Zellen. MICA*019 findet in der basolateralen Zellmembran. MICA rot, ZO-1 grün, DAPI blau.

Abb. 16 zeigt einen Zelllayer mit MICA*019-positiven Zellen. Der Z-Stack (Bild B und C) zeigt, dass MICA*019 in der basolateralen Membran lokalisiert. Besonders im Vergleich mit Abb. 17, in der ein Z-Stack von MICA*008-exprimierenden Zellen dargestellt ist, wird die differenzielle Verteilung von MICA*008 und MICA*019 deutlich. In Abb. 17 erkennt man den Hauptanteil des MICA*008-Signals intrazellulär und submembranös der apikalen Zellmembran (siehe Abb. 17, Bild A und B, Pfeilspitzen). Basolateral zeigt sich kein membranöses MICA*008.

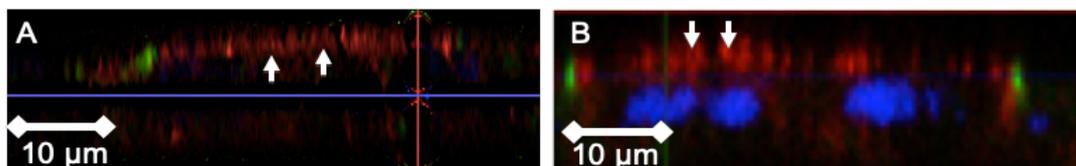


Abb. 17: Z-Stack eines MICA*008-exprimierenden Zelllayers. Bild A: Apikale submembranöse Expression des MICA*008-Proteins. Bild B: Apikal submembranöse und intrazelluläre Expression des MICA*008-Proteins. MICA rot, ZO-1 grün, DAPI blau.

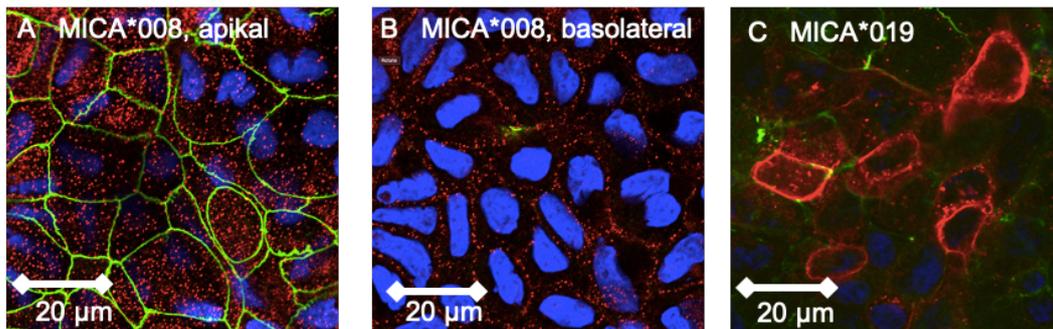


Abb. 18: Intrazelluläre und submembranöse MICA-Expression von MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen (Bild A, B) versus membranöse MICA-Expression von MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen (Bild C). Bild A: Apikal. Intrazelluläre Verteilung von MICA*008. Bild B: Basolateral. Submembranöses, vesikelartiges MICA*008. Bild C: Apikale und basolaterale Anteile eines MICA*019-exprimierenden Zelllayers mit membranständigem MICA*019. MICA rot, ZO-1 grün, DAPI blau.

In Abb. 18, Bild B, ist basolateral die vesikelartige Komponente von MICA*008 zu erkennen. Die Vesikel ordnen sich basolateral in Membrannähe an, ohne jedoch mit Membranproteinen zu koloalisieren. Apikal (Abb. 18, Bild A) ist MICA*008 im Zytosol verteilt. Zum Vergleich mit MICA*019 dient Bild C, Abb. 18: Der Zelllayer ist nicht gerade angeschnitten, weshalb sich sowohl apikale als auch basolaterale Anteile zeigen, erkennbar an der Stärke des ZO-1-Signals. Basolateral imponiert ein membranöses MICA-Signal mit kaum zytosolischer Verteilung.

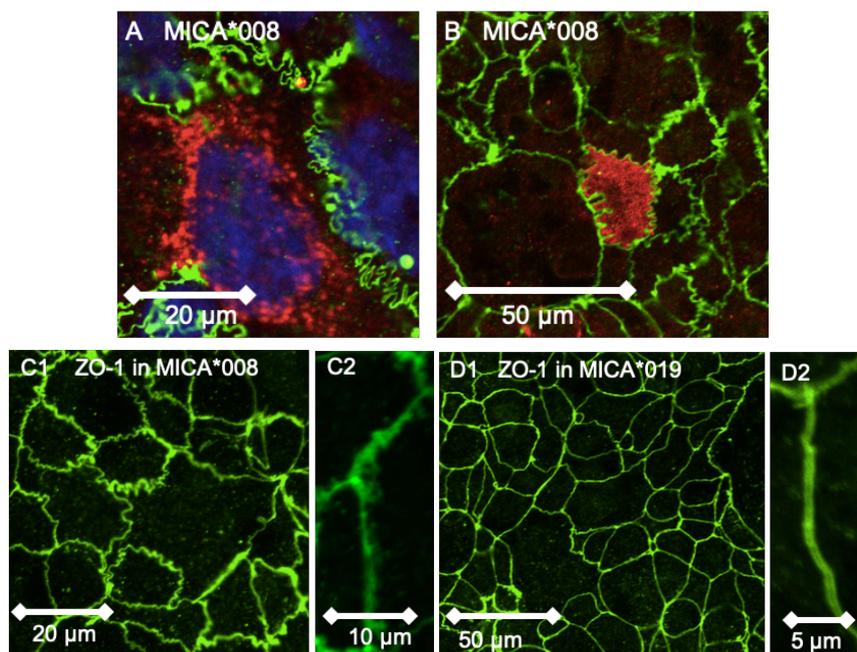


Abb. 19: Differenzielles Muster von ZO-1 in stabil MICA*008- versus MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Bild A, B: MICA*008. Bild C1, C2: MICA*008, starke membranöse Fältelung von ZO-1. Bild D1, D2: MICA*019, geradliniger ZO-1-Verlauf. MICA rot, ZO-1 grün, DAPI blau.

Abb. 19 zeigt zum einen die typische submembranös-vesikelartige und intrazelluläre Verteilung von MICA*008 (Bild A und B), zum anderen fällt in dieser Färbung ein vom MICA-Allel abhängiges differenzielles membranöses ZO-1-Muster auf. Dieses weist in MICA*008-exprimierenden Zellen eine starke Fältelung auf und verläuft nicht in geraden Linien wie in der entsprechenden Färbung mit MICA*019 (vgl. Abb. 19, ZO-1-Signal in MICA*008-exprimierenden Zellen in Bild C1 und C2 *versus* ZO-1-Signal in MICA*019-exprimierenden Zellen in Bild D1 und D2).

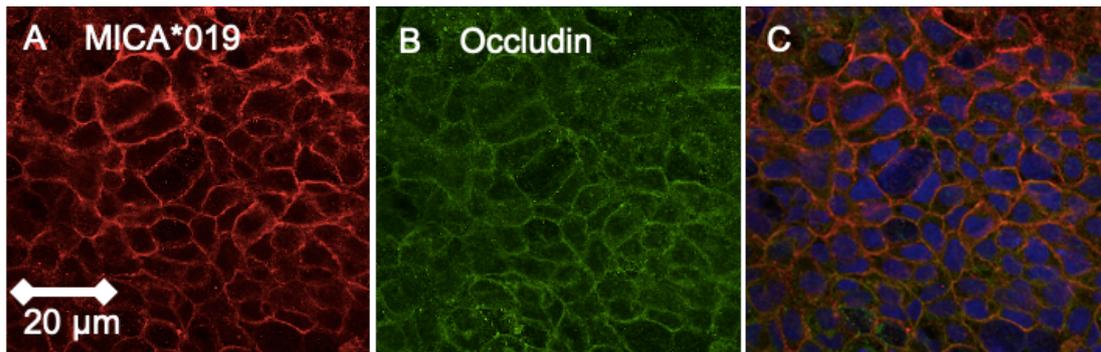


Abb. 20: MICA*019 in Gegenfärbung zu Occludin in stabil MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Bild A: Isolierte Darstellung von MICA. Bild B: Isolierte Darstellung von Occludin. Bild C: Gegenfärbung von MICA, Occludin und DAPI. MICA rot, Occludin grün, DAPI blau.

Abb. 20 zeigt eine Gegenfärbung von MICA*019 mit Occludin. Das MICA*019-Signal verläuft kolokalisierend mit Occludin in der Membran. Die Kolokalisation von MICA*019 mit Occludin, einem Membranprotein, bestätigt die Membranständigkeit von MICA*019.

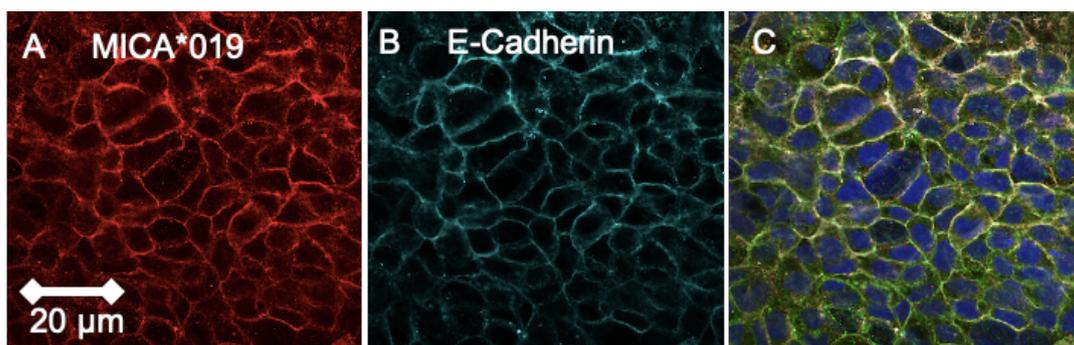


Abb. 21: MICA*019 in Gegenfärbung zu E-Cadherin und Occludin in stabil MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Die Aufnahme zeigt denselben Zelllayer wie Abb. 20 mit dem zusätzlichen Kanal für E-Cadherin (türkis). MICA*019 kolokalisiert mit dem basolateralen E-Cadherin. Bild A: Isolierte Darstellung von MICA. Bild B: Isolierte Darstellung von E-Cadherin. Bild C: MICA, E-Cadherin, Occludin, DAPI. MICA rot, DAPI blau, E-Cadherin türkis, Occludin grün.

Abb. 21 zeigt MICA*019-exprimierende Zellen in der Gegenfärbung von MICA*019 zu Occludin und E-Cadherin. MICA*019 und E-Cadherin, ein Membranprotein, welches sich vor allem in der lateralen Zellmembran befindet, zeigen deutliche Kollokalisierungen.

Kollokalisierungen mit Markern von Membran- und intrazellulären Proteinen sind in der folgenden Tabelle für MICA*008 und MICA*019 zusammengefasst.

Tab. 16: *Differenzielle Kollokalisierung von MICA*008 und MICA*019 mit Membran- und intrazellulären Proteinen. +++ = starke Kollokalisierung, ++ = mäßige Kollokalisierung, + = vereinzelte Kollokalisierung, - = keine Kollokalisierung.*

Antikörper	MICA*008	MICA*019
ZO-1	-	+++
E-Cadherin	-	+++
Occludin	-	++
rab8	-	-
rab11	-	+
EEA1	-	-
Phalloidin	-	-

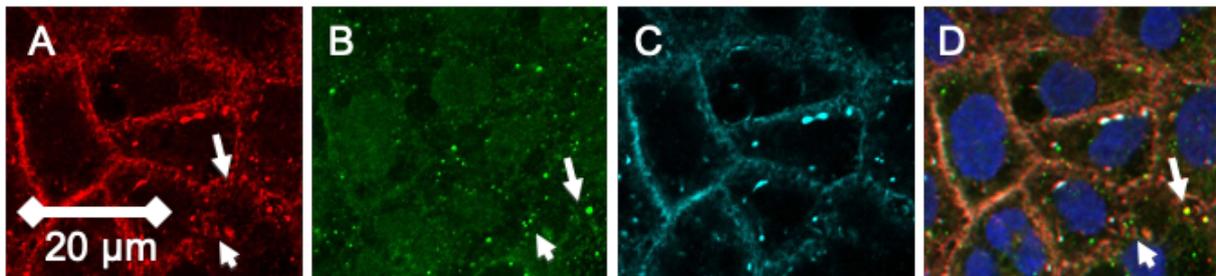


Abb. 22: *MICA*019 in Gegenfärbung zu rab11. Bild A: Isolierte Darstellung von MICA mit membranösem und submembranösem Signal. Bild B: rab11. Bild C: E-Cadherin. Bild D: MICA, rab11, E-Cadherin, DAPI. Es zeigen sich mehrere punktförmige kollokalisierende Bereiche von MICA*019 und rab11 (siehe Pfeile und Pfeilspitzen). MICA rot, rab11 grün, E-Cadherin türkis, DAPI blau.*

rab11, ein GTPase-Protein, das mit perinukleären Recycling-Endosomen assoziiert ist, reguliert die Exozytose von perinukleären Recycling-Vesikeln an der Plasmamembran. In der Gegenfärbung von MICA*008 zu rab11 ließen sich – im Gegensatz zu MICA*019 – keine kollokalisierende Bereiche finden. Abb. 22 zeigt MICA*019 in Gegenfärbung zu rab11. Hier konnten

einige kolokalisierende Punkte beobachtet werden. Zudem zeigen sich in Abb. 22 auch membranständige kolokalisierende Bereiche von MICA*019 mit E-Cadherin.

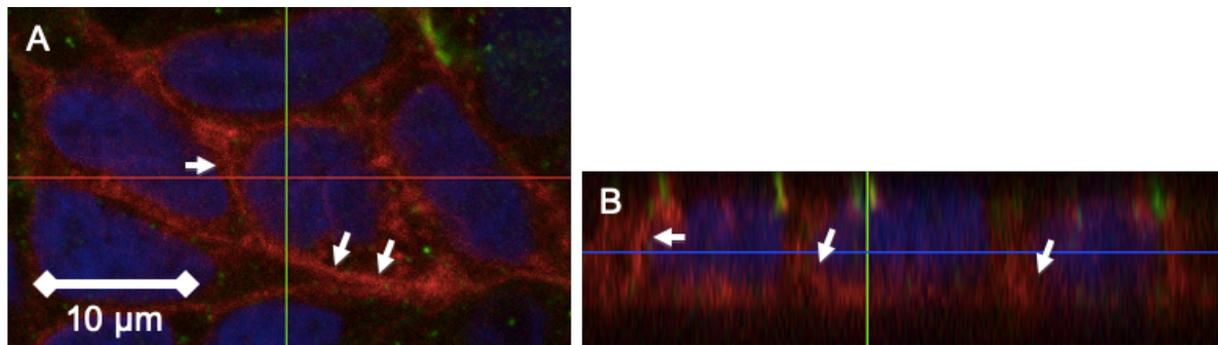


Abb. 23: MICB in Gegenfärbung zu ZO-1. A: Basolateraler Schnitt eines MICB-exprimierenden Caco-2-bbe-Zelllayers. B: Z-Stack eines MICB-exprimierenden Caco-2-bbe-Zelllayers. MICB rot, ZO-1 grün, DAPI blau. MICB findet sich basolateral hauptsächlich membranös (siehe Pfeilspitzen) und zeigt ein ähnliches Muster wie MICA*019.

MICB verteilt sich, wie in Abb. 23 gezeigt, ähnlich wie MICA*019. Apikal gibt es in der Membran keine Kolokalisation mit ZO-1. In den basolateralen Anteilen imponiert das MICB-Signal membranös und zeigt kolokalisierende Bereiche mit E-Cadherin.

4.5 Untersuchungen zur Epithelbarriere bei MICA/B-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen

Um die epitheliale Barrierefunktion der MIC-Protein-exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden stabil MICA*008- und MICA*019-exprimierende Zellen auf 0,4 µm PCF-Filtern ausgesät, für 48 h zur Konfluenz gebracht und dann mehrfach sequenziell hinsichtlich des transepithelialen Widerstands (TER) vermessen. Grundlage der in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse sind die Widerstandsmessungen aus drei unabhängigen TER-Experimenten (siehe Methodenkapitel 3.2.16).

Pro Konstrukt und Versuchsaufbau wurden stabil MICA*008- und MICA*019-exprimierende Caco-2-bbe-Zellen in je drei bis vier 0,4 µm PCF-Filtern in einem 6-well ausgesät und vermessen (für jeden angegebenen TER-Wert gilt n = 10 oder n = 11; einzelne Filter waren durch Verschmutzung nicht mehr verwertbar und wurden aus dem Experiment herausgenommen). Aus Abb. 24 abzulesen ist außerdem der Standardfehler des Mittelwertes. Die Messwerte der MICA*008-exprimierenden Zellen wiesen eine deutlich größere Streubreite als diejenigen der MICA*019-exprimierenden Zellen auf. In den Widerstandsmessungen fanden wir signifikante

Unterschiede zwischen den MICA*008- und den MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet.

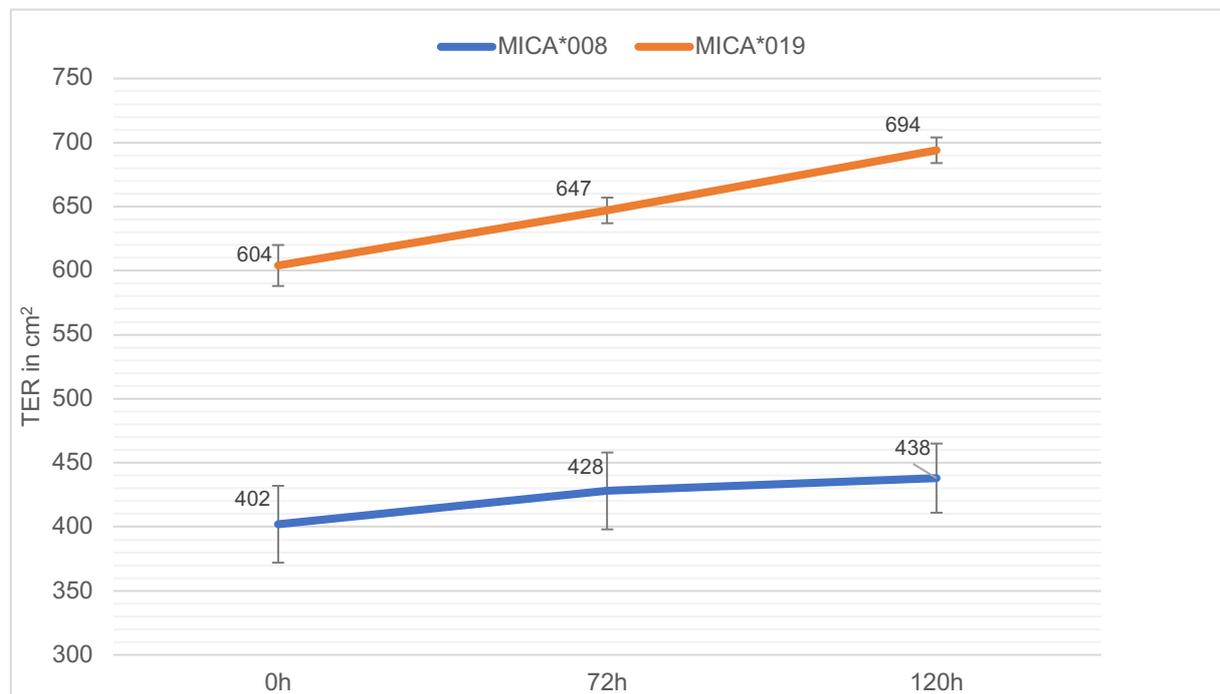


Abb. 24: Messung des transepithelialen Widerstands an MICA*008- und MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. x-Achse: Widerstand in Ωcm^2 . y-Achse: Zeitwerte in Stunden (h). Angegeben ist der Medianwert des TER des jeweiligen Konstruktes zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wird dargestellt. MICA*019-exprimierende Caco-2-bbe-Zellen haben einen höheren TER im Vergleich zu den MICA*008-exprimierenden Konstrukten.

Der TER der stabil MICA*019-exprimierenden Zellen war bei (0 h) $604 \pm 16 \Omega\text{cm}^2$ ($n = 11$) versus bei (0 h) $402 \pm 30 \Omega\text{cm}^2$ ($n = 11$) bei MICA*008-exprimierenden Zellen, $p < 0,001$ %. Bei (72 h) lag der TER der MICA*019-exprimierenden Zellen bei $647 \pm 10 \Omega\text{cm}^2$ ($n = 11$) und der TER der MICA*008-exprimierenden Zellen bei $428 \pm 30 \Omega\text{cm}^2$ ($n = 11$), $p < 0,001$ %. Bei (120 h) betrug der TER der MICA*019-exprimierenden Zellen $694 \pm 10 \Omega\text{cm}^2$ ($n = 10$) und der der MICA*008-exprimierenden Zellen $438 \pm 26 \Omega\text{cm}^2$ ($n = 10$), $p < 0,001$ %.

Als mögliche Ursache des niedrigeren TERs der stabil MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen könnte die fehlende Transmembrandomäne von MICA*008 diskutiert werden.

5 Diskussion

5.1 Differenzielle Expression von MICA*008 und MICA*019

5.1.1 Sortierung in die apikale und basolaterale Membran

Bislang gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der subzellulären Lokalisation und Kompartimentierung von trunkiertem MICA und MICA voller Länge. Die vorliegende Arbeit ist zu unserem Wissen die erste Studie, welche die subzelluläre Kompartimentierung an einer mit MICA*008- und MICA*019-transfizierten Darmepithelzellreihe (Caco-2-bbe-Zellen) untersucht hat. Der HA-Tag konnte im Zuge der Klonierung in die MICA/-B-Konstrukte eingeschleust werden. Die erfolgreiche Insertion des HA-Tags wurde sowohl mittels Immunfluoreszenzfärbungen, im Western Blot sowie in der Durchflusszytometrie bestätigt. Eine optimierte Darstellung der MICA/-B-Proteine war dadurch allerdings nicht möglich, weshalb auf eine Herstellung stabil HA-MICA/-B-exprimierender Zelllinien verzichtet wurde und zu den Lokalisationsstudien die Wildtyp-Varianten verwendet wurden.

Suemizu et al. beschrieben die Rekrutierung von MICA*008 in die apikale Membran in polarisierten Zellen anstelle der basolateralen Oberfläche und die Lokalisierung von MICA in Lipid Rafts (151). Ashiru et al. zeigten, dass MICA*008 als vollständiges Protein in Exosomen aus Zellen geschleust, während MICA*019 als trunkiertes Protein im Supernatant gefunden werden kann (161). Die beiden Proteine unterscheiden sich somit im Mechanismus ihrer Ausschleusung aus der Zelle (*engl. shedding*), beide im Supernatant löslichen Proteine führen allerdings zu einer Herabregulation von NKG2D auf der Zelloberfläche von NK-Zellen. MICA*008-Exosomen führen zu einer abgeschwächten zytotoxischen Funktion. Diese Mechanismen könnten weitere molekularbiologische Wege zur Immunevasion darstellen (161). Ashiru et al. konnten weiterhin demonstrieren, dass MICA*008 im endoplasmatischen Retikulum als lösliches Protein synthetisiert und mittels eines GPI-Ankers in die Membran eingebaut wird (159).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MICA*008, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Suemizu et al. und Ashiru et al., nicht in die basolaterale Membran sortiert wird. In Immunfluoreszenzfärbungen von transient MICA-transfizierten Nierenepithelzellen (MDCK-Zellen) konnten Suemizu et al. zeigen, dass die A5.1-Variante zur apikalen Oberfläche der Nierenepithelzellen transportiert wird, während die Moleküle voller Länge in die basolaterale Membran sortiert werden (151). In der vorliegenden Arbeit wurden Caco-2-bbe-Zellen, welche phänotypisch Dünndarmepithel ähneln, mit MICA transfiziert. Während Suemizu et al. beschreiben, dass MICA*008 in die apikale Zellmembran sortiert wird, konnten wir diese

Beobachtung in unseren Immunfluoreszenzfärbungen in der konfokalen Mikroskopie nicht bestätigen: Die MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen zeigten ein hauptsächlich intrazelluläres sowie ein apikal und basolateral submembranös imponierendes Signal. Apikal fand sich zwar eine Häufung von vesikelartig imponierendem MICA*008-Signal (vgl. Abb. 17), allerdings keine eindeutige Kollokalisierung mit apikalen Membranproteinen. Basolateral zeigte sich in keiner Färbung von MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen eine Kollokalisierung von MICA*008 mit einem Membranprotein.

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass MICA*008 im Gegensatz zu MICA voller Länge in Exosomen geschleust wird (161). Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt: MICA*008 weist eine vesikelartige intrazelluläre und submembranöse Komponente auf, was den Ergebnissen von Suemizu et al. und Ashiru et al. entspricht (151,159,161). Suemizu et al. führten die Färbungen allerdings an Nierenepithelzellen (MDCK-Zellen) durch. Die vorliegende Arbeit ist somit von besonderem Interesse, da die Beobachtung erstmals an humanen Darmepithelzellen, welche mit MICA*008 als Modell für trunkiertes MICA und MICA*019 als Modell für MICA voller Länge transfiziert wurden, gemacht werden konnten. Diese Zelllinie stellt somit ein realistischeres Modell dar.

Bezüglich der differentiellen subzellulären Expression von trunkiertem MICA und MICA voller Länge gibt es allerdings in der Literatur widersprüchliche Studien: Im Gegensatz zu Suemizu et al. konnten Hübner et al. in immunhistochemischen Untersuchungen keine Unterschiede in der Lokalisation verschiedener MICA-Proteine in Biopsien von Patienten mit aktiver Zöliakie in Abhängigkeit vom Genotyp finden und schlussfolgerten, dass ein Schutz von epithelialer Destruktion durch eine MICA-A5.1-Homozygotie unwahrscheinlich ist (91,151). Die vorliegende Arbeit unterstützt die Beobachtung von Suemizu et al. (151) und widerspricht den Ergebnissen der MICA-Lokalisationsstudie von Hübner et al. (91).

Mit der Western Blot-Methode konnte die Expression der MICA/B-Proteine nachgewiesen und quantitativ dargestellt werden. In transient MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen zeigten sich die stärksten Banden in der Größe von 43 bis 65 kDa, in MICA*019-exprimierenden Zellen zeigten sich Banden zwischen 55 und 72 kDa, was den bisher beschriebenen Molekülgrößen dieser Proteine in der Literatur entspricht (1,90,129). Auch die HA-markierten Transfektate bestätigten die differentiellen Molekülgrößen im Sinne der Expression des größeren MICA*019-Proteins. Im Speziellen bestätigte sich hierdurch das Vorliegen der trunkierten MICA*008-Variante in den Transfektaten. Die Bandengrößen erklären sich durch die unterschiedliche Glykosylierung der Proteine (129,169).

5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der MICA-Expression auf der Zelloberfläche

Mittels Durchflusszytometrie untersuchten Hüe et al. das Verhältnis von intrazellulärem und oberflächlichem MICA. Dabei wurde festgestellt, dass das MICA-Signal im Epithel von Kontrollen hauptsächlich intrazellulär verteilt war, in Zöliakiepatienten fand sich eine deutlich stärkere Expression von MICA an der Zelloberfläche. Hüe et al. schlussfolgerten, dass MICA in aktiver Zöliakie auf die Zelloberfläche transportiert wird und dies mit der Schwere der Zöliakie korreliert (91).

In der vorliegenden Arbeit zeigten MICA*019-exprimierende Caco-2-bbe-Zellen ein verhältnismäßig höheres Expressionslevel auf der Zelloberfläche gegenüber MICA*008-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen. Dies unterstützt die Beobachtung von Hüe et al. (91) und die Hypothese, dass die Interaktion von MICA*008-exprimierendem Epithel mit dem NKG2D-Rezeptor auf IELs zu einer Destruktion des Epithels führen und somit eine Auswirkung auf den Krankheitsverlauf der Zöliakie haben kann.

5.1.3 Kolokalisation mit Membranproteinen

Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, zeigen MICA*008 und MICA*019 ein differenzielles subzelluläres Expressionsmuster und Kolokalisationen mit verschiedenen Membranproteinen. Eine Übersicht ist in Tab. 16 gegeben.

ZO-1, ein peripheres Membranprotein, das überwiegend in der apikalen Membran zu finden ist, zeigte kolokalisierende Anteile mit MICA*019. Dies legt nahe, dass MICA*019 auch in der apikalen Membran zu finden ist und nicht nur basolateral lokalisiert. E-Cadherin, ein basolaterales Transmembranprotein zeigte in der Gegenfärbung mit MICA*019 eine eindeutige Kolokalisation, was die Sortierung von MICA*019 in die basolaterale Membran bestätigt. MICA*008 hingegen zeigte keine Kolokalisation mit E-Cadherin.

Occludin spielt eine Rolle in der Stabilität und Barrierefunktion von Tight Junctions und lokalisiert in der basolateralen Zellmembran. Gleichzeitige Färbungen mit Occludin zeigten nur mit MICA*019 eine eindeutige Kolokalisation, in der Gegenfärbung mit MICA*008 ließ sich keine Kolokalisation darstellen.

Die Kolokalisation von MICA*019 mit den basolateralen Membranproteinen E-Cadherin und Occludin entspricht den Beobachtungen von Ashiru et al. und Suemizu et al. (151,159), ebenso wie die Beobachtung, dass MICA*008 nicht basolateral lokalisiert. Neu ist allerdings die Beobachtung, dass MICA*019 auch apikal zu lokalisieren scheint, wie die Kolokalisation mit dem Membranprotein ZO-1 nahelegt.

Zudem konnten wir die in der Literatur beschriebene Sortierung von MICA*008 in die apikale Zellmembran nicht belegen; so fand sich zwar – vor allem sichtbar in Z-Stack-Aufnahmen (vgl. Abb. 17) – in apikalen Zellsegmenten ein gehäuftes, meist vesikelartig imponierendes MICA*008-Signal, eine eindeutige Kolo-kalisation mit ZO-1, die auf eine transmembranöse Lokalisation des MICA*008-Proteins schließen ließe, fand sich allerdings nicht.

Das Protein rab8 befindet sich in der Golgi-Region, in Vesikeln und in der basolateralen Membran (170). In der Färbung mit rab8 zeigten weder MICA*008 noch MICA*019 Kolo-kalisationen.

Rab11 ist ein Protein, welches mit perinukleären Recycling-Endosomen assoziiert ist. In der Färbung mit rab11 zeigte MICA*008 keine eindeutigen Kolo-kalisationen. MICA*019 zeigte mit rab11 einzelne kolo-kalisierende Bereiche.

Zusammenfassend legen die beschriebenen Befunde nahe, dass MICA*019 tatsächlich, wie von anderen Arbeitsgruppen bereits beschrieben wurde, im Gegensatz zu MICA*008 in der basolateralen Membran zu finden ist, wo die Interaktion mit IELs stattfinden kann.

5.1.4 Vergleich mit Befunden der Dissertation von Kamel 2014

Wie in Kapitel 1.4 dargelegt, konnte in der Studie von Kamel die differenzielle subzelluläre Lokalisation von MICA/-B und im Besonderen der Allele MICA*008 und MICA*019 nicht geklärt werden (1). Mittels Transfektion von Caco-2-bbe-Zellen konnte nun in der vorliegenden Arbeit die differenzielle Kompartimentierung der verschiedenen Allele in einem humanen IEC-Modell erfolgreich charakterisiert werden. Zudem konnten Zelllinien generiert werden, welche MICA*008, MICA*019 und MICB exprimieren.

Während Kamel in Immunfluoreszenzfärbungen von Caco-2-Zellen, welche endogen MICA/-B exprimierten, keine eindeutige Sortierung in ein zelluläres Kompartiment beobachten konnte (1), wurde in der vorliegenden Arbeit ein für die jeweiligen Allele spezifisches Muster beschrieben. Kamel beschreibt in ihrer Arbeit ein in der Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen apikales als auch basolaterales MICA/-B-Signal. MICA/-B imponierte vorwiegend submembranös und etwas basaler als das apikale Membranprotein ZO-1. Die von Kamel generierten Ergebnisse in der immunhistochemischen Färbung von MICA an Biopsien von Zöliakiepatienten bestätigen allerdings die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen: Es zeigte sich ein vom Genotyp abhängiges apikales bzw. basolaterales Signal; in Patientenbiopsien mit dem trunkierten MICA-A5.1-Allel beschreibt Kamel ein überwiegend apikales, submembranöses Signal (1). Dies unterstützt die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit sowie der Studie von Suemizu et al. (151) und widerspricht den Ergebnissen von Hübner et al. (91).

5.2 Polymorphismus von MICA und Assoziation mit Autoimmunerkrankungen

Mit über 60 verschiedenen bekannten Allelen weist MICA einen bemerkenswert hohen Polymorphismus auf (140–145). Die Bedeutung dieser genetischen Variabilität ist allerdings nicht geklärt. MICA*008 ist das häufigste Allel der MICA-Familie mit einer Prävalenz zwischen 20 und 40 % (152,154,161,171). Während sich die extrazelluläre Domäne (EZD) kaum von der EZD anderer Allele unterscheidet, weisen die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne große Unterschiede auf, die sich funktionell auf das Expressionsmuster auf subzellulärem Niveau auswirken (siehe Abb. 3 und Abb. 4).

Der Polymorphismus und die Redundanz an NKG2D-Liganden könnten einen evolutionären Selektionsdruck des Immunsystems in der Auseinandersetzung mit Viruserkrankungen reflektieren. Die trunkierte MICA-Variante MICA*008 könnte in diesem Sinne eine Adaptation zur Verteidigung gegen Viruserkrankungen wie HCMV sein (172,173). Viren können der Immunüberwachung entkommen, indem sie MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche herunterregulieren (157,172). HCMV-infizierte Zellen sind immun gegenüber der Lyse durch NK-Zellen, indem deren zytotoxische Aktivität durch hochexprimierte Evasionsmoleküle vermindert wird. Diese inhibieren aktivierende Liganden; eines dieser Proteine ist UL42, ein MHC-Klasse-I-verwandtes Glykoprotein. UL42 reguliert die Oberflächenexpression von MICA herunter – anstatt zur Oberfläche transportiert zu werden, lokalisiert MICA im cis-Golgi-Apparat. Ashiru et al. konnten zeigen, dass UL42 die Expression von MICA voller Länge (MICA*019) dementsprechend herunterreguliert, auf die Oberflächenexpression von MICA*008 allerdings keinen Einfluss hat (172).

Mehrere Studien konnten eine Verbindung zwischen dem MICA-Polymorphismus und dem klinischen Verlauf oder der Suszeptibilität zu verschiedenen Immunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I (174–176), Morbus Addison (177,178) und Psoriasis (179) zeigen.

5.3 Auswirkung des MICA-Genotyps auf die Klinik der Zöliakie

Da zytotoxische T-Zellen (IELs) nur basolateral mittels ihres NKG2D-Rezeptors an auf Zelloberflächen exprimiertes MICA binden können, hätte eine vermehrt intrazelluläre oder apikale Verteilung von MICA, wie dies in der vorliegenden Arbeit bei dem Allel MICA*008 gezeigt wurde, weitreichende Konsequenzen für die MICA/NKG2D-medierte Lyse von Darmepithelzellen. Diese würde aufgrund der reduzierten Interaktion deutlich vermindert sein. Eine dahingehend veränderte Interaktion zwischen dem MICA-Protein und dem NKG2D-Rezeptor könnte sich auf den klinischen Verlauf der Zöliakie auswirken. Eine verminderte zelluläre Lyse des

Darmepithels könnte sich klinisch einerseits durch eine weniger stark ausgeprägte gastrointestinale Symptomatik, andererseits durch eine in der Endoskopie geringer ausgeprägte Zottenatrophie zeigen.

In Tab. 17 sind Studien aufgeführt, welche zum einen die Korrelation des trunkierten MICA-Allels MICA-A5.1 mit dem allgemeinen Vorkommen einer Zöliakie und zum anderen im Besonderen mit dem Auftreten eines symptomatischen klinischen Verlaufes ohne gastrointestinale Symptome untersuchen.

Tab. 17: Korrelation von MICA-A5.1 mit der Prävalenz von Zöliakie und dem Auftreten eines symptomatischen Verlaufes und Assoziation zu einem Kopplungsungleichgewicht. LD = linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)

Studie	Positive Korrelation von MICA-A5.1 und dem Vorkommen von Zöliakie	Positive Korrelation von MICA-A5.1 und einem symptomatischen Verlauf der Zöliakie
Lopez-Vazquez et al. (163)	ja	ja
Lopez-Vazquez et al. (180)	nein	ja
Tinto et al. (181)	ja	ja
Kamel (1)	ja	nein
Hüe et al. (91)	nein	keine Daten
Rueda et al. (182)	ja	nein
Bilbao et al. (183)	LD	keine Daten
Fernandez et al. (184)	LD	keine Daten
Woolley et al. (185)	LD	keine Daten
Louka et al. (186)	LD	keine Daten

Wie in Tab. 17 ersichtlich, existiert eine widersprüchliche Studienlage zum Zusammenhang des MICA-A5.1-Allels und dem Auftreten bzw. dem klinischen Verlauf der Zöliakie: Lopez-Vazquez et al. demonstrierten in einer Studie mit 38 Zöliakiepatienten, dass die Prävalenz von MICA-A5.1 in Patienten mit symptomatischer Zöliakie häufiger ist (163). In einer Studie in der Sahrauis-Population, einer maurischen Ethnie in der Westsahara mit einer hohen Prävalenz

an Zöliakie aufgrund des häufigen Vorkommens des humanen Leukozytenantigens DQ2 (HLA-DQ2), wurde von der Arbeitsgruppe um Lopez-Vazquez et al. abermals gezeigt, dass das trunkierte MICA-A5.1 mit einem atypischen (symptomatischen) Verlauf der Krankheit assoziiert ist. Die Studie wies allerdings darauf hin, dass ein Vorkommen des MICA-A5.1-Allels nicht mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem Erkranken an Zöliakie selbst einhergeht, sondern bei Vorliegen einer Zöliakie den Krankheitsverlauf im Sinne eines symptomatischen Verlaufes modifiziert (180).

Tinto et al. beobachteten ebenfalls ein häufigeres Vorkommen des MICA-A5.1-Allels in Zöliakiepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen; darüber hinaus demonstrierte die Arbeitsgruppe, dass das Vorliegen eines MICA-A5.1/A5.1-homozygoten Genotyps zum Auftreten einer symptomatischen Zöliakie prädisponiert. Diese Patienten zeigten außerdem niedrigere Level an Anti-Transglutaminase-Antikörpern (181).

Während Bilbao et al., Fernandez et al. und Woolley et al. zwar ebenfalls ein häufigeres Auftreten von Zöliakie in MICA-A5.1-Trägern fanden, führten diese Arbeitsgruppen dies allerdings auf ein Kopplungsungleichgewicht (*engl. linkage disequilibrium, LD*) von MICA-A5.1 und anderen etablierten Suszeptibilitätsgenen zurück und lehnen die Hypothese, der MICA-A5.1-Genotyp könnte ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Zöliakie sein, ab. So fanden beispielsweise Woolley et al. mittels HLA-stratifizierten Assoziationsanalysen, dass das MICA-A5.1-Allel im Rahmen von Kopplungsungleichgewichten häufiger mit dem HLA-Typ DQA1*05 und DQB1*02 einhergeht, welche bekannte Suszeptibilitätsgene für Zöliakie sind (185). Daher schlussfolgerten sie, dass das häufigere Vorkommen von Zöliakie beim Vorliegen eines MICA-A5.1-Genotyps tatsächlich aufgrund der Häufung des HLA-DQA1*05 bzw. DQB1*02-Genotyps zu erklären ist. Rueda et al. fanden dahingegen ein erhöhtes Vorkommen des MICA-A5.1-Allels bei Zöliakiepatienten unabhängig von den genannten anderen Suszeptibilitätsgenen (182–184). Tinto et al. fanden eine Assoziation mit einem symptomatischen Krankheitsverlauf (181). Kamel fand in ihrer Dissertation ein häufigeres Vorliegen des MICA-A5.1-Allels in Patienten mit Zöliakie im Vergleich zu gesunden Kontrollindividuen, konnte die beschriebene Häufung mit einem attenuierten Krankheitsverlauf jedoch nicht bestätigen (1).

5.4 Vergleich von MICA-Lokalisationsstudien in der Literatur mit den Ergebnissen dieser Arbeit

Während Suemizu et al. in transfizierten epithelialen Nierenzellen eine Sortierung des trunkierten MICA-Moleküls in die apikale Membran und eine basolaterale Sortierung des MICA-Proteins voller Länge beschreiben, konnten diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (91,151). Hüe et al. führten immunhistochemische Färbungen an

Biopsien von Patienten mit aktiver Zöliakie mit dem MICA-A5.1-Allel durch, in denen sie keine vom Genotyp abhängigen Unterschiede in der subzellulären Lokalisation, wie von der Arbeit um Suemizu et al. beschrieben, feststellen konnten (91). Darüber hinaus konnten Hüe et al. nach Genotypisierung von 107 Zöliakiepatienten und 90 gesunden Kontrollen weder ein vermehrtes Auftreten von Zöliakie noch einen Zusammenhang mit einem symptomatischen Krankheitsverlauf mit dem MICA-A5.1-Allel beobachten (91); insofern lehnt die Arbeitsgruppe sowohl die Hypothese ab, dass (i) ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines modifizierten Krankheitsverlaufes und dem trunkierten MICA-A5.1-Allel besteht und (ii) ein solcher Zusammenhang pathophysiologisch durch eine differenzielle subzelluläre Lokalisation von MICA und folglich der veränderten Interaktion mit NKG2D erklärt werden könnte.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen der vorliegenden Arbeit unterstützen die Beobachtungen von Suemizu et al. und widersprechen den Daten von Hüe et al., welche keinen Zusammenhang zwischen dem MICA-Genotyp und der MICA/NKG2D-abhängigen Lyse sehen (91,151). Daten bezüglich der Prävalenz des MICA-A5.1-Allels und dem Vorkommen und klinischen Verlauf einer Zöliakie wurden in der vorliegenden Studie nicht generiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die trunkierte MICA-Variante nicht in die basolaterale Membran sortiert wird und eine Interaktion mit IELs somit funktionell vermindert sein kann. Aus pathophysiologischer Sicht unterstützt die Arbeit somit die These von Lopez-Vazquez et al., Suemizu et al. und Tinto et al. (151,163,180,181).

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die differenzielle subzelluläre Kompartimentierung von MICA*008 und MICA*019 in einem humanen IEC-Modell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das trunkierte MICA*008 subzellulär vorwiegend intrazellulär sowie submembranös lokalisiert ist. Vor allem apikal, zu geringerem Anteil auch basolateral, zeigte sich eine submembranöse vesikelartige Anordnung des MICA*008-Signals. Basolateral konnte MICA*008 nicht in der Zellmembran beobachtet werden.

In Caco-2-bbe-Zellen, welche mit dem MICA-Allel voller Länge MICA*019 transfiziert wurden, konnte eine eindeutige Sortierung in die basolaterale Zellmembran beobachtet werden. Das MICA-Molekül MICA*019 zeigte basolateral ein membranständiges Signal und kolokalisierte mit dem basolateralen Membranprotein E-Cadherin sowie mit Occludin. Auch Kollokalisierungen mit dem überwiegend apikalen Membranprotein ZO-1 konnten bei MICA*019 beobachtet werden. Dieses subzelluläre Muster, allerdings mit einer weniger stark streng membranösen Anordnung, zeigte auch die Kontrolle MICB.

Durchflusszytometrisch konnte gezeigt werden, dass der Anteil des zelloberflächlich exprimierten MICA*019-Proteins größer ist als jener der trunkierten Allelvariante MICA*008.

Die Schlussfolgerung dieser Arbeit lautet daher, dass ein attenuierter Krankheitsverlauf bei Zöliakiepatienten mit der trunkierten A5.1-Variante durch eine verminderte Interaktion des NKG2D-Rezeptors und MICA vermittelt werden könnte.

6.1 Offene Fragen und weiterführende Experimente

Eine zentrale Frage ist der Vergleich der Interaktion humaner intraepithelialer T-Lymphozyten mit Darmepithel, das differenziell MICA*008 oder MICA*019 exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Caco-2-bbe-Zelllinien hergestellt, welche MICA*008, MICA*019 und MICB exprimieren. In einer Kokultur dieser Epithelzellen mit aus gesunden Kontrollen sowie aus Zöliakiepatienten gewonnenen IELs kann perspektivisch die differenzielle Interaktion der Lymphozyten mit dem Epithel hinsichtlich Apoptose und Proliferation beobachtet werden. Folgend den aktuellen Untersuchungen wäre zu erwarten, dass die Kokultur von T-Lymphozyten aus Zöliakiepatienten mit MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen zu einer stärkeren Apoptose und Zerstörung des Epithels führt als in MICA*008-exprimierendem Epithel.

Die chronische Überexpression von IL-15 spielt in der Pathogenese der Zöliakie eine bedeutende Rolle. In der Literatur ist beschrieben, wie IL-15 zu einem proinflammatorischen Milieu beiträgt: IL-15 führt zu einer Expression des NKG2D-Rezeptors auf intraepithelialen Lymphozyten und ist damit ein wichtiges Bindeglied der inflammatorischen Antwort (187). Insofern sollte eine Kokultur von MICA/B-exprimierenden Zellen mit IL-15-haltigem Medium untersucht werden.

Dieses Assay könnte perspektivisch auch als diagnostisches Tool in der Klinik verwendet werden: Aus duodenaler Schleimhaut von Zöliakiepatienten isolierte IELs könnten hierbei mit den jeweiligen Zelllinien in Kultur gebracht und die Interaktion der Lymphozyten mit MICA*008- und MICA*019-exprimierendem Epithel hinsichtlich Zelllyse und Apoptose untersucht werden. Dieses Assay könnte mit nativem und IL-15-haltigem Medium im Vergleich durchgeführt werden. Anhand des Verhaltens der Lymphozyten könnten möglicherweise auch prognostische Schlüsse bezüglich des klinischen Verlaufes einer Zöliakie gezogen werden.

Auch eine durchflusszytometrische Analyse mit MICA*008- und MICA*019-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen soll nach vorangehender Inkubation mit IL-15 sowie mit Gliadinpeptiden erfolgen, um *in vitro* eine inflammatorische Umgebung herzustellen. Durchflusszytometrisch kann untersucht werden, ob sich die MICA-Expression auf der Zelloberfläche nach IL-15-Exposition genotypenabhängig unterscheidet.

6.2 MICA als Target in der immunmodulierenden Therapie der Zöliakie

Ebenfalls diskutiert werden kann eine Modulation des Krankheitsverlaufes durch ein spezifisches Targeting des MICA-Proteins durch 1) spezifische Antikörper oder 2) Gentherapie. Sollte sich in weiteren Studien bestätigen, dass MICA eine Schlüsselrolle in der epithelialen Lyse und somit Zottenatrophie in der Zöliakie spielt, erscheint es sinnvoll, die Expression des Proteins medikamentös oder gentherapeutisch zu modulieren und die Effekte in weiterführenden Tierexperimenten zu testen.

Literaturverzeichnis

1. Kamel S. Subzelluläre Lokalisation von MICA in Abhängigkeit vom MICA-Genotyp bei Zöliakie. Dissertation. *Charité Universitätsmedizin*. 2014.
2. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ, Green PHR, Hadjivassiliou M, Holdaway A, van Heel DA, Kaukinen K, Leffler DA, Leonard JN, Lundin KEA, McGough N, Davidson M, Murray JA, Swift GL, Walker MM, Zingone F, Sanders DS, BSG Coeliac Disease Guidelines Development Group, British Society of Gastroenterology. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* 2014;**63**:1210–1228.
3. Adams F. The Extant Works of Aretaeus, the Cappadocian. *London: The Sydenham Society*. 1856.
4. Gee S. On the coeliac affection. *St Bartholomews Hosp Rep* 1888;**24**:17–20.
5. Haas SV. The Value Of The Banana In The Treatment Of Celiac Disease. *Am J Dis Child* 1924;**28**:421–437.
6. Dicke WK. Coeliakie: een onderzoek naar de nadelige invloed van sommige graansoorten op de lijder aan coeliakie. Dissertation. *Universiteit Utrecht*. 1950.
7. Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr* 1953;**42**:34–42.
8. Anderson C, Frazer AC, French JM, Gerrard JW, Sammons HG, Smellie JM. Coeliac Disease: Gastro-Intestinal Studies And The Effect Of Dietary Wheat Flour. *The Lancet* 1952;**259**:836–842.
9. Paulley JW. Observations on the Aetiology of Idiopathic Steatorrhoea. *Br Med J* 1954;**2**:1318–1321.
10. Taylor KB, Truelove SC, Thomson DL, Wright R. An immunological study of coeliac disease and idiopathic steatorrhoea. Serological reactions to gluten and milk proteins. *Br Med J* 1961;**2**:1727–1731.
11. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;**3**:797–801.
12. Losowsky MS. A History of Coeliac Disease. *DDI* 2008;**26**:112–120.
13. Catassi C, Räscht IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, Coppa GV, Giorgi PL. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;**343**:200–203.
14. Catassi C, Fabiani E, Räscht IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, Alessandrini S, Iwanejko G, Domenici R, Mei E, Miano A, Marani M, Bottaro G, Spina M, Dotti M, Montanelli A, Barbato M, Viola F, Lazzari R, Vallini M, Guariso G, Plebani M, Cataldo F, Traverso G, Ventura A. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl* 1996;**412**:29–35.
15. Yuan J, Gao J, Li X, Liu F, Wijmenga C, Chen H, Gilissen LJWJ. The tip of the 'celiac iceberg' in China: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;**8**:e81151.

16. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger M-H, Gasparin M, Bravi E, Mäki M, the members of the Coeliac EU Cluster E. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine* 2010;**42**:587–595.
17. Laass MW, Schmitz R, Uhlig HH, Zimmer K-P, Thamm M, Koletzko S. The Prevalence of Celiac Disease in Children and Adolescents in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2015;**112**:553–560.
18. Ivarsson A, Myléus A, Norström F, van der Pals M, Rosén A, Högberg L, Danielsson L, Halvarsson B, Hammaroth S, Hernell O, Karlsson E, Stenhammar L, Webb C, Sandström O, Carlsson A. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. *Pediatrics* 2013;**131**:e687-694.
19. Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ, Zinsmeister AR, Lahr BD, Murray JA. Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *Am J Gastroenterol* 2013;**108**:818–824.
20. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PHR, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003;**163**:286–292.
21. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol* 2012;**107**:1538–1544; quiz 1537, 1545.
22. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, Gelfond D, Puppa E, Sferruzza A, Fasano A. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann Med* 2010;**42**:530–538.
23. Lebowl B, Ludvigsson JF, Green PHR. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ* 2015;**351**:h4347.
24. Dewar DH, Ciclitira PJ. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005;**128**:S19–S24.
25. Felber J, Aust D, Baas S, Bläker H, Daum S, Koletzko S, Laaß MW, Roeb E, Schuppan D. Ergebnisse einer S2k-Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) gemeinsam mit der Deutschen Zöliakie-Gesellschaft (DZG e. V.) zur Zöliakie, Weizenallergie und Weizensensitivität 2014;:96.
26. Lo W, Sano K, Lebowl B, Diamond B, Green PHR. Changing presentation of adult celiac disease. *Dig Dis Sci* 2003;**48**:395–398.
27. Fasano A. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology* 2005;**128**:S68-73.
28. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KEA, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2013;**62**:43–52.
29. Logan RF, Tucker G, Rifkind EA, Heading RC, Ferguson A. Changes in clinical features of coeliac disease in adults in Edinburgh and the Lothians 1960-79. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;**286**:95–97.
30. Sanders DS, Hurlstone DP, Stokes RO, Rashid F, Milford-Ward A, Hadjivassiliou M,

- Lobo AJ. Changing face of adult coeliac disease: experience of a single university hospital in South Yorkshire. *Postgrad Med J* 2002;**78**:31–33.
31. Nachman F, Vázquez H, González A, Andrenacci P, Compagni L, Reyes H, Sugai E, Moreno ML, Smecuol E, Hwang HJ, Sánchez IP, Mauriño E, Bai JC. Gastroesophageal reflux symptoms in patients with celiac disease and the effects of a gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;**9**:214–219.
 32. Sanders DS, Carter MJ, Hurlstone DP, Pearce A, Ward AM, McAlindon ME, Lobo AJ. Association of adult coeliac disease with irritable bowel syndrome: a case-control study in patients fulfilling ROME II criteria referred to secondary care. *Lancet* 2001;**358**:1504–1508.
 33. Franzese A, Iannucci MP, Valerio G, Ciccimarra E, Spaziano M, Mandato C, Vajro P. Atypical celiac disease presenting as obesity-related liver dysfunction. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;**33**:329–332.
 34. Volta U, De Franceschi L, Lari F, Molinaro N, Zoli M, Bianchi FB. Coeliac disease hidden by cryptogenic hypertransaminasaemia. *Lancet* 1998;**352**:26–29.
 35. Lionetti E, Francavilla R, Pavone P, Pavone L, Francavilla T, Pulvirenti A, Giugno R, Ruggieri M. The neurology of coeliac disease in childhood: what is the evidence? A systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2010;**52**:700–707.
 36. Ludvigsson JF, Olsson T, Ekbohm A, Montgomery SM. A population-based study of coeliac disease, neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;**25**:1317–1327.
 37. Ciacci C, Iavarone A, Mazzacca G, De Rosa A. Depressive symptoms in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;**33**:247–250.
 38. Hadjivassiliou M, Sanders DS, Woodroffe N, Williamson C, Grünewald RA. Gluten ataxia. *Cerebellum* 2008;**7**:494–498.
 39. Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR. Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology* 2006;**66**:373–377.
 40. Zugna D, Richiardi L, Akre O, Stephansson O, Ludvigsson JF. A nationwide population-based study to determine whether coeliac disease is associated with infertility. *Gut* 2010;**59**:1471–1475.
 41. Martinelli D, Fortunato F, Tafuri S, Germinario CA, Prato R. Reproductive life disorders in Italian celiac women. A case-control study. *BMC Gastroenterol* 2010;**10**:89.
 42. Zone JJ. Skin manifestations of celiac disease. *Gastroenterology* 2005;**128**:S87-91.
 43. Tursi A, Elisei W, Giorgetti GM, Gaspardone A, Lecca PG, Di Cesare L, Brandimarte G. Prevalence of celiac disease and symptoms in relatives of patients with celiac disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010;**14**:567–572.
 44. Katz KD, Rashtak S, Lahr BD, Melton LJ, Krause PK, Maggi K, Talley NJ, Murray JA. Screening for celiac disease in a North American population: sequential serology and gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol* 2011;**106**:1333–1339.
 45. Kurppa K, Paavola A, Collin P, Sievänen H, Laurila K, Huhtala H, Saavalainen P, Mäki M, Kaukinen K. Benefits of a gluten-free diet for asymptomatic patients with serologic markers of celiac disease. *Gastroenterology* 2014;**147**:610-617.e1.
 46. Itzlinger A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease-For ever and for All? *Nutrients* 2018;**10**, 1796

47. Biagi F, Trotta L, Alfano C, Balduzzi D, Staffieri V, Bianchi PI, Marchese A, Vattiato C, Zilli A, Luinetti O, Gobbi P, Corazza GR. Prevalence and natural history of potential celiac disease in adult patients. *Scand J Gastroenterol* 2013;**48**:537–542.
48. Rubio-Tapia A, Murray JA. Classification and Management of Refractory Celiac Disease. *Gut* 2010;**59**:547–557.
49. Mustalahti K, Collin P, Sievänen H, Salmi J, Mäki M. Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. *Lancet* 1999;**354**:744–745.
50. Majorana A, Bardellini E, Ravelli A, Plebani A, Polimeni A, Campus G. Implications of gluten exposure period, CD clinical forms, and HLA typing in the association between celiac disease and dental enamel defects in children. A case-control study. *Int J Paediatr Dent* 2010;**20**:119–124.
51. Stenson WF, Newberry R, Lorenz R, Baldus C, Civitelli R. Increased prevalence of celiac disease and need for routine screening among patients with osteoporosis. *Arch Intern Med* 2005;**165**:393–399.
52. Kurppa K, Collin P, Sievänen H, Huhtala H, Mäki M, Kaukinen K. Gastrointestinal symptoms, quality of life and bone mineral density in mild enteropathic coeliac disease: a prospective clinical trial. *Scand J Gastroenterol* 2010;**45**:305–314.
53. Fuchs V, Kurppa K, Huhtala H, Mäki M, Kekkonen L, Kaukinen K. Delayed celiac disease diagnosis predisposes to reduced quality of life and incremental use of health care services and medicines: A prospective nationwide study. *United European Gastroenterol J* 2018;**6**:567–575.
54. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;**127**:2375–2390.
55. Biagi F, Corazza GR. Defining gluten refractory enteropathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;**13**:561–565.
56. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 2009;**137**:1912–1933.
57. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;**357**:133–142.
58. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 2007;**24**:115–119.
59. Keck B, Köhler P, Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten: cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion. *Z Lebensm Unters Forsch* 1995;**200**:432–439.
60. Ferguson A, MacDonald TT, McClure JP, Holden RJ. Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease. *Lancet* 1975;**1**:895–897.
61. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;**119**:234–242.
62. Andersen G, Köhler H, Rubach M, Schaecke W. Jahresbericht der Deutschen Forschungsanstalt 2015;;:136–139.
63. Tjon JM-L, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* 2010;**62**:641–651.
64. Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A,

- Troncone R, Ward R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;**23**:559–575.
65. Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;**27**:1044–1052.
66. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002;**50**:624–628.
67. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzù G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 2006;**55**:803–808.
68. Dieli-Crimi R, Cénit MC, Núñez C. The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *Journal of Autoimmunity* 2015;**64**:26–41.
69. Karel K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J, European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003;**64**:469–477.
70. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, Barbato M, Barbera C, Barera G, Bellantoni A, Castellano E, Guariso G, Limongelli MG, Pellegrino S, Polloni C, Ughi C, Zuin G, Fasano A, Catassi C, SIGENP (Italian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) Working Group on Weaning and CD Risk. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med* 2014;**371**:1295–1303.
71. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spampanato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut* 2007;**56**:1054–1059.
72. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2008;**103**:190–195.
73. Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 1993;**178**:187–196.
74. Lundin KE, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol* 1994;**41**:285–291.
75. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjöström H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998;**4**:713–717.
76. van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 1998;**161**:1585–1588.
77. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:140–156.
78. Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, Khosla C. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue

- injury. *PLoS ONE* 2008;**3**:e1861.
79. Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 1995;**37**:766–776.
 80. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998;**115**:551–563.
 81. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 2000;**119**:996–1006.
 82. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;**362**:30–37.
 83. Lundqvist C, Melgar S, Yeung MM, Hammarström S, Hammarström ML. Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol* 1996;**157**:1926–1934.
 84. Oberhuber G, Vogelsang H, Stolte M, Muthenthaler S, Kummer JA, Kummer AJ, Radaszkiewicz T. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. *Am J Pathol* 1996;**148**:1351–1357.
 85. Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, Mougnot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P, Colombel JF, Matuchansky C, Cugnenc H, Lopez-Botet M, Vivier E, Moretta A, Roberts AI, Ebert EC, Guy-Grand D, Brousse N, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology* 2000;**118**:867–879.
 86. Jabri B, Ebert E. Human CD8+ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue. *Immunol Rev* 2007;**215**:202–214.
 87. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999;**285**:727–729.
 88. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;**21**:357–366.
 89. Allegretti YL, Bondar C, Guzman L, Cueto Rua E, Chopita N, Fuertes M, Zwirner NW, Chirido FG. Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease. *PLoS ONE* 2013;**8**:e73658.
 90. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:12445–12450.
 91. Hüe S, Mention J-J, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;**21**:367–377.
 92. Yokoyama S, Watanabe N, Sato N, Perera P-Y, Filkoski L, Tanaka T, Miyasaka M,

- Waldmann TA, Hiroi T, Perera LP. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:15849–15854.
93. Sollid LM. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease: license to kill revealed. *Immunity* 2004;**21**:303–304.
94. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP, ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis, ESPGHAN Gastroenterology Committee, European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;**54**:136–160.
95. Hogen Esch CE, Wolters VM, Gerritsen SAM, Putter H, von Blomberg BM, van Hoogstraten IMW, Houwen RHJ, van der Lely N, Mearin ML. Specific celiac disease antibodies in children on a gluten-free diet. *Pediatrics* 2011;**128**:547–552.
96. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and 'Club del Tenue' Working Groups on Coeliac Disease. *Gut* 1998;**42**:362–365.
97. Nemeč G, Ventura A, Stefano M, Di Leo G, Baldas V, Tommasini A, Ferrara F, Taddio A, Città A, Sblattero D, Marzari R, Not T. Looking for celiac disease: diagnostic accuracy of two rapid commercial assays. *Am J Gastroenterol* 2006;**101**:1597–1600.
98. Korponay-Szabó IR, Raivio T, Laurila K, Opre J, Király R, Kovács JB, Kaukinen K, Fésüs L, Mäki M. Coeliac disease case finding and diet monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;**22**:729–737.
99. Tangermann P, Branchi F, Itzlinger A, Aschenbeck J, Schubert S, Maul J, Liceni T, Schröder A, Heller F, Spitz W, Möhler U, Graefe U, Radke M, Trenkel S, Schmitt M, Loddenkemper C, Preiß JC, Ullrich R, Daum S, Siegmund B, Bojarski C, Schumann M. Low Sensitivity of Simtomax Point of Care Test in Detection of Celiac Disease in a Prospective Multicenter Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019;**17**:1780-1787.e5.
100. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 1992;**102**:330–354.
101. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;**11**:1185–1194.
102. Corazza GR, Villanacci V. Coeliac disease. *J Clin Pathol* 2005;**58**:573–574.
103. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 2011;**29**:493–525.
104. Schuppan D. Zöliakie. *Bundesgesundheitsbl* 2016;**59**:827–835.
105. Schumann M, Kamel S, Jöhrens K, Daum S. Zöliakie – Eine Übersicht zur Leitlinie der DGVS. *Gastroenterologie up2date* 2014;**10**:235–245.
106. Larizza D, Calcaterra V, Klersy C, Badulli C, Caramagna C, Ricci A, Brambilla P, Salvaneschi L, Martinetti M. Common immunogenetic profile in children with multiple

- autoimmune diseases: the signature of HLA-DQ pleiotropic genes. *Autoimmunity* 2012;**45**:470–475.
107. Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel J-F, Michaud L, Sarles J, Hugot J-P, Ginies J-L, Dabadie A, Mouterde O, Allez M, Nion-Larmurier I. Incidence of Autoimmune Diseases in Celiac Disease: Protective Effect of the Gluten-Free Diet. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2008;**6**:753–758.
 108. Rashid M, Butzner D, Burrows V, Zarkadas M, Case S, Molloy M, Warren R, Pulido O, Switzer C. Consumption of pure oats by individuals with celiac disease: a position statement by the Canadian Celiac Association. *Can J Gastroenterol* 2007;**21**:649–651.
 109. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission Text von Bedeutung für den EWR. URL: <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj/deu> (Zugriff 5. Januar 2019).
 110. Hollon JR, Cureton PA, Martin ML, Puppa ELL, Fasano A. Trace gluten contamination may play a role in mucosal and clinical recovery in a subgroup of diet-adherent non-responsive celiac disease patients. *BMC Gastroenterol* 2013;**13**:40.
 111. Selby WS, Painter D, Collins A, Faulkner-Hogg KB, Loblay RH. Persistent mucosal abnormalities in coeliac disease are not related to the ingestion of trace amounts of gluten. *Scand J Gastroenterol* 1999;**34**:909–914.
 112. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, Mora A, Bertolazzi S, Turini D, Carella G, Malagoli A, Ferrante G, Cesana BM, Ricci C. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;**29**:1299–1308.
 113. Tuire I, Marja-Leena L, Teea S, Katri H, Jukka P, Päivi S, Heini H, Markku M, Pekka C, Katri K. Persistent duodenal intraepithelial lymphocytosis despite a long-term strict gluten-free diet in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2012;**107**:1563–1569.
 114. Pekki H, Kurppa K, Mäki M, Huhtala H, Sievänen H, Laurila K, Collin P, Kaukinen K. Predictors and Significance of Incomplete Mucosal Recovery in Celiac Disease After 1 Year on a Gluten-Free Diet. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:1078–1085.
 115. Volta U, Caio G, Giancola F, Rhoden KJ, Ruggeri E, Boschetti E, Stanghellini V, Giorgio RD. Features and Progression of Potential Celiac Disease in Adults. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2016;**14**:686-693.e1.
 116. Kinsey L, Burden ST, Bannerman E. A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their diet compares to that of the British general population. *Eur J Clin Nutr* 2008;**62**:1333–1342.
 117. Black JL, Orfila C. Impact of coeliac disease on dietary habits and quality of life. *J Hum Nutr Diet* 2011;**24**:582–587.
 118. Zuccotti G, Fabiano V, Dilillo D, Picca M, Cravidi C, Brambilla P. Intakes of nutrients in Italian children with celiac disease and the role of commercially available gluten-free products. *J Hum Nutr Diet* 2013;**26**:436–444.
 119. Penagini F, Dilillo D, Meneghin F, Mameli C, Fabiano V, Zuccotti GV. Gluten-free diet

- in children: an approach to a nutritionally adequate and balanced diet. *Nutrients* 2013;**5**:4553–4565.
120. Spear P, Wu M-R, Sentman M-L, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun* 2013;**13**.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700746/> (accessed 27 Jan2019).
 121. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:781–790.
 122. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res* 2008;**40**:18–34.
 123. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 2002;**3**:1150–1155.
 124. Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, Polić B. Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci* 2011;**68**:3519–3529.
 125. Spear P, Wu M-R, Sentman M-L, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun* 2013;**13**:8.
 126. Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E, Francis F. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 1998;**48**:163–173.
 127. Ho EL, Heusel JW, Brown MG, Matsumoto K, Scalzo AA, Yokoyama WM. Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:6320–6325.
 128. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;**413**:165–171.
 129. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:6879–6884.
 130. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000;**1**:119–126.
 131. Tieng V, Le Bouguéne C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:2977–2982.
 132. Fernández-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Agüera-González S, Skepper JN, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010;**285**:8543–8551.
 133. Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 1999;**60**:323–330.
 134. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblauch S, Cado D, Greenberg NM, Greenberg NR, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008;**28**:571–580.
 135. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;**419**:734–738.

136. Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, Vyas YM. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol* 2003;**171**:6891–6899.
137. Kuylenstierna C, Björkström NK, Andersson SK, Sahlström P, Bosnjak L, Paquin-Proulx D, Malmberg K-J, Ljunggren H-G, Moll M, Sandberg JK. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol* 2011;**41**:1913–1923.
138. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001;**2**:255–260.
139. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF. MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 2001;**15**:83–93.
140. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 1999;**401**:921–923.
141. Robinson J, Pérez-Rodríguez M, Waller MJ, Cuillerier B, Bahram S, Yao Z, Albert ED, Madrigal JA, Marsh SG. MICA sequences 2000. *Immunogenetics* 2001;**53**:150–169.
142. Zhu F, Zhao H, He Y, Zhang W, He J, Xu X, Yan L. Distribution of MICA diversity in the Chinese Han population by polymerase chain reaction sequence-based typing for exons 2-6. *Tissue Antigens* 2009;**73**:358–363.
143. Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Ahmad T, Walton R, Barnardo MCNM, Fuggle SV. The identification of three novel MICA alleles by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 2006;**67**:321–325.
144. Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996;**44**:351–357.
145. Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debré P, Bahram S, Theodorou I. Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics* 1997;**46**:434–436.
146. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamazaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:1298–1303.
147. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**:6259–6263.
148. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993;**14**:349–352.
149. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *PNAS* 1994;**91**:6259–6263.
150. Li Z, Groh V, Strong RK, Spies T. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 2000;**51**:246–248.
151. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, Inoko H. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 2002;**99**:2971–2976.
152. Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, Stastny P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* 2001;**62**:620–631.
 153. Tian W, Boggs DA, Ding WZ, Chen DF, Fraser PA. MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families. *Immunogenetics* 2001;**53**:724–728.
 154. Zhang Y, Lazaro AM, Zou Y, Lavingia B, Moraes EM, Moraes RJ, Stastny P. MICA polymorphism in South American Indians. *Immunogenetics* 2002;**53**:900–906.
 155. Romphruk AV, Naruse TK, Romphruk A, Kawata H, Puapairoj C, Kulski JK, Leelayuwat C, Inoko H. Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *Tissue Antigens* 2001;**58**:83–89.
 156. Thomas M, Boname JM, Field S, Nejentsev S, Salio M, Cerundolo V, Wills M, Lehner PJ. Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:1656–1661.
 157. Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 2005;**174**:3098–3104.
 158. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;**157**:105–132.
 159. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, Valés-Gómez M. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochem J* 2013;**454**:295–302.
 160. Seidel E, Le VTK, Bar-On Y, Tsukerman P, Enk J, Yamin R, Stein N, Schmiedel D, Oiknine Djian E, Weisblum Y, Tirosh B, Stastny P, Wolf DG, Hengel H, Mandelboim O. Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen: HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA*008 to Escape Elimination by NK Cells. *Cell Rep* 2015;**10**:968–982.
 161. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 2010;**70**:481–489.
 162. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 2002;**50**:336–340.
 163. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MICA-A5.1 allele is associated with atypical forms of celiac disease in HLA-DQ2-negative patients. *Immunogenetics* 2002;**53**:989–991.
 164. Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simonassmann P, Haffen K, Fogh J, Pinto M, Robine S, Appay M-D, Lacroix B, Assmann PF, Fogh J, Appay MD, Assman PF, Fogh J, Zweibaum A, Pinto LS, Appay MD, Zwiibaum A, Robin S, Simon P, Robinelocon S. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 1983;**323**–330.
 165. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.

- Gastroenterology* 1989;**96**:736–749.
166. Engle MJ, Goetz GS, Alpers DH. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol* 1998;**174**:362–369.
 167. Peterson MD, Mooseker MS. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J Cell Sci* 1992;**102 (Pt 3)**:581–600.
 168. Fleet JC, Wang L, Vitek O, Craig BA, Edenberg HJ. Gene expression profiling of Caco-2 BBE cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation. *Physiol Genomics* 2003;**13**:57–68.
 169. Mellergaard M, Skovbakke SL, Schneider CL, Lauridsen F, Andresen L, Jensen H, Skov S. N-glycosylation of asparagine 8 regulates surface expression of major histocompatibility complex class I chain-related protein A (MICA) alleles dependent on threonine 24. *J Biol Chem* 2014;**289**:20078–20091.
 170. Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K. Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol* 1993;**123**:35–45.
 171. Marin MLC, Savioli CR, Yamamoto JH, Kalil J, Goldberg AC. MICA polymorphism in a sample of the São Paulo population, Brazil. *Eur J Immunogenet* 2004;**31**:63–71.
 172. Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* 2009;**83**:12345–12354.
 173. Huang B, Luo Q, Mei B, Yu P. Correlation between MHC class I-related chain A gene *008 allele and human cytomegalovirus infection. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007;**27**:509–511.
 174. Gambelunghe G, Brozzetti A, Ghaderi M, Candeloro P, Tortoioli C, Falorni A. MICA gene polymorphism in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2007;**1110**:92–98.
 175. Gambelunghe G, Ghaderi M, Cosentino A, Falorni A, Brunetti P, Falorni A, Sanjeevi CB. Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. *Diabetologia* 2000;**43**:507–514.
 176. Gupta M, Ludvigsson J, Sanjeevi CB. Frequency of MICA in all babies in southeast Sweden (ABIS) positive for high-risk HLA-DQ associated with type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1037**:138–144.
 177. Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi CB. Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:3701–3707.
 178. Park YS, Sanjeevi CB, Robles D, Yu L, Rewers M, Gottlieb PA, Fain P, Eisenbarth GS. Additional association of intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. *Tissue Antigens* 2002;**60**:155–163.
 179. Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, Gonzalez-Roces S, Sanchez del Río J, Rodriguez Pérez A, Brautbar C, López-Larrea C. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999;**42**:1010–1016.

180. López-Vázquez A, Fuentes D, Rodrigo L, González S, Moreno M, Fernández E, Martínez-Borra J, López-Larrea C. MHC class I region plays a role in the development of diverse clinical forms of celiac disease in a Saharawi population. *Am J Gastroenterol* 2004;**99**:662–667.
181. Tinto N, Ciacci C, Calcagno G, Gennarelli D, Spampinato A, Farinaro E, Tortora R, Sacchetti L. Increased prevalence of celiac disease without gastrointestinal symptoms in adults MICA 5.1 homozygous subjects from the Campania area. *Dig Liver Dis* 2008;**40**:248–252.
182. Rueda B, Pascual M, López-Nevot MA, Koeleman BPC, Ortega E, Maldonado J, López M, Martín J. Association of MICA-A5.1 allele with susceptibility to celiac disease in a family study. *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:359–362.
183. Bilbao JR, Martín-Pagola A, Vitoria JC, Zubillaga P, Ortiz L, Castaño L. HLA-DRB1 and MHC class 1 chain-related A haplotypes in Basque families with celiac disease. *Tissue Antigens* 2002;**60**:71–76.
184. Fernandez L, Fernandez-Arquero M, Gual L, Lazaro F, Maluenda C, Polanco I, Figueredo MA, Concha EGD Ia. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene in celiac disease. *Tissue Antigens* 2002;**59**:219–222.
185. Woolley N, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J. Cytokine gene polymorphisms and genetic association with coeliac disease in the Finnish population. *Scand J Immunol* 2005;**61**:51–56.
186. Louka AS, Lie BA, Talseth B, Ascher H, Ek J, Gudjónsdóttir AH, Sollid LM. Coeliac disease patients carry conserved HLA-DR3-DQ2 haplotypes revealed by association of TNF alleles. *Immunogenetics* 2003;**55**:339–343.
187. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev* 2014;**260**:221–234.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alice Eleonor Itzlinger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Subzellulär-differenzielle Expression von MICA-Allelen in einem Zöliakie-Zellkulturmodell/Differential subcellular expression of MICA alleles in a celiac disease cell culture model“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer un-wahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Alice Eleonor Itzlinger hatte folgenden Anteil an der genannten Publikation:

Publikation 1: Itzlinger, A, Breiderhoff T, Fromm A, Schulzke JD, Siegmund B, Schumann M. Subzelluläre Lokalisation von MICA bei Zöliakie (Poster, Kongressbeitrag). 71. Jahrestagung der DGVS und 10. Herbsttagung der DGAV. Viszeralmedizin 2016. Hamburg, 21.-24. September 2016. *Z Gastroenterol* 2016. Aug;54(8):KV053.

Frau Itzlinger präsentierte Zwischenergebnisse der Doktorarbeit als Poster am Kongress der DGVS 2016 in Hamburg. Sie führte in genannter Publikation die Subklonierung der MICA/B-Konstrukte durch. Sie war zuständig für die transienten als auch stabilen Transfektionen der Caco-2-bbe-Zelllinie mit den generierten MICA/B-Konstrukten und führte die Immunfluoreszenzfärbungen und Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie durch. Ferner übernahm sie die Western Blot-Experimente und durchflusszytometrischen Untersuchungen sowie deren Auswertung. Die statistische Auswertung wurde ebenfalls von Frau Itzlinger durchgeführt. Die Kongresspräsentation an der Jahrestagung der DGVS in Hamburg 2016 wurde von Frau Itzlinger gehalten. Die Daten aus den folgend genannten Kapiteln sind in dem Abstract der oben genannten Publikation enthalten:

- 4.1 Feststellung der Sequenz der MICA/B-Konstrukte
- 4.2 Nachweis der MICA/B- und HA-Expression in Caco-2-bbe- und HEK-Zellen mittels Western Blot
- 4.3 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelloberflächen-MICA *versus* intrazellulär exprimiertem MICA
- 4.4 Darstellung der subzellulären Lokalisation des MICA- und MICB-Proteins mittels konfokaler Mikroskopie
- 4.5 Untersuchungen zur Epithelbarriere bei MICA/B-exprimierenden Caco-2-bbe-Zellen
 - Die Untersuchungen zur Epithelbarriere mittels TER wurden in der vorliegenden Dissertationsarbeit um weitere Experimente ergänzt und unterscheiden sich daher in den Ergebnissen von jenen der oben genannten Kongresspublikation.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- Publikation 1:** Itzlinger, A; Breiderhoff T, Fromm A, Schulzke JD, Siegmund B, Schumann M. Subzelluläre Lokalisation von MICA bei Zöliakie (Poster, Kongressbeitrag). 71. Jahrestagung der DGVS und 10. Herbsttagung der DGAV. Viszeralmedizin 2016. Hamburg, 21.-24. September 2016. *Z Gastroenterol* 2016. Aug;54(8):KV053 (1 page)
- Publikation 2:** Itzlinger, A; Branchi, F; Elli, L; Schumann, M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease – Forever and for All? *Nutrients* 2018, 10(11), 1796 (14 pages)
- Publikation 3:** Tangermann P, Branchi F, Itzlinger A, Aschenbeck J, Schubert S, Maul J, Liceni T, Schröder A, Heller F, Spitz W, Möhler U, Graefe U, Radke M, Trenkel S, Schmitt M, Loddenkemper C, Preiß JC, Ullrich R, Daum S, Siegmund B, Bojarski C, Schumann M. Low Sensitivity of Simtomax Point of Care Test in Detection of Celiac Disease in a Prospective Multicenter Study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(9):1780-1787.e5 (8 pages)
- Publikation 4:** Itzlinger, A; Schumann, M. Macht Weizen krank auch ohne Zöliakie? *Allergologie* 2018, 41(7), 321–330 (10 pages)
- Publikation 5:** Cardoso-Silva D, Delbue D, Itzlinger A, Moerkens R, Withoff S, Branchi F, Schumann M. Intestinal Barrier Function in Gluten-Related Disorders. *Nutrients* 2019, 11(10), 2325 (19 pages)
- Publikation 6:** Delbue D, Cardoso-Silva D, Branchi F, Itzlinger A, Letizia M, Siegmund B, Schumann M. Celiac Disease Monocytes Induce a Barrier Defect in Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(22), 5597 (12 pages)
- Publikation 7:** Tangermann P, Itzlinger A, Bojarski C, Daum S, Siegmund B, Schumann M. Durchflusszytometrische Analyse intestinaler Lymphozyten bei Zöliakie und refraktärer Zöliakie (Poster, Kongressbeitrag). *Z Gastroenterol* 2016;54:KV052 (1 page)

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich während der spannenden und herausfordernden Zeit der Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Michael Schumann für die engagierte Betreuung der Arbeit, stetige fachliche und methodische Unterstützung und neue Projektideen während aller Phasen meiner Dissertation.

Zudem möchte ich mich herzlichst bei Priv.-Doz. Dr. Susanne M. Krug und Seniorprof. Dr. Michael Fromm für die gute Betreuung sowie zahlreiche Ratschläge und Anmerkungen bedanken, welche mich auf dem Weg zum Abschluss der Arbeit neue Ansätze entdecken ließen.

Großer Dank gilt auch Frau Claudia Heldt für die tolle fachliche Unterstützung, allem voran in der Zellkultur, für die geduldigen Erklärungen und zudem für viele nette Stunden im Labor.

Bei Dr. Verena Moos möchte ich mich für die Einführung und ihre Hilfe bei der Durchflusszytometrie herzlichst bedanken.

Anja Fromm, für viele konstruktive Ratschläge im Labor und besonders ihre Hilfe bei den Western Blots.

Dr. Federica Branchi, für kompetente Ratschläge im Labor, für das gemeinsame Verfassen von Artikeln und stetige Inspiration und Motivation.

Dr. Tillmann Breiderhoff, für die geduldige Hilfe und Unterstützung vor allem während meiner Anfänge im Labor und dem Erlernen molekularbiologischer Methoden, welche als Studierende der Medizin nicht immer einfach waren.

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie, die immer ein offenes Ohr für Fragen für mich hatten.

Zudem bedanke ich mich bei Dr. Sophie Scharner, Studienkollegin und langjährige Freundin, für wertvolle Austausche von Ideen und stetige Motivation.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich durch das gesamte Studium und die Promotion auf allen Wegen unterstützt hat.