

Defizienzen der zellulären und humoralen Immunantwort und  
alternative Aktivierung von Makrophagen und Monozyten  
bei Patienten mit Morbus Whipple

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biologin Anika Geelhaar-Karsch

angefertigt in der Medizinischen Klinik I, Charité Berlin

Berlin 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Blankenstein

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider

Disputation am: 09.10.2013

---

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

Verena Moos, Carsten Schmidt, Anika Geelhaar, Desireè Kunkel, Kristina Allers, Katina Schinnerling, Christoph Loddenkemper, Florence Fenollar, Annette Moter, Didier Raoult, Ralf Igantius, Thomas Schneider. **Impaired Immune Functions of Monocytes and Macrophages in Whipple's Disease**; GASTROENTEROLOGY 2010;138:210–220

Anika Geelhaar, Verena Moos, Katina Schinnerling, Christoph Loddenkemper, Florence Fenollar, Didier Raoult, Thomas Schneider. **Specific and Nonspecific B-Cell Function in the Small Intestines of Patients with Whipple's Disease**; INFECTION AND IMMUNITY 2010; 78:4589–4592

Gerhard E. Feurle, Verena Moos, Katina Schinnerling, Anika Geelhaar, Kristina Allers, Federico Biagi, Hendrik Bläker, Annette Moter, Christoph Loddenkemper, Andreas Jansen and Thomas Schneider. **The Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Whipple Disease**; ANNALS OF INTERNAL MEDICINE 2010;153:710-717

Katina Schinnerling, Verena Moos, Anika Geelhaar, Kristina Allers, Christoph Loddenkemper, Julian Friebel, Kristina Conrad, Anja A Kühl, Ulrike Erben, Thomas Schneider. **Regulatory T cells in patients with Whipple's disease**. JOURNAL OF IMMUNOLOGY 2011;187:4061-4067

Verena Moos, Gerhard E. Feurle, Katina Schinnerling, Anika Geelhaar, Julian Friebel, Kristina Allers, Annette Moter, Judith Kikhney, Christoph Loddenkemper, Anja A. Kühl, Ulrike Erben, Florence Fenollar, Didier Raoult, Thomas Schneider. **Immunopathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease**. JOURNAL OF IMMUNOLOGY 2013,190:2354-2361

### Eingereichte Manuskripte:

Anika Geelhaar-Karsch, Katina Schinnerling, Kristina Conrad, Julian Friebel, Kristina Allers, Thomas Schneider, Verena Moos. **Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens**. 2013 *eingereicht*

### Tagungsbeiträge:

Geelhaar, A., K. Schinnerling, V. Moos, K. Conrad, K. Allers, T. Schneider. **Monocytes and macrophages from Whipple's disease patients show an alternatively activated phenotype**. Posterbeitrag auf dem 2. Europäischen Kongress für Immunologie in Berlin (2009)

Geelhaar, A., K. Schinnerling, V. Moos, K. Conrad, K. Allers, T. Schneider. **Monocytes from Whipple's disease patients show an enhanced expression of IL-10**. Posterbeitrag auf dem „7th European Mucosal Immunology Group meeting“ (EMIG) 2010 in Amsterdam

Geelhaar, A., K. Schinnerling, V. Moos, K. Conrad, K. Allers, T. Schneider. **Monocytes from Whipple's disease patients differentiate preferentially to an alternatively activated phenotype**. Posterbeitrag auf der 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Leipzig (2010)

Geelhaar, A., K. Schinnerling, , K. Conrad, J. Friebel, K. Allers, T. Schneider, V. Moos. **Monocytes from untreated Whipple's disease patients show an alternatively and regulatory phenotype**. Posterbeitrag auf der 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Riccione/Italien (2011)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
3.1. MORBUS WHIPPLE.....	6
3.2. TROPHYRYMA WHIPPLEI .....	6
3.3. INFEKTIONEN MIT T. WHIPPLEI.....	7
3.4. DER EINFLUSS VON T. WHIPPLEI AUF DIE ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS.....	8
3.5. ÜBERLEBENSSTRATEGIEN INTRAZELLULÄRER BAKTERIEN .....	8
3.6. LYMPHOZYTEN .....	9
3.6.1. <i>Aktivierung von T-Zellen</i> .....	9
3.6.2. <i>Differenzierung von T-Zellen (Th1/Th2 Modell)</i> .....	9
3.6.3. <i>Induktion von B-Zellantworten</i> .....	10
3.7. HUMANE MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN .....	10
3.7.1. <i>Phänotyp von Monozyten/Makrophagen</i> .....	11
3.7.2. <i>Polarisierung</i> .....	11
3.7.2.1. <i>Klassisch aktivierte Makrophagen (M1)</i> .....	11
3.7.2.2. <i>Alternativ aktivierte Makrophagen (M2)</i> .....	12
3.7.3. <i>Funktionen von Monozyten und Makrophagen</i> .....	13
3.7.3.1. <i>Phagozytose</i> .....	13
3.7.3.2. <i>Antigenpräsentation</i> .....	14
3.7.3.3. <i>Stickstoff-Stoffwechsel</i> .....	15
3.7.3.4. <i>Produktion von Zytokinen und Chemokinen</i> .....	16
3.7.3.4.1. <i>IL-1<math>\beta</math> und IL-1ra</i> .....	17
3.7.3.4.2. <i>IL-6</i> .....	18
3.7.3.4.3. <i>IL-10</i> .....	18
3.7.3.4.4. <i>IL-17</i> .....	18
3.7.3.4.5. <i>TGF-<math>\beta</math></i> .....	19
3.7.3.4.6. <i>TNF<math>\alpha</math></i> .....	19
3.7.3.4.7. <i>CCL-2</i> .....	19
3.7.3.4.8. <i>CCL-3, CCL-4 und CXCL-9</i> .....	20
3.7.3.4.9. <i>CCL-18</i> .....	20
3.8. ZIELSETZUNG .....	20
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
4.1. MATERIAL .....	21
4.1.1. <i>Technische Geräte</i> .....	21
4.1.2. <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	21
4.1.3. <i>Chemikalien und Verbrauchsmittel</i> .....	22
4.1.3.1. <i>Chemikalien</i> .....	22
4.1.3.2. <i>Puffer und Medien</i> .....	24
4.1.3.3. <i>Kommerzielle Komplettsysteme</i> .....	24
4.1.3.4. <i>Zellstimulanzien</i> .....	25
4.1.3.4.1. <i>Antigene</i> .....	25
4.1.3.4.2. <i>Zytokine und Wachstumsfaktoren</i> .....	26
4.1.3.5. <i>Antikörper</i> .....	26
4.1.3.5.1. <i>Immunhistochemie</i> .....	26
4.1.3.5.2. <i>Durchflusszytometrie</i> .....	26
4.1.3.5.3. <i>Zellisolation</i> .....	28
4.1.3.6. <i>Patientendaten</i> .....	28
4.2. METHODEN .....	30
4.2.1. <i>Anzucht von T. whipplei Bakterien</i> .....	30
4.2.2. <i>Herstellung von T. whipplei Lysat</i> .....	30
4.2.3. <i>Herstellung gereinigter rekombinanter Fusionsproteine des Hsp70 von T. whipplei und E. coli mit der Glutathion-S-Transferase</i> .....	30
4.2.4. <i>Analytische Durchflusszytometrie</i> .....	31

4.2.5. Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Markern von Monozyten im Vollblut.....	34
4.2.6. Antigenstimulationen im Vollblut.....	35
4.2.6.1. Antigenstimulation der Lymphozyten im Vollblut.....	35
4.2.6.2. Antigenstimulation der Monozyten im Vollblut.....	35
4.2.7. Zellkultur.....	36
4.2.7.1. Zellseparation primärer mononukleärer Blutzellen (PBMC).....	36
4.2.7.2. Waschen der Zellen.....	37
4.2.7.3. Bestimmung der Lebendzellzahl.....	37
4.2.7.4. Einfrieren der Zellen.....	37
4.2.7.5. Lagerung der Zellen und Überstände.....	37
4.2.7.6. Auftauen der Zellen.....	38
4.2.7.7. Separation von Monozyten und Lymphozyten mit magnetischen Antikörpern (MACS).....	38
4.2.7.7.1. Prinzip der Zellseparation mit magnetischen Antikörpern.....	38
4.2.7.7.2. Ablauf der Separation von Monozyten und Lymphozyten.....	38
4.2.8. In vitro differenzierte Makrophagen.....	39
4.2.8.1. In vitro Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.....	39
4.2.8.2. Ablösen von in vitro differenzierten Makrophagen aus Kulturschalen.....	39
4.2.8.3. Analyse von Differenzierungsmarker bei in vitro differenzierten Makrophagen.....	40
4.2.8.4. Wechsel der Makrophagenpolarisierungen von in vitro differenzierten Makrophagen.....	41
4.2.8.5. Phagozytostest mit in vitro differenzierten M1 und M2 Makrophagen.....	42
4.2.8.6. Proliferationstest mit in vitro differenzierten Makrophagen.....	43
4.2.9. Aufarbeitung von humanen Biopsien aus dem Duodenum.....	45
4.2.9.1. Kurzzeitkultivierung von duodenalen Biopsien.....	45
4.2.10. Nitrit- und Harnstoff Nachweis.....	46
4.2.10.1. Kulturbedingungen für den Nachweis von Nitrit, Harnstoff und der Arginaseaktivität in in vitro differenzierten Makrophagen.....	46
4.2.10.2. Bestimmung des Proteingehalts in Makrophagenlysaten.....	47
4.2.10.3. Nitrit-Nachweis.....	48
4.2.10.4. Harnstoff-Nachweis.....	48
4.2.10.5. Bestimmung der Arginaseaktivität.....	49
4.2.10.6. Bestimmung der Arginaseaktivität im Plasma.....	49
4.2.11. Messung von Zytokinen, Chemokinen und Immunglobulinen in humanen Blutseren, Biopsie- und Kulturüberständen.....	50
4.2.11.1. Zytokinmessungen mit FlowCytomix Kit.....	50
4.2.11.2. Zytokinmessungen mit dem Cytometric Bead Array von BD.....	52
4.2.12. Immunhistochemische Färbungen.....	53
4.2.13. Software.....	54
4.2.14. Statistik.....	54
<b>5. ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
5.1. IFN $\gamma$ PRODUKTION VON AKTIVIERTEN CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN NACH ANTIGENSTIMULATION IM VOLLBLUT	56
5.2. BESTIMMUNGEN VON IMMUNGLOBULINEN IM SERUM UND BIOPSIE-ÜBERSTÄNDEN.....	57
5.3. CHARAKTERISIERUNG DER MONOZYTEN / MAKROPHAGEN EX VIVO.....	59
5.3.1. Phänotypisierung der Monozyten im Vollblut ex vivo.....	59
5.3.2. Nachweis intrazellulärer Zytokinproduktion von Monozyten nach Antigenstimulation.....	61
5.3.3. Phänotypisierung der Makrophagen im Duodenum.....	64
5.3.4. Harnstoff und Nitrit-Nachweis im Duodenum.....	67
5.3.5. Nachweis der Arginaseaktivität in Serumproben.....	68
5.3.6. Zytokinbestimmungen im Serum und Biopsie-Überständen.....	69
5.3.7. Bestimmungen von Chemokinen im Serum und Biopsie-Überständen.....	72
5.4. CHARAKTERISIERUNG VON IN VITRO DIFFERENZIERTEN MAKROPHAGEN.....	74
5.4.1. Phänotyp der in vitro differenzierten Makrophagen.....	74
5.4.2. Funktionelle Tests mit in vitro differenzierten Makrophagen.....	74
5.4.2.1. Phagozytose mit in vitro differenzierten M1 und M2 Makrophagen.....	74
5.4.2.2. Nitritproduktion und Arginaseaktivität in vitro generierter Makrophagen.....	76
5.4.2.3. Antigenpräsentation der in vitro differenzierten Makrophagen.....	77
5.4.2.4. Zytokinproduktion von in vitro differenzierten Makrophagen nach Stimulation mit <i>T. whipplei</i> ....	79
5.4.3. Wechsel der Makrophagenpolarisierung.....	80

---

<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>83</b>
6.1. SPEZIFISCHE IMMUNANTWORTEN VON MW-PATIENTEN .....	83
6.2. PHÄNOTYP DER MONOZYTEN IM VOLLBLUT .....	85
6.3. FUNKTIONALITÄT DER MONOZYTEN IM VOLLBLUT .....	86
6.4. PHÄNOTYP DER MAKROPHAGEN IM DUODENUM .....	88
6.5. FUNKTIONELLER NACHWEIS VON MAKROPHAGEN IM DUODENUM .....	89
6.6. ANALYSE DES ZYTOKIN- UND CHEMOKINMILIEUS IN DER PERIPHERIE UND IM DUODENUM .....	90
6.7. ANALYSE DER IN VITRO DIFFERENZIERTEN MAKROPHAGEN .....	91
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>106</b>
8.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	106
8.2. TABELLENVERZEICHNIS .....	107
8.3. DANKSAGUNG .....	108

## 1. Zusammenfassung

Morbus Whipple (M. Whipple) ist eine multisystemische Erkrankung, welche durch die chronische Infektion mit *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*) verursacht wird. Trotz des ubiquitären Vorkommens seines Erregers ist M. Whipple extrem selten. Dies scheint durch eine immunologische Prädisposition der M. Whipple Patienten begründet, die z.B. keine *T. whipplei* spezifische Th1 Antwort ausbilden können. Unklar dabei ist, ob antigenpräsentierende Zellen keine adäquate *T. whipplei*-spezifische T-Zellreaktivität induzieren können, oder ob eine mangelnde Erkennung der *T. whipplei*-Antigene für die reduzierte Antigen-spezifische Th1 Reaktivität verantwortlich ist. Besonders auffällig beim M. Whipple ist die massive Ansammlung von *T. whipplei* in Makrophagen der Lamina Propria des Duodenums, die offensichtlich die Persistenz des Erregers tolerieren.

Um mögliche Fehlfunktionen von Makrophagen aufzudecken, die für die Pathogenese des M. Whipple verantwortlich sein könnten, wurden in der vorliegenden Arbeit Monozyten und Makrophagen phänotypisch und funktionell *ex vivo*, *in situ* und *in vitro* untersucht und der Einfluss von *T. whipplei* und immunogener Proteine von *T. whipplei* auf die Makrophagendifferenzierung definiert. Dazu wurden Blut und Serumproben sowie duodenale Biopsien von M. Whipple Patienten und gesunden Kontrollen immunologisch charakterisiert.

Im Duodenum von M. Whipple Patienten konnten phänotypisch und funktionell alternativ aktivierte Makrophagen (M2 Makrophagen) nachgewiesen werden, die sich durch die Expression von IL-10 auszeichnen, dadurch Toleranz vermitteln und eine Th1 Polarisierung und die Entwicklung von klassisch aktivierten Makrophagen verhindern können. Eine erhöhte Anzahl CD163<sup>+</sup> Monozyten und die verringerte Expression von HLA-DR auf peripheren Blutmonozyten bei M. Whipple Patienten demonstrierten eine alternative Makrophagenaktivierung, die sich nicht nur lokal im Duodenum, sondern systemisch manifestiert. Funktionell äußerte sich dies in der Abwesenheit von spezifischen T-Zell Reaktionen und veränderter Immunglobulinsynthese bei M. Whipple Patienten. *T. whipplei* hsp70 wurde als immunogenes Protein definiert, beeinflusst aber die Makrophagendifferenzierung nicht. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Monozyten von M. Whipple Patienten nach einer Stimulation mit LPS oder *T. whipplei* eine verringerte Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  aufwiesen und verstärkt IL-10 produzierten. *In vitro* differenzierte Makrophagen von M. Whipple Patienten und gesunden Kontrollen waren vergleichbar und induzierten Antigen-spezifische T-Zell Reaktionen. Ein regulatorisches Zytokinmilieu in Serum und Duodenum verhindert offensichtlich die entzündliche Aktivierung der Makrophagen.

Insgesamt scheint es beim M. Whipple aufgrund eines regulatorischen Zytokinmilieus und daraus resultierenden defizienten antigenpräsentierenden Zellen zu einer mangelnden Immunaktivierung von Th1 Zellen zu kommen. M2 Makrophagen, die eine Th2 Antwort fördern, haben eine reduzierte Kapazität aufgenommenes Material zu verdauen. Ohne diesen Abbau der Bakterien in einzelne Peptide kann keine effektive Antigenpräsentation stattfinden. Somit kann eine effiziente Immunantwort nicht ausgelöst werden und *T. whipplei* persistiert ohne Antibiotikatherapie lebenslang im Körper.

## Summary

Whipple's disease is a chronic multisystemic infection caused by *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*). Despite the ubiquitous presence of the pathogen, Whipple's disease is very rare. Whipple's disease patients seem to be immunologically predisposed for the infection, since they are for example not able to induce a *T. whipplei*-specific Th1 response. However it is not known, if antigen presenting cells from Whipple's disease patients are able to induce an adequate *T. whipplei*-specific T cell reactivity or if deficient recognition of *T. whipplei* antigens by T cells is responsible for the reduced antigen-specific T cell reactivity. The pathophysiological hallmark of Whipple's disease is the massive accumulation of *T. whipplei* in macrophages of the lamina propria of the duodenum that tolerate the presence of the pathogen.

To elucidate dysfunction of macrophages that might trigger the pathogenesis of Whipple's disease, monocytes and macrophages were analysed *in situ*, *ex vivo*, and *in vitro* regarding their phenotype and functionality. Furthermore the influence of *T. whipplei* and immunogenetic proteins of *T. whipplei* on macrophage differentiation was defined. For that purpose, blood, serum, and duodenal specimens from Whipple's disease patients and healthy controls were analysed using immunohistochemical and immunological methods.

In duodenal biopsies from Whipple's disease patients phenotypically and functionally alternatively activated macrophages (M2 macrophages) were detected, which are characterized by an enhanced expression of IL-10. Thus, these macrophages can induce tolerance and weaken Th1 polarisation of T-cells and inhibit the development of classically activated macrophages (M1 macrophages). The enhanced numbers of CD163<sup>+</sup> monocytes and the reduced expression of HLA-DR on peripheral blood monocytes from Whipple's disease patients demonstrated that the alternative macrophage activation is not only a local phenomenon in the duodenum but can also be detected systemically. Functionally this manifested in the absence of specific T cell reactivity and altered production on immunoglobulins in Whipple's disease patients. *T. whipplei* hsp70 was defined as an immunogenic protein but was not able to influence macrophage differentiation. Furthermore it was shown in this work that monocytes from Whipple's disease patients exhibited a reduced production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  and an enhanced expression of IL-10 after stimulation with LPS or *T. whipplei*. *In vitro* macrophages of Whipple's disease patients and healthy controls differentiated similarly and were able to induce antigen-specific T cell reactions. A regulatory cytokine milieu in the serum and the duodenum seems to inhibit the inflammatory activation of macrophages.

Obviously, in Whipple's disease a regulatory cytokine milieu results in deficient antigen presenting cells that participate in the reduced immune activation of Th1 cells. M2 macrophages, which favour a Th2 response, have a reduced capacity to digest affiliated material. An efficient antigen presentation cannot occur without the proper processing of the bacterial components into single peptides. Therefore, the M2 macrophage polarisation in Whipple's disease patients and the weak induction of an efficient immune response favour the persistence of *T. whipplei*.

## 2. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivatorprotein-1 ( <i>activator protein-1</i> )
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
AT	Länderkürzel Österreich
<b>BD</b>	Becton Dickinson
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CAT</b>	Kationischer Aminosäuretransporter ( <i>cationic amino acid transporter</i> )
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	CD-Marker ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFDA-SE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFU	<i>colony forming units</i>
CH	Länderkürzel Schweiz
CLIP	<i>class-II-associated invariant chain peptide</i>
CTLA	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
<b>DE</b>	Länderkürzel Deutschland
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DK	Länderkürzel Dänemark
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DnaK	bakterielles Homolog zu hsp70
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocynat
FL	Fluoreszenzkanal
FR	Länderkürzel Frankreich
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>Forward Scatter</i> )
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GST	Glutathion-S-Transferase
<b>h</b>	Stunde
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozyten Antigen
hpf	Gesichtsfeld ( <i>high power field</i> )
hsp70	Hitzeschockprotein 70 ( <i>heat shock protein 70</i> )
hsp70Tw	Hitzeschockprotein 70 von <i>Tropheryma whipplei</i>
hsp70Ec	Hitzeschockprotein 70 von <i>Escherichia coli</i>
ICAM-1	<i>intrazelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule-1)</i>
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IL-1Ra	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	IL-1R <i>accessory protein</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in/ex vivo</i>	Im/außerhalb des lebenden Organismus
IRAK	IL-1R- <i>associated kinase</i>
ISPF	$\alpha$ -Isonitrosopropiophenon

JAK	Janus Tyrosin Kinasen
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kilo Dalton
LBP	Lipopolysaccharid-Bindeprotein
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
li	invariante Kette
LPS	Lipopolysaccharid
<b>M</b>	Molar
m	Milli
μ	Mikro
M1	klassisch aktivierte Makrophagen
M2	alternativ aktivierte Makrophagen
MACS	magnetische Zellseparation ( <i>Magnetic Cell Separation</i> )
MAPK	<i>mitogen-associated protein kinase</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC-Klasse I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I/II ( <i>major histocompatibility complex I/II</i> )
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Morbus Whipple
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
<b>n</b>	nano
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zellen	natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
n. s.	nicht signifikant
<b>p</b>	pico
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBMC	periphere mononucleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin + Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PFA	Paraformaldehyd
RDB	Reagenzverdünnungspuffer ( <i>Reagent-Diluent-Buffer</i> )
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
rh	<i>recombinat human</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
SEB	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B
SEM	Mittelwert des Standardfehlers ( <i>standard error of mean</i> )
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SR	Scavenger Rezeptor
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>Sideward Scatter</i> )
Stab-1	Stabilin-1
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Tab	Tabelle
TAP	<i>transporters of antigen-processing</i>
TBS	Trispuffer ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TGF	Gewebewachstumsfaktor ( <i>Tissue Growth Factor</i> )
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF-6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

<i>Tw</i>	<i>Tropheryma whipplei</i> -Lysat
<i>T. whipplei</i>	<i>Tropheryma whipplei</i>
Tyk2	Tyrosin Kinase 2
TZR	T-Zellrezeptor
UK	Länderkürzel Vereinigtes Königreich ( <i>United Kingdom</i> )
ü. N.	über Nacht
US	Länderkürzel Vereinigte Staaten von Amerika
v/v	Volumen pro Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )

### 3. Einleitung

#### 3.1. Morbus Whipple

Morbus Whipple (M. Whipple) wurde erstmals 1907 von Georg Hoyt Whipple beschrieben [1]. Es handelt sich um eine seltene multisystemische Infektionserkrankung, welche durch eine chronische Infektion mit dem Bakterium *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*) verursacht wird [2-4]. Gewichtsverlust, Diarrhö, Gelenksbeschwerden, Fieber, Lymphadenopathien, kardiale und zerebrale Symptome sind die Hauptmanifestationen des klassischen M. Whipple [5]. Ohne eine Behandlung mit Antibiotika verläuft diese Krankheit meist tödlich [3, 4]. Die Akkumulierung von *T. whipplei* in den Makrophagen der Lamina propria des Duodenums zeichnet die Pathogenese von M. Whipple aus.

#### 3.2. *Tropheryma whipplei*

*T. whipplei* ist ein gram-positives (gram<sup>+</sup>) Bakterium [6] und gehört in die Klasse der Aktinomyzeten [7] (Abb. 1). Der Erreger ist in der Umwelt weit verbreitet und zeichnet sich durch eine hohe genetische Heterogenität aus [8]. Durch molekularbiologische Methoden konnte der Erreger charakterisiert werden und kann inzwischen in Zellkultur sowie zellfrei kultiviert werden [9, 10]. Die kürzlich erfolgte Sequenzierung zeigte, dass es sich bei *T. whipplei* um ein Bakterium mit einem reduzierten Genom handelt [11], das für sein Überleben auf Wirtsorganismen angewiesen zu sein scheint und in Umweltproben nachgewiesen werden kann [8].



**Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. whipplei***  
(Quelle: <http://www.infoescola.com/doencas/doenca-de-whipple/>)

Das komplette Genom von *T. whipplei* und seine insgesamt ca. 800 Proteine sind seit wenigen Jahren bekannt [11]. Bis jetzt sind antigene Epitope noch nicht charakterisiert, jedoch haben erste Untersuchungen bereits für B-Zellen immundominante Proteine identifizieren können [12]. Die antigenen Proteine von *T. whipplei* ähneln den immunogenen Proteinen anderer Bakterien [13]: DnaK (Hsp70), sein Kofaktor DnaJ (Hsp40), GrpE und anorganische Phosphatreste treten offenbar auch bei einer Infektion mit *T. whipplei* mit dem Immunsystem des Wirtes in Kontakt und induzieren spezifische Immunglobuline. Morgenegg et al. analysierten bereits 2001 Seren von M. Whipple Patienten (MW-Patienten) und

gesunden Kontrollen auf die Anwesenheit spezifischer Immunglobuline gegen Hsp65 von *T. whipplei* [14]. Es stellte sich heraus, dass sowohl bei MW-Patienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen spezifische Immunglobuline gegen Hsp65 nachgewiesen werden können [14].

### 3.3. Infektionen mit *T. whipplei*

In duodenalen Biopsien, Stuhlproben und Speichel von gesunden Kontrollpersonen wurde die asymptomatische Trägerschaft von *T. whipplei* beschrieben [15, 16]. So zeigte z. B. eine Studie von Schöniger-Hekele et al., dass 25 % der untersuchten Klärwerksmitarbeiter einen positiven Nachweis von *T. whipplei* im Stuhl aufwiesen [16]. Bei asymptomatischen Trägerschaften zeigte sich, dass die humorale Immunantwort sogar stärker war als bei MW-Patienten [17]. Dies könnte eine Konsequenz der Makrophagenimmundefekte und der ineffizienten Bakterienbeseitigung bei MW-Patienten sein [7, 18]. Andere Studien zeigten, dass 1-10 % aller gesunden Kontrollpersonen in Europa einen positiven Nachweis für *T. whipplei* im Stuhl aufwiesen [16, 19]. Im Senegal konnte *T. whipplei* in 44 % aller Stuhlproben von Kindern im Alter von zwei bis zehn Jahren detektiert werden [20]. Da Kinder im Senegal schon im frühen Alter mit *T. whipplei* in Kontakt kommen, könnte *T. whipplei* für einige nicht genau diagnostizierten Infektionen (z. B. Gastroenteritis) in Afrika verantwortlich sein [20].

Raoult et al. konnten in einer Studie zeigen, dass *T. whipplei* bei französischen Kindern im Alter von zwei bis vier Jahren eine Gastroenteritis verursacht [21]. In 64 % aller positiven Nachweise wurde eine hohe Konzentration von *T. whipplei* ( $>10^4$ /g Stuhlprobe) gefunden [21]. Diese hohe Konzentration von Bakterien ist mit einer aktiven *T. whipplei* Replikation assoziiert [21]. Nachdem die Patienten sich von der Diarrhö erholt hatten, konnte *T. whipplei* nicht mehr im Stuhl nachgewiesen werden [21].

Eine seltene Sonderform des M. Whipple stellt eine Endokarditis, hervorgerufen durch *T. whipplei*, dar [3, 22]. Die Besonderheit besteht darin, dass keine *T. whipplei* Bakterien im Blut nachgewiesen werden können und auch andere Manifestationen von M. Whipple fehlen [23, 24]. Die durchschnittlich 60 Jahre alten Patienten leiden zusätzlich unter Arthralgie oder Arthritis, bevor die Diagnose Endokarditis gestellt wird [25]. Die Infektion verläuft langsam progressiv ähnlich wie eine durch *Coxiella burnetii*<sup>1</sup> verursachten Endokarditis [26]. Im Unterschied zum klassischen M. Whipple mit Befall der Herzklappen ist bei der Endokarditis der Erreger nicht in anderen Organen detektierbar [27, 28]. Da der Erregerstamm den

---

<sup>1</sup> Erreger des Q-Fiebers, gram negatives Bakterium

Verlauf der Infektion nicht beeinflusst, scheinen Wirtsfaktoren über Abwehr oder Chronifizierung der Infektion zu entscheiden [29].

Aufgrund der vorher genannten unterschiedlichen Infektionen mit *T. whipplei* könnten prädisponierende immunologische und immunogenetische Wirtsfaktoren bei MW-Patienten die Seltenheit der Erkrankung trotz des ubiquitären Vorkommens des Erregers erklären. Erste Hinweise auf die wichtige Rolle der Immungenetik sind durch HLA-Assoziationen gegeben [30]. Daher ist es denkbar, dass nicht initial die T-Zellen, sondern deren spezifische Aktivierung durch die Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gestört ist.

### 3.4. *Der Einfluss von T. whipplei auf die Zellen des Immunsystems*

Trotz des ubiquitären Vorkommens des Erregers [8, 16, 19] ist M. Whipple sehr selten und immunologische Wirtsfaktoren scheinen für eine Prädisposition verantwortlich zu sein. MW-Patienten zeigen im Vergleich zu gesunden asymptomatischen Überträgern verminderte periphere und mukosale T-Helfer 1 (Th1)-Antworten auf den Erreger *T. whipplei*, wobei andere Erreger offensichtlich normale Th1-Antworten induzierten [31, 32]. So wurden neben T-Zelldefekten bei MW-Patienten zahlreiche Entwicklungsstörungen des Monozyten/Makrophagen-Systems beobachtet. Zum einen können Monozyten und Makrophagen von MW-Patienten intrazelluläre Organismen schlechter abbauen [33, 34], zum anderen deutet eine verringerte Produktion von Interleukin (IL)-12 in Monozyten [35] und eine verringerte Konzentration von IL-12p40 im Serum auf eine eingeschränkte Makrophagenfunktion hin [35, 36]. Eine verminderte IL-12 Produktion führt zur verringerten Produktion von Interferon (IFN) $\gamma$  von T-Zellen [35] und somit zu einer unzureichenden Makrophagenaktivierung [7].

### 3.5. *Überlebensstrategien intrazellulärer Bakterien*

Makrophagen steuern sowohl unspezifische als auch spezifische Immunreaktionen und sind für die intrazelluläre Abtötung von Pathogenen sowie für die Antigenpräsentation verantwortlich. Die Fähigkeit zur Phagozytose und die Induktion des oxidativen Burstes sind als Mechanismen der angeborenen Abwehr besonders wichtig [37, 38]. Pathogene haben zahlreiche Strategien entwickelt, um diesen Angriffen zu entkommen. Dazu gehören die Blockade der Phagozytose, die Verhinderung der Phagosomlysosom-Fusion, das Entkommen aus dem Phagolysosomen, die Unterdrückung der Zytokinexpression, die Stimulation der IL-10 Sekretion und die Blockade des oxidativen Burstes [39, 40]. *T. whipplei* weist einen Tropismus für myeloide Zellen, z. B. Makrophagen auf, wobei es aber auch in anderen Zelltypen gefunden wurde. In Makrophagen überlebt *T. whipplei* die Phagozytose, repliziert innerhalb der Makrophagen und interagiert dabei mit dem angeborenen

Immunsystem [41]. In späten Endosomen überlebt *T. whipplei* und kann die Verschmelzung mit Lysosomen verhindern [42]. Immunmodulatorische Effekte von *T. whipplei* auf die IL-16 Produktion, der Phago lysosomenreifung und die Generierung eines protektiven Biofilms wurden bereits beschrieben [42-44].

### 3.6. Lymphozyten

#### 3.6.1. Aktivierung von T-Zellen

In den sekundär-lymphatischen Organen findet die T-Zell-Aktivierung statt. T-Zellen gelangen mit dem Blutstrom bzw. dem Lymphsystem in die T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe und werden über die Signale ihres T-Zellrezeptors (TZR) aktiviert. Dieses Signal kommt durch die Bindung eines spezifischen TZR an Peptide des Antigens, welche durch Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complex*, MHC) auf APZ präsentiert werden, zustande. Kostimulatorische Signale, für die Moleküle auf APZ und T-Zellen interagieren, sind für die funktionelle Aktivierung der T-Zellen notwendig. CD28 (*Cluster of differentiation*, CD) auf den T-Zellen ist ein positiv kostimulatorisches Molekül, definiert über die Fähigkeit, die Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit eines Signals über den TZR zu erhöhen [45]. CD28 bindet an CD80 und CD86 auf APZ und induziert somit die Proliferation und Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen [45]. *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4) auf den T-Zellen liefert dagegen ein negatives Signal an zuvor aktivierte T-Zellen und wird als Gegenspieler der CD28-vermittelten Kostimulation betrachtet [45]. Ohne diese kostimulatorischen Signale kommt es zur unvollständigen T-Zellaktivierung [46].

#### 3.6.2. Differenzierung von T-Zellen (*Th1/Th2 Modell*)

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, sind für die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Effektorzellen zwei Signale nötig. Erstens, die Bindung des TZR und zweitens, kostimulatorische Signale in der Anwesenheit spezifischer Zytokine, die durch Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden. IFN $\gamma$  und IL-12 initiieren die Differenzierung von Th1 Zellen, die durch eine hohe Produktion von IFN $\gamma$  charakterisiert und für die Beseitigung intrazellulärer Pathogene zuständig sind. Im Gegensatz dazu fördert IL-4 die Differenzierung zu Th2 Zellen. Diese sind wichtig für die Wirtsabwehr gegenüber extrazellulären Pathogenen und sie unterstützen B-Zellen in der Antikörperproduktion [47]. Dieses Th1/Th2 Paradigma in der T-Zelldifferenzierung wurde erstmals von Mosmann und Coffmann 1989 beschrieben und erklärte viele Phänomene in der erworbenen Immunantwort [48]. Inzwischen sind neben Th1/Th2 Zellen zahlreiche weitere Untergruppen beschrieben [49, 50].

### 3.6.3. Induktion von B-Zellantworten

B-Zellen sind für den humoralen Arm der spezifischen Immunabwehr, die Antikörperproduktion verantwortlich. Obwohl Antikörper allein keine Pathogene abtöten, können sie durch zahlreiche Funktionen die zelluläre Immunabwehr unterstützen [51]. Antikörper dienen der Neutralisation von Toxinen, aktivieren das Komplementsystem, opsonieren Bakterien für die Phagozytose und sorgen dafür, dass Tumorzellen und infizierte Zellen für eine Antikörper-abhängige Eliminierung durch Killerzellen markiert werden [51]. Es gibt verschiedene Klassen von Antikörpern, die in unterschiedlichen Regionen des Körpers dominieren. Das Immunglobulin (Ig) M z. B. ist hauptsächlich intravaskulär vorhanden, IgG ist Hauptantikörper im Blut und im Gewebe und IgA kommt vor allem in Sekreten vor [51]. Ein Antigen wird von membranständigem IgM auf der Oberfläche von B-Zellen erkannt, das in der frühen B-Zellentwicklung als B-Zellrezeptor dient, wird prozessiert und auf MHC-Klasse-II Molekülen den B-Zellen wieder präsentiert [51]. Nun kann das Antigen von spezifisch geprägten T-Zellen erkannt werden. T-Zellen wiederum produzieren Wachstumsfaktoren für B-Zellen, worauf sich die B-Zellen teilen und zu Antikörper-sekretierenden Plasmazellen heranreifen [51].

### 3.7. Humane Monozyten und Makrophagen

Ca. 10 % aller zirkulierenden Leukozyten im humanen System sind Monozyten [52]. Monozyten und Makrophagen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Über Monoblasten und Promonozyten entwickeln sich Monozyten. Die Wachstumsfaktoren *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) regen die Monozytopoese an [53, 54]. Nachdem die Zellen das Knochenmark verlassen haben, zirkulieren sie für ca. ein bis drei Tage im Blutstrom [55, 56]. Aus dem Blutstrom wandern die Monozyten in periphere Gewebe ein, wo sie zu Gewebemakrophagen oder Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) ausdifferenzieren [57, 58]. Entzündungen während einer Gewebeerletzung oder Infektion resultieren in der Produktion von Zytokinen, Chemokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren, welche die Monozytenfunktionen beeinflussen können. Diese verursachen eine Rekrutierung der Monozyten an den Ort der Entzündung und eine Differenzierung zu Makrophagen.

Makrophagen erfüllen eine Vielzahl von Funktionen und sind in allen Geweben zu finden. Sie sind in der Lage sowohl körpereigene als auch körperfremde Zellen, Partikel, Viren und Bakterien zu erkennen und zu vernichten. Durch die Sekretion unterschiedlicher Botenstoffe sind sie an der Steuerung des Immunsystems maßgeblich beteiligt.

### **3.7.1. Phänotyp von Monozyten/Makrophagen**

Humane Monozyten im Blut sind sehr heterogen, z. B. exprimieren bei gesunden Menschen 10 % aller Monozyten den Rezeptor CD16 (Fc $\gamma$ RIII) auf der Oberfläche [59], der u. a. für die Phagozytose von Pathogenen verantwortlich ist [57, 60]. Diese CD16<sup>+</sup> Zellpopulation ist bei Sepsis- und HIV-Patienten [61, 62] sowie anderen chronischen Erkrankungen erhöht [57, 62].

Monozyten und Makrophagen tragen auf ihrer Oberfläche den membrangebundenen Rezeptor CD14 [63, 64]. An diesen Rezeptor bindet ein Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und dem Lipopolysaccharid-Bindeprotein (LBP), welches sich gelöst im Serum befindet [65-68]. LPS ist Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Der membrangebundene Rezeptor CD14 verfügt nicht über eine transmembrane Domäne und kann somit keine intrazelluläre Signalkaskade auslösen [69]. In diesem Fall wird der Ko-Rezeptor TLR-4 (Toll-like Rezeptor-4) benötigt. Die Bindung des LPS-LBP-Komplexes an den CD14-TLR-4 Komplex führt zur Signaltransduktion [70] und damit zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) [65]. IL-1 und Glukokortikoide erhöhen die Expression des Mannoserezeptors CD206. Dies hat eine erhöhte Kapazität für Endozytose und Antigenpräsentation von Makrophagen zur Folge [71].

### **3.7.2. Polarisierung**

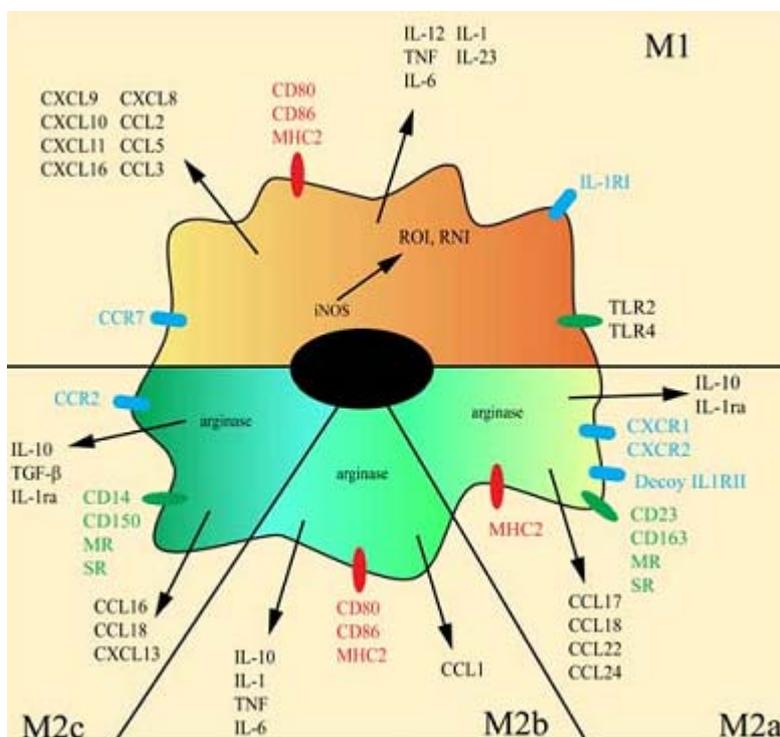
Die Aktivierung und die Funktion von Monozyten und Makrophagen werden durch verschiedene Zytokine beeinflusst. Ähnlich wie bei T-Zellen gibt es, abhängig vom jeweiligen Stimulus, verschiedene Subpopulationen von aktivierten Makrophagen. Makrophagen können in klassisch aktivierte (M1) und alternativ aktivierte (M2) Makrophagen unterteilt werden [55, 72], wobei sie abhängig vom Zytokinmilieu den Phänotyp wechseln können [53, 73-75].

#### **3.7.2.1. Klassisch aktivierte Makrophagen (M1)**

Klassisch aktivierte Makrophagen werden durch LPS oder pro-inflammatorische Zytokine z. B. IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  induziert [68] und exprimieren neben den MHC-Klasse-II Molekülen Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) [55, 68], die mit entsprechenden Rezeptoren auf den zu aktivierenden T-Zellen (CD28 und CTLA) interagieren. Als pro-inflammatorische Effektormakrophagen können M1 Makrophagen Pathogene eliminieren und sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , CCL-3) [53] sowie reaktive Sauerstoffspezien (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [76]. Eine exzessive M1 Polarisation kann aber auch zur Verletzungen im Gewebe führen.

### 3.7.2.2. Alternativ aktivierte Makrophagen (M2)

Th2 Zytokine wie z. B. IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*- $\beta$ ), induzieren ein alternatives Aktivierungsprogramm in Makrophagen [71, 72, 77]. M2 Makrophagen spielen eine wichtige Rolle beim Abklingen einer Entzündung, da sie anti-inflammatorische Mediatoren (IL-10 und TGF- $\beta$ ) produzieren. M2 Makrophagen werden in drei Untergruppen eingeteilt: M2a Makrophagen werden durch IL-4 oder IL-13 induziert; Immunkomplexe oder TLR Antagonisten induzieren den M2b Typ und M2c Makrophagen werden durch Glukokortikoide und IL-10 induziert [18]. M2 Makrophagen vermitteln Angiogenese, Gewebeerneuerungen und Gewebereparaturen [53, 78]. M1 und M2 Makrophagen unterscheiden sich sowohl funktionell als auch phänotypisch in der Expression von Rezeptoren, Zytokinen und Chemokinen [18] (Abb. 2).



**Abb. 2: Polarisierung von Makrophagen**

M1 Makrophagen werden durch LPS oder andere mikrobielle Produkte induziert. Sie sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffintermediate. M2 Makrophagen stellen ein Kontinuum funktioneller Stadien dar. M2a werden induziert durch IL-4/IL-13; M2b durch Immunkomplexe und TLR Antagonisten und M2c entstehen durch IL-10 und Glukokortikoide. Abb. aus: [18].

M2 Makrophagen (M2a/M2c) sind Immunmodulatoren und weniger effektiv in der Eliminierung von Pathogenen. Die Makrophagenaktivierung ist plastisch, schnell und vollständig reversibel. Dies legt nahe, dass Makrophagen zuerst an der Entstehung der Immunantwort und später an dessen Beseitigung beteiligt sind [73]. M2 Makrophagen zeigen eine erhöhte Expressionen des Mannoserezeptors CD206 [79], CD163 [71] und Stabilin-1 (Stab-1) [71, 80]. CD163 vermittelt die Endozytose von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen und schützt so vor Hämoglobin-induzierten oxidativen Gewebeschäden nach einer Hämolyse

[81]. Stab-1 ist ein Scavenger Rezeptor und internalisiert LDL (*Low Density Lipoprotein*) und SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) und vermittelt deren intrazellulären Transport zu den Endosomen [82]. Obwohl M2 Makrophagen eine höhere Phagozytosekapazität aufweisen als M1 Makrophagen, ist die Eliminierung von Pathogenen in diesen Makrophagen reduziert [71], da die Produktion von Sauerstoffradikalen und Nitritoxid (NO) für die effiziente Beseitigung von Pathogenen in M2 gegenüber M1 Makrophagen ebenfalls erniedrigt ist [71]. Die in 3.6.2 beschriebene Th1/Th2 Balance in den T-Zellen spiegelt sich auch in den M1/M2 Makrophagen wieder [83]. In Tab. 1 sind die wichtigsten Merkmale von M1 und M2 Makrophagen zusammengefasst, wobei die M2 Makrophagen einfachheitshalber nicht in die einzelnen Subgruppen unterteilt wurden.

**Tab. 1: Molekulares Repertoire von M1 versus M2 Makrophagen.** (modifiziert aus: [71])

	<b>M1 Makrophagen</b>	<b>M2 Makrophagen</b>
Zytokine	IL-1 $\beta$	IL-1ra
	IL-6	IL-10
	IL-12	
	TNF $\alpha$	
Chemokine	CCL-3	CCL-18
	CXCL-9 [60]	CCL-2 [84]
Immunrezeptoren	Fc $\gamma$ RI (CD64)	Fc $\epsilon$ RII (CD23)
	Fc $\gamma$ RII (CD32)	CD206
	Fc $\gamma$ RIII (CD16)	CD163
		Stab-1
anti-mikrobielle Moleküle	NO, iNOS, O $_2$	Arginase, Harnstoff

### **3.7.3. Funktionen von Monozyten und Makrophagen**

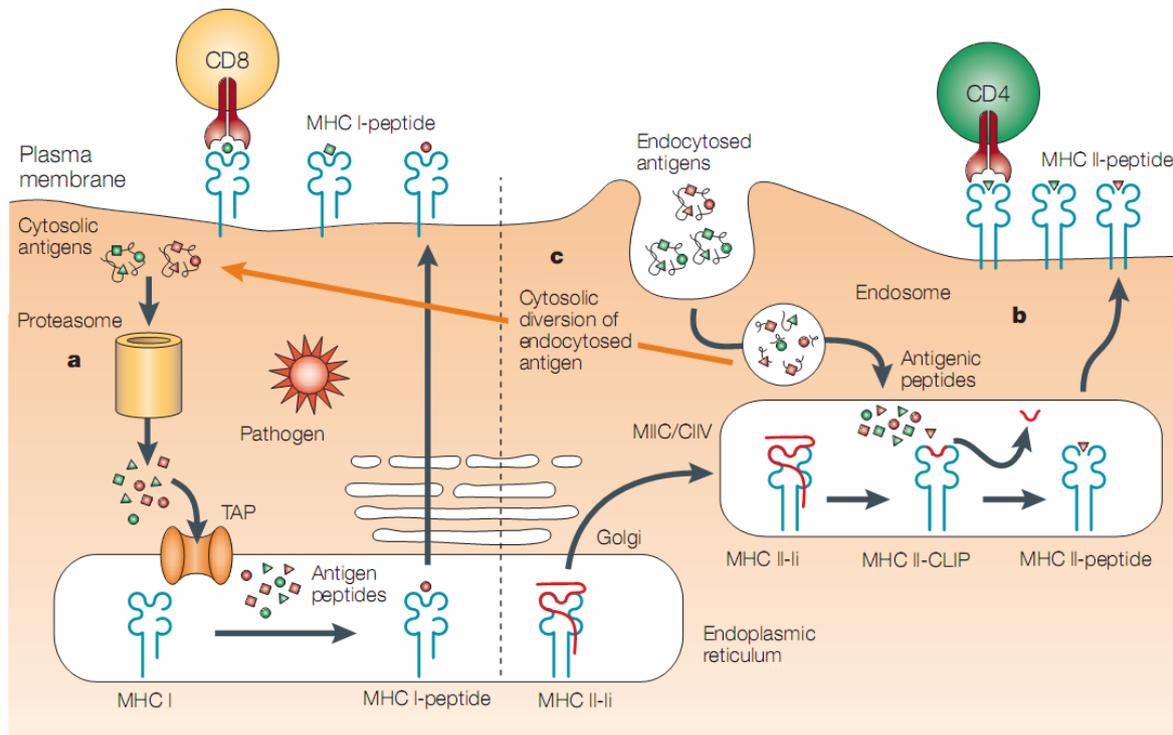
#### **3.7.3.1. Phagozytose**

Phagozytose ist die Aufnahme von Partikeln (Bakterien, Viren und autologe apoptotische Zellen), die entweder rezeptorunabhängig oder rezeptorabhängig stattfinden kann. An der rezeptorabhängigen Phagozytose sind verschiedene Moleküle beteiligt. Zum einen die Fc $\gamma$  Rezeptoren, die opsonierte Partikel erkennen und internalisieren. Zum anderen internalisieren Mannoserezeptoren und Scavenger Rezeptoren der Klasse A Partikel unabhängig von einer Opsonisierung [63]. Zu den phagozytierenden Zellen gehören DCs, Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten [63, 85, 86].

Die Phagozytosekapazität unterliegt einer strengen Regulation durch Zytokine. IL-10 erhöht die Phagozytose über Fc $\gamma$  und Komplementrezeptoren, IFN $\gamma$  hingegen inhibiert die Phagozytose von opsonierten und nicht-opsonierten Pathogenen [63]. CD14 spielt zum einen eine wichtige Rolle bei der Phagozytose gram<sup>+</sup> und gram<sup>-</sup> Bakterien und zum anderen in der Phagozytose von apoptotischen Zellen [63].

### 3.7.3.2. Antigenpräsentation

T-Zellen können Pathogene nicht direkt erkennen, daher müssen die Antigene von APZ präsentiert werden, um eine effiziente Reaktion zu induzieren. Monozyten, Makrophagen, DCs und B-Zellen gehören zu den professionellen APZ, da nur sie MHC-Klasse-II-Moleküle und kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Makrophagen und DCs können auf unterschiedlichen Wegen Antigene über MHC-Komplexe den T-Zellen präsentieren. Im klassischen Modell werden endogene Antigene in der Zelle durch Proteasomen in Peptide gespalten und durch *transporters of antigen-processing* (TAP) Moleküle in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort werden die Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen (Abb. 3.a) und aktivieren über diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Exogene Antigene können über Endozytose aufgenommen und den CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf MHC-Klasse-II-Komplexen präsentiert werden [87].



**Abb. 3: Die drei Wege der Antigenpräsentation**

a) Endogene Antigene werden im Proteasom in Peptide gespalten. Mittels TAP gelangen die Peptide in das ER und werden dort auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen, zur Zelloberfläche transportiert und den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. b) Um eine vorzeitige Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle zu verhindern, blockiert eine invariante Kette die Antigenbindungstasche. Im ER wird diese Kette gelöst und die Moleküle können mit Antigenen, die durch Endosomen aufgenommen wurden, beladen werden. Die MHC-Klasse-II-Komplexe werden zur Zelloberfläche transportiert und den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. c) Exogene Antigene können auch in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg eintreten. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. (Abkürzungen: MIIC = MHC-Klasse-II reiche Kompartimente; CIIV = MHC-Klasse-II-Vesikel). Abb. aus: [87].

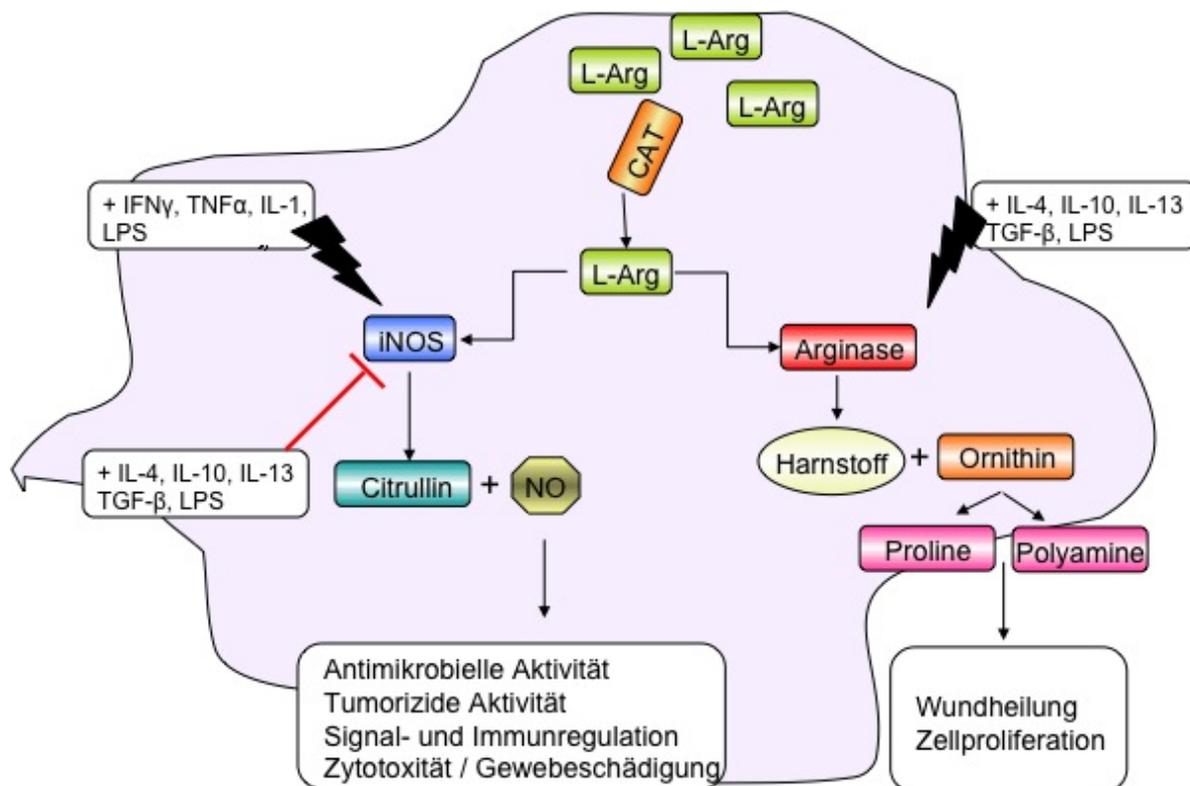
Während der Reifung der MHC-Klasse-II-Moleküle wird im ER mit Hilfe einer invarianten Kette (Ii) verhindert, dass zelleigene Peptide an neu entstehenden MHC-Klasse-II-Moleküle binden. Die MHC-Klasse-II-Ii-Komplexe werden dann als Trimere in die Endosomen

transportiert, durch Spaltung der li-Kette wieder gelöst und das CLIP-Fragment (*class-II-associated invariant chain peptide*) gebildet [87]. CLIP wird abgespalten und in der Peptidbindungstasche des MHC-Klasse-II-Moleküls kann sich ein antigenes Peptid anlagern, welches von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den TZR erkannt werden kann (Abb. 3.b).

### 3.7.3.3. Stickstoff-Stoffwechsel

Der Metabolismus der Aminosäure L-Arginin ist wesentlich beteiligt an zahlreichen Mechanismen der Immunregulation. L-Arginin wird in Gegenwart von Sauerstoff, verschiedenen Kofaktoren und durch das Enzym Nitritoxid Synthase (NOS) in das hoch reaktive und instabile NO und L-Citrullin umgewandelt [88]. Es gibt drei Isoformen von NOS: neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) [88]. Von den verschiedenen Enzymen wird nur iNOS stark in ihrem Expressionsgrad (z. B. durch IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  oder LPS in Makrophagen) reguliert [89, 90], während eNOS und nNOS konstitutiv exprimiert werden [88]. NO zerfällt weiter in Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [88] und NO ist ein wichtiges Effektormolekül in der antimikrobiellen und zytotoxischen Aktivität von Makrophagen gegen viele Mikroorganismen und Tumorzellen [88, 91]. Das Radikal NO ist sehr reaktiv und kann bei Überexpression neben den Zielzellen auch die körpereigenen Zellen schädigen [92, 93], daher unterliegt die Regulation der Synthese vielen positiven und negativen Elementen. Ein Mechanismus zur Inhibition der NO-Produktion besteht in der Limitierung der Argininverfügbarkeit durch eine Erhöhung der Arginaseaktivität [88, 94].

Bei Vertebraten existieren zwei Isoformen der Arginase, beide katalysieren die Umwandlung von Arginin zu Ornithin und Harnstoff und konkurrieren damit mit iNOS um das Substrat Arginin [95]. Sie unterscheiden sich in der subzellulären Lokalisation, Gewebeverteilung und enzymatischen Eigenschaften [96]. Die zytosolische Form Arginase-I wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und katalysiert den letzten Schritt der Harnstoffsynthese, wohingegen Arginase-II in Mitochondrien verschiedener Zelltypen vorkommt [96]. Makrophagen können sowohl Arginase-I [97, 98] als auch Arginase-II exprimieren [99]. Die Arginase-I wird durch Th2-Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  induziert [89, 98]. Th1-Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  haben dagegen einen hemmenden Effekt auf die Expression der Arginase-I [100, 101]. Die Regulation von Arginase-I durch die Th1- und Th2-Zytokine verhält sich umgekehrt zu der Regulation der iNOS, wobei Endotoxine (LPS) sowohl die Expression von iNOS als auch von Arginase induzieren können [94, 100]. Der Einfluss von iNOS und Arginase auf den L-Argininmetabolismus in der Zelle ist in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4: Einfluss von iNOS und Arginase auf den L-Argininmetabolismus**

Zytokine und bakterielle Bestandteile z. B. LPS regulieren die Aktivität von iNOS und Arginase. Die in der Graphik genannten positiven Stimuli beziehen sich hauptsächlich auf Arginase-I. Produkte des Arginase-metabolismus (Proline und Polyamine) wirken immunsupprimierend und können außerdem die Produktion von NO inhibieren [91]. L-Arg = L-Arginin. Abb. modifiziert nach [186]

Arginin wird durch kationische Aminosäuretransporter (CAT, *cationic amino acid transporter*), z. B. CAT1, CAT2a, CAT2b und CAT3, in die Zelle transportiert. In Makrophagen können CAT1 und CAT2a durch LPS und  $\text{IFN}\gamma$  hoch reguliert werden [91]. Die Konzentration von extrazellulärem Arginin wird durch Arginase reguliert, die ebenfalls in den extrazellulären Raum sezerniert werden kann [91].

### 3.7.3.4. Produktion von Zytokinen und Chemokinen

Monozyten und Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellen des Körpers, da sie weit über hundert sekretorische Faktoren (Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren, aggressive Sauerstoffradikale und Wachstumsfaktoren) produzieren. Mit Hilfe dieser Produkte beeinflussen Monozyten und Makrophagen eine Vielzahl immunologischer Prozesse. Dazu gehören die Förderung und Hemmung von Entzündungen, Beseitigung von Pathogenen und apoptotischen Zellen und die Produktion von Wachstumsfaktoren, die andere Zellen für die Differenzierung benötigen.

Zytokine und Chemokine sind kleine Peptide, die von Immunzellen produziert werden [102]. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen den Zellen, stimulieren die Proliferation antigen-

spezifischer Effektorzellen und vermitteln lokale und systemische Entzündungen in autokrinen, parakrinen und endokrinen Signalwegen [102].

Die Chemokine lassen sich in zwei große Gruppen einteilen: den CC-Chemokinen mit zwei benachbarten Cysteinen und den CXC-Chemokinen, in denen die zwei Cysteinreste durch eine andere Aminosäure getrennt sind. Monozyten und Makrophagen produzieren verschiedene Zytokine (IL-1, IL-6, IL-10 und IL-12) [92, 102-105] und Chemokine (CXCL-8, CCL-2 und CCL-18) [51, 106, 107] und exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CX<sub>3</sub>CR1 [108].

IL-12 verbindet die natürliche mit der angeborenen Immunantwort [109] und vermittelt indirekt eine effektive zellvermittelte Immunantwort durch die Induktion der IFN $\gamma$  Produktion durch T- und Natürliche Killer (NK-) Zellen [110]. Des Weiteren aktiviert IL-12 Makrophagen [111].

#### 3.7.3.4.1. IL-1 $\beta$ und IL-1ra

IL-1 $\beta$  wird als pro-IL-1 $\beta$  im Zytoplasma synthetisiert und durch Caspase-1 in das aktive IL-1 $\beta$  gespalten [104]. Pro-IL-1 $\beta$  (31 kDa) ist biologisch inaktiv und kann erst als reifes IL-1 $\beta$  (17 kDa) an Rezeptoren und aktivierte Zellen binden [104]. Nach der Bindung von IL-1 $\beta$  an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) bindet eine zweite Kette, genannt IL-1RAcP (*IL-1R accessory protein*), daran und zusammen bilden sie einen Komplex, der zur Zellaktivierung führt. Dieser Komplex rekrutiert intrazelluläre Adaptermoleküle u. a. MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), IRAK (*IL-1R-associated kinase*) und TRAF-6 (*TNF-receptor-associated factor 6*). Dies führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*), AP-1 (*activator protein-1*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 MAPK (*mitogen-associated protein kinase*) [104], die wiederum die Produktion anderer Zytokine anregen. Der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) kann nicht mit IL-1RAcP interagieren und bindet nur an den IL-1-Rezeptor, ohne die Zellen zu aktivieren. Daher fungiert IL-1ra als spezifischer Inhibitor von IL-1 $\beta$  [112]. Humane Monozyten können simultan IL-1 $\beta$  und IL-1ra produzieren [112]. IL-1 $\beta$  kann die IL-6 Produktion in Fibroblasten, Thymozyten und Monozyten induzieren [113] und zusammen aktivieren IL-1 $\beta$  und IL-6 Hepatozyten. Dadurch werden Akutphaseproteine gebildet (Collektine und Pentraxine). Diese aktivieren das Komplementsystem und opsonieren Pathogene für die Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten [85].

#### 3.7.3.4.2. IL-6

IL-6 ist ein pleiotropisches Zytokin [114] und ist mit einer M1 Polarisierung von Makrophagen assoziiert [18]. IL-6 wird von DCs, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen, Teilgruppen aktivierter T-Zellen, Tumorzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten produziert [47]. IL-6 bindet an zwei verschiedene Membranrezeptoren, IL-6R $\alpha$  und gp130 [105] und übt seine biologische Funktion hauptsächlich durch Janus Tyrosin Kinasen (JAK) und STAT (*signal transducers and activators of transcription*) Faktoren aus [92]. Eine Überexpression von IL-6 führt zu diversen Krankheiten, z. B. Rheumatoider Arthritis (RA), Morbus Castleman und Morbus Crohn [114]. IL-6 hat diverse Funktionen: a) Regulation von Immunantworten, Entzündungen und Hämatopoese; b) Induktion der T-Zellproliferation; c) Differenzierung zytotoxischer T-Zellen; d) terminale Makrophagendifferenzierung und Megakaryozytendifferenzierung [114].

#### 3.7.3.4.3. IL-10

IL-10 ist ein sehr effektives Th2 Zytokin [92] mit pleiotropischen Eigenschaften [115] und wird hauptsächlich von Makrophagen, DCs [92, 116], B- und T-Zellen produziert [110, 117]. In Makrophagen inhibiert IL-10 a) antimikrobielle Effektormechanismen; b) die Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80/CD86); c) die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [110]; d) MHC-II-Klasse Moleküle [117] und e) die Expression von CD54 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) [115]. IL-10 bindet an den IL-10R1/R2 Rezeptorkomplex und rekrutiert JAK1 und Tyk2 (Tyrosin Kinase 2), somit wird STAT3 phosphoryliert und aktiviert [118]. IL-10 blockiert die IL-12 Produktion und somit die Entstehung einer effektiven Th1-Antwort [110]. IL-10 inhibiert auch die Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF und schließlich auch IL-10 selbst von aktivierten Monozyten und Makrophagen [115]. Die Produktion von CCL-2, CCL-3, CCL-4, CXCL-8 und CXCL-10 wird ebenfalls von IL-10 inhibiert. Diese Chemokine sind wichtig für die Rekrutierung von Monozyten, DCs, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen an den Ort der Entzündung [115]. IL-10 deaktiviert nicht nur Monozyten sondern induziert auch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine [115] und vermittelt die Reifung von Monozyten [119]. TGF- $\beta$  induziert die IL-10 Produktion in APZ [115].

#### 3.7.3.4.4. IL-17

Die IL-17 Familie besteht aus den Zytokinen IL-17a, IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17e und IL-17f, die von verschiedenen Zelltypen gebildet werden [47]. IL-17f wird von Monozyten und Makrophagen sekretiert [120]. IL-17a besitzt pro-inflammatorische Fähigkeiten und ist in der mukosalen Immunabwehr involviert, wobei es die Expression von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8

und CXCL-10 in humanen Makrophagen induziert [47, 121, 122]. IL-17 induziert die Rekrutierung von Immunzellen zu peripheren Geweben, welche eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfordert [102, 123]. IL-17 sekretiert von aktivierten T-Zellen, Monozyten und Makrophagen könnte in der Induktion und Persistenz von mukosalen Entzündungsantworten bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD - *inflammatory bowel disease*) involviert sein [120].

#### 3.7.3.4.5. TGF- $\beta$

Es existieren fünf Isoformen von TGF- $\beta$ , aber bei Säugern werden nur drei Isoformen exprimiert und werden als TGF- $\beta$ 1-3 bezeichnet [124]. TGF- $\beta$  wird als Vorläuferprotein gebildet und bevor es sekretiert werden kann, wird es durch die intrazelluläre Endopeptidase Furin gespalten [124]. Dabei entstehen zwei Produkte, die sich zu Dimeren zusammenfinden [124]. TGF- $\beta$  wird konstitutiv von nicht-aktivierten Monozyten exprimiert [113] und hat starke immunsuppressive Effekte auf das Immunsystem [102]. TGF- $\beta$  kann autokrin und parakrin wirken und kontrolliert die Differenzierung, Proliferation und den Aktivierungsstatus von Immunzellen [124]. Die Th1 Zytokine IFN $\gamma$  und IL-12 können die TGF- $\beta$  Produktion und dessen Effekte beeinflussen, indem sie die Signalwege inhibieren oder die Genaktivität herunter regulieren [124].

#### 3.7.3.4.6. TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  wird initial als 26 kDa Transmembranprotein gebildet und durch Metalloproteinasen in seine aktive Form (17 kDa) gespalten [125]. Es gibt zwei Rezeptoren für TNF $\alpha$  (TNF-R): TNF-RI (p55) und TNF-RII [125]. Beide Rezeptoren sind ähnlich auf der Zelloberfläche verteilt, aber ihre biologische Aktivität ist unterschiedlich. Die meisten Zellen exprimieren beide TNF-R, wobei Lymphozyten und Monozyten hauptsächlich TNF-RII exprimieren. Endothelzellen und Fibroblasten exprimieren hauptsächlich TNF-RI [125].

#### 3.7.3.4.7. CCL-2

Fibroblasten, Endothelzellen, vaskuläre Muskelzellen, Monozyten und T-Zellen können CCL-2 sekretieren [103, 106]. CCL-2 ist ein Schlüsselfaktor für die Initiation der Entzündung und fördert die Chemotaxis und transendotheliale Migration von Monozyten über ihren Chemokinrezeptor CCR2 in entzündliches Gewebe [106]. CCL-2 reguliert die Expression von  $\beta$ 2-Integrinen auf Monozyten hoch, somit werden diese aktiviert und können besser an extrazellulären Matrixproteinen haften [106]. CCL-2 ist essentiell für Th2 Antworten und eine Überexpression von CCL-2 ist assoziiert mit Defekten in der zell-vermittelten Immunität [53].

#### 3.7.3.4.8. CCL-3, CCL-4 und CXCL-9

CCL-3 und CCL-4 sind inflammatorische Chemokine und werden von unterschiedlichen Zelltypen, u. a. Makrophagen, aktivierte NK-Zellen und T-Zellen, sekretiert [126]. Beide Chemokine nutzen CCR5 als Rezeptor, wobei CCL-3 auch an CCR1 binden kann [127]. Durch die Bindung der Chemokine an die Rezeptoren werden Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen an den Ort der Entzündung geleitet [128, 129]. Die CCL-3 Produktion kann durch IL-4, IL-10, IL-13 und Glukokortikoide inhibiert werden [107].

Das durch IFN $\gamma$  induzierbare, pro-inflammatorischen Chemokin CXCL-9 wird von Monozyten, Makrophagen und Tumorzellen produziert und lockt über den Rezeptor CXCR3 Th1 Zellen an den Ort der Entzündung [130-132]. Die Menge an CXCL-9 korreliert mit dem Entzündungsgrad, so z. B. bei der chronischen Chagas-Kardiomyopathie, welche durch das Bakterium *Trypanosoma cruzi* verursacht wird [133].

#### 3.7.3.4.9. CCL-18

CCL-18 wird von Monozyten, Makrophagen und DCs exprimiert [107], wobei Monozyten und Makrophagen konstitutiv nur geringe Mengen an CCL-18 exprimieren [107]. Die Produktion von CCL-18 kann aber durch LPS oder andere mikrobielle Komponenten (Peptidoglycan und CD40L) gesteigert werden [107]. Die CCL-18 Induktion benötigt die M2 Aktivierung der Monozyten und Makrophagen durch die Th2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 [107].

### 3.8. Zielsetzung

Es ist bereits bekannt, dass einige Bakterien Strategien entwickelt haben, um die Makrophagenaktivierung und Wirtsabwehr beeinflussen zu können [18]. Der M. Whipple ist trotz des ubiquitären Vorkommens seines Erregers extrem selten. Da *T. whipplei* massiv in den Makrophagen im Duodenum akkumuliert, liegt der Verdacht nahe, dass die Makrophagenaktivierung bei M. Whipple Patienten eingeschränkt sein könnte. Unklar ist immer noch, wie bei M. Whipple Patienten Makrophagen mit dem Erreger interagieren und ob, wie oben erwähnt, die APZ wie Makrophagen und DCs, überhaupt in der Lage sind, eine adäquate *T. whipplei*-spezifische T-Zellreaktivität zu induzieren, oder ob eine mangelnde Erkennung der *T. whipplei*-Antigene für die reduzierte Antigen-spezifische Th1 Reaktivität verantwortlich ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Mechanismen, die für die fehlende *T. whipplei*-spezifische Reaktivität der Patienten verantwortlich sind, weiter einzugrenzen. Daher sollten in diesem Projekt einerseits Monozyten und Makrophagen *ex vivo* charakterisiert werden, der Einfluss von *T. whipplei* auf *in vitro* differenzierte Makrophagen von gesunden Kontrollen und M. Whipple Patienten untersucht und immunogene Strukturen von *T. whipplei* definiert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Technische Geräte

Brutschrank	BB15 function line, Heraeus, Hanau, DE
Brutschrank, 80 % O <sub>2</sub>	BBD 6220, Heraeus, Hanau, DE
Dampfdruckkochtopf	WMF Easy Transtherm, DE
ELISA-Reader	VersaMax microplate reader, Molecular Devices, Chicago, US
FACS Calibur	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, DE
Gefrierschränke	-20 °C, -80 °C, Thermoscientific u. Herasafe, DE
Kühlschrank	Bosch, DE
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, DE
Magnetrührer	RCT basic safety control, IKA, US
Microprocessor pH-Meter	pH21, Hanna instruments, DE
Mikrowelle	Privileg 8523G, DE
Schüttler	KM-2 AKKU, Edmund Bühler, Hechingen, DE
Sterilbank	Herasafe, Heraeus, Hanau, DE
Stickstofftank Locator 6plus	Thermolyne, US
Vakuumpumpe	Manifold, PALL Livescience, US
Waagen	Scout Pro SPU 202, Ohaus Corporation, NJ, US Ohaus, Nänikon, CH
Wasserbad	Julabo TW8, Seelbach, DE
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Megafuge 1.0, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, DE

#### 4.1.2. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21 x 26 mm und 24 x 50 mm, Roth, Karlsruhe, DE
Einfrierröhrchen	1 ml, NUNC, DK
Einfrigerkisten	Nalgene, DE
Einwegpinzetten	Unomedical, DK
Einwegpipetten	5, 10 und 25 ml, BD, Heidelberg, DE
Fettstift	Linaris, Wertheim, DE
Filterplatte	96-Kavitäten, Bender Medsystems, Wien, AT
konische Röhrchen	15 ml, 50 ml, BD, Heidelberg, DE

Leucosep-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
LS-Säule	Miltenyi Biotec, Gladbach, DE
Multi-Kanal-Pipette	100 µl, Eppendorf, Hamburg, DE
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Objektträger	Langenbrück, Emmerdingen, DE
Parafilm	VWR, Illinois, US
Pipetten	5, 10 und 25 ml, BD, Heidelberg, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäße	1500 µl, 500 µl, Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe, DE
Rundbodenröhrchen	BD, Heidelberg, DE
Trucountröhrchen	BD, Heidelberg, DE
Vacutainerröhrchen	heparinbeschichtet, 10 ml, BD, Heidelberg, DE
Zählkammer	HYCOR Biomedical, Kassel, DE
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 48- und 96-Kavitätenplatten, NUNC, DK

### **4.1.3. Chemikalien und Verbrauchsmittel**

#### **4.1.3.1. Chemikalien**

Amphotericin B	PAA, Cölbe, DE
Antikörperverdünnungspuffer	DakoCytomation, Hamburg, DE
Beriglobin	Sigma, München, DE
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Darmstadt, DE
Brefeldin A	Sigma, München, DE
BSA	Sigma, München, DE
CFDA	Invitrogen, Darmstadt, DE
destilliertes Wasser	Ampuwa, Fresenius, DE
Dextran-FITC Partikel	Invitrogen, Darmstadt, DE
DMSO	Sigma, München, DE
EDTA	Sigma, München, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Baker, NJ, US
FKS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Ficoll-Hypaque (Natriumdiatrizoat)	GE Healthcare, München, DE
Hämatoxilin	Dako, Hamburg, DE
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, DE

---

Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, DE
L-Arginin	Roth, Karlsruhe, DE
L-Isonitrosopropiophenone	Sigma, München, DE
Lysepuffer für Durchflusszytometrie	BD, Heidelberg, DE
Manganchlorid ( $MnCl_2$ )	Sigma, München, DE
NADPH	Sigma, München, DE
Naphtyl-Ethylendiamin dihydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid ( $NaCl$ )	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumnitrit ( $NaNO_2$ )	Sigma, München, DE
Nitratreduktase	Sigma, München, DE
PBS	PAA, Pasching, AT
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin, DE
PFA	Sigma, München, DE
Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ )	Sigma, München, DE
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, DE
Salzsäure ( $HCl$ )	Roth, Karlsruhe, DE
Saponin	Sigma, München, DE
Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ )	Sigma, München, DE
Sulfanilamid	Sigma, München, DE
Transferrin-FITC Partikel	Invitrogen, Darmstadt, DE
Tris-HCl	Sigma, München, DE
Triton X-100	Sigma, München, DE
Trypanblau	Sigma, München, DE
Tween20	Dako, Hamburg, DE
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt, DE
Xylol (Isomere)	Roth, Karlsruhe, DE
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe, DE

### 4.1.3.2. Puffer und Medien

Tab. 2: Zusammensetzung von Puffern und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-Medium	DMEM, 4,5 g/l Glukose; 25 mM Hepes; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 1x MEM Aminosäuren; 10 % (v/v) FKS
Einfriermedium	FKS, 10 % DMSO
Erylysepuffer	20 mM KHCO <sub>3</sub> ; 310 mM NH <sub>4</sub> Cl; 1 mM EDTA ; destilliertes Wasser
Griess Reagenz	1 % Sulfanilamid; 0,1 % Naphtyl-Ethylendiamindihydrochlorid; 2 % Phosphorsäure; destilliertes Wasser
LPL-Medium	RPMI 1640; 25 mM Hepes; 4 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) Pen/Strep, 250 µg/ml Amphotericin B, 50 mM β-Mercaptoethanol
MACS-Puffer	90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 30 % (w/v) BSA; 1mM EDTA (v/v)
PBA (PBS + BSA + Natriumazid)	90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 % (w/v) BSA; 0,02 % (v/v) NaN <sub>3</sub>
PBS, pH 7,6	90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/ BSA	90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 % (w/v) BSA
TBS, pH 7,5	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl
TBS/ Tween	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl + 0,05 % Tween 20
Zellkulturmedium R10	RPMI 1640; 25 mM Hepes; 4 mM L-Glutamin; 10 % (v/v) FKS; 1 % (v/v) Pen/Strep
Zitratpuffer, pH 6	10 mM Zitronensäure; 10 mM NaOH; destilliertes Wasser

### 4.1.3.3. Kommerzielle Komplettsysteme

Tab. 3: Kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller
CBA flex set	BD, Heidelberg, DE
Flow Cytomix	Bendermed Systems, AT
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn, DE
Dako REAL™ Detektionssystem Alkaline Phosphatase/Rot	Dako, Hamburg, DE
Streptavidin/Biotin Blockierungskit	Vector, Biozol, Eching, DE

#### 4.1.3.4. Zellstimulanzien

In den einzelnen Experimenten wurden die Zellstimulanzien wie in den folgenden Tabellen beschrieben eingesetzt. Abweichungen wurden im weiteren Text gesondert gekennzeichnet.

##### 4.1.3.4.1. Antigene

Tab. 4: Verwendete Antigene

Antigen	Peptide/ Spezifität	Konzentration	Hersteller
CD28	Maus IgG1	2 µg/ml	BD, Heidelberg, DE
CD49	Maus IgG1	2 µg/ml	BD, Heidelberg, DE
GST		26 µg/ml	Herstellung durch Arbeitsgruppe Dr. A.Kühl / Dr. U.Erben, Berlin, DE
Hsp70Ec	DnaK von <i>E. coli</i>	33 µg/ml	Herstellung durch Arbeitsgruppe Dr. A.Kühl / Dr. U.Erben, Berlin, DE
Hsp70Tw	DnaK von <i>T. whipplei</i>	80 µg/ml	Herstellung durch Arbeitsgruppe Dr. A.Kühl / Dr. U.Erben, Berlin, DE
Humanes Cytomegalivirus (hCMV)	Polypeptid 65 (pp65), AD169	1,5 µg/ml	DUNN, Ansbach, DE
Lipopolysaccharide (LPS)	<i>E. coli</i> , L2630	5 µg/ml	Sigma, München, DE
Tetanus Toxoid		100 µg/ml	Chiron Behring, Marburg, DE
Tuberkulin	PPD RT 23 SSI	6 U/ml	Chiron Behring, Marburg, DE
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	von <i>Staphylococcus aureus</i>	2 µg/ml	Sigma, München, DE
<i>T. whipplei</i> Twist- MarseilleTM	Gesamt-Lysat	1 x 10 <sup>7</sup> CFU/ml	ATCC Nummer CCL- 171; Prof. Dr. Raoult, Marseille, FR

4.1.3.4.2. Zytokine und Wachstumsfaktoren

Tab. 5: Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokin	Quelle	Konzentration	Hersteller
rh GM-CSF	<i>S. cerevisiae</i>	1000 U/ml	Bayer, Leverkusen, DE
rh M-CSF	<i>E. coli</i>	10 ng/ml	Peptotech, Hamburg, DE
rh IFN $\gamma$	<i>E. coli</i>	200 U/ml	R&D systems, Wiesbaden, DE
rh IL-4	<i>E. coli</i>	10 ng/ml	R&D systems, Wiesbaden, DE
rh IL-10	<i>E. coli</i>	10 ng/ml	Peptotech, Hamburg, DE
rh TNF $\alpha$	<i>E. coli</i>	500 U/ml	R&D systems, Wiesbaden, DE

4.1.3.5. **Antikörper**4.1.3.5.1. Immunhistochemie

Tab. 6: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie

Spezifität des primären Antikörper	Klon	Hersteller	Spezifität des sekundären Antikörper	Hersteller
Maus-anti human CD68	PG-M1	Dako, Hamburg, DE	Esel-anti-Maus IgG (biotinyliert)	
Maus-anti human CD163	10D6	Novocastra, Wetzlar, DE	Esel-anti-Maus IgG (biotinyliert)	Jackson
Kaninchen-anti human IL-10	500-P20	Peptotech, Hamburg, DE	Esel-anti-Kaninchen IgG (biotinyliert)	Immuno Research,
Ziege-anti human IL-17	AF317NA	R&D systems, Wiesbaden, DE	Esel-anti-Ziege-IgG (biotinyliert)	Suffolk, UK
Kaninchen-anti human iNOS	polyklonal	abcam, Cambridge, UK	Esel-anti-Kaninchen IgG (biotinyliert)	
Kaninchen-anti human Stab-1	HPA005434	Sigma, München, DE	Esel-anti-Kaninchen IgG (biotinyliert)	

**Enzymkonjugat:** Streptavidin Alkalische Phosphatase (*streptomyces avidinii*)  
Sigma, München, DE

**Substrat:** Fast Red, DAKO, Hamburg, DE

4.1.3.5.2. Durchflusszytometrie

Für den durchflusszytometrischen Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Markern wurden folgende monoklonale Antikörper, die direkt mit Fluorochromen konjugiert waren, verwendet (Tab. 7).

Tab. 7: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie

Spezifität	Isotyp	Konjugation	Verdünnung	Klon	Herkunft	Hersteller
CCL-18	IgG1	APC	1:20	64507	Maus	R&D systems, Wiesbaden, DE
CD3	IgG1	PerCp	1:50	SK7	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD4	IgG1	PE	1:50	MT310	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD11b	IgG1	PE	1:20	2LPM19c	Maus	DakoCytomation, Hamburg, DE
CD11c	IgG2b	APC	1:20	S-HCL-3	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD14	IgG2a	PerCpCy5.5	1:50	M5E2	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD16	IgG1	FITC	1:20	3G8	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD16	IgM	APC	1:20	VEP13	Maus	Miltenyi Biotec, Gladbach, DE
CD40	IgG1	PE	1:10	MAB89	Maus	Beckman Coulter, Krefeld, DE
CD40L	IgG1	FITC	1:20	TRAP1	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD64	IgG1	PE	1:10	10.1	Maus	DakoCytomation, Hamburg, DE
CD68	IgG1	FITC	1:20	KiM7	Maus	AbD Serotec, Düsseldorf, DE
CD71	IgG1	Alexa647	1:20	DF1513	Maus	AbD Serotec, Düsseldorf, DE
CD80	IgG1	APC	1:10	MEM-233	Maus	Biozol, Eching, DE
CD86	IgG1	APC	1:10	2331	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD163	IgG1	PE	1:10	GHI/61	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD206	IgG1	APC	1:20	19.2	Maus	BD, Heidelberg, DE
HLA-DR	IgG1	PE	1:10	Immu357	Maus	Beckman Coulter, Krefeld, DE
HLADR	IgG2a	PerCpCy5.5	1:20	L243	Maus	BD, Heidelberg, DE
HLA-DR	IgG2a	APC	1:20	G46-6	Maus	BD, Heidelberg, DE
Integrin- β7	IgG2a	PE	1:10	FIB504	Ratte	BD, Heidelberg, DE
IFN <sub>γ</sub>	IgG1	APC	1:100	B27	Maus	BD, Heidelberg, DE
IL-1β	IgG1	FITC	1:10	AS10	Maus	BD, Heidelberg, DE
IL-1ra	IgG1	PE	1:10	AS17	Maus	BD, Heidelberg, DE
IL-6	IgG2a	FITC	1:20	MQ2-6A3	Ratte	BD, Heidelberg, DE
IL-10	IgG2a	APC	1:20	JES3- 19F1	Ratte	BD, Heidelberg, DE
TNF <sub>α</sub>	IgG1	PE	1:200	Mab11	Maus	BD, Heidelberg, DE
25F9 <sup>2</sup>	IgG1	unkonjugiert	1:20	eBio25F9	Maus	eBioscience, Frankfurt/ aM, DE

<sup>2</sup> Sekundärantikörper: rabbit anti Maus IgG-RPE (AbD Serotec, Düsseldorf, DE)

Spezifität	Isotyp	Konjugation	Verdünnung	Klon	Herkunft	Hersteller
Isotyp-kontrollen	IgG1	APC	1:100	MOPC-21	Maus	BD, Heidelberg, DE
	IgG1	PE	1:50	MOPC-21	Maus	BD, Heidelberg, DE
	IgG1	PerCpCy5.5	1:50	X40	Maus	BD, Heidelberg, DE
	IgG2a	PE	1:10	R35-95	Ratte	BD, Heidelberg, DE
Sekundärantikörper	IgG	RPE	1:20	polyklonal	Kaninchen	AbD Serotec, Düsseldorf, DE

#### 4.1.3.5.3. Zellisolation

Folgende Antikörper wurden für die magnetische Separation von Monozyten und Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet (Tab. 8).

**Tab. 8: Verwendete Antikörper zur magnetischen Zellisolation**

Spezifität	Isotyp	Herkunft	Hersteller
CD14	IgG2a	Maus	Miltenyi Biotec, Gladbach, DE
HLA-DR	IgG1	Maus	Miltenyi Biotec, Gladbach, DE

#### 4.1.3.6. **Patientendaten**

Die Diagnose des M. Whipple wurde in der Regel anhand PAS (*periodic acid-schiff*) positiver Zellen und einer *T. whipplei* spezifischen PCR aus duodenalen Proben gestellt. In Einzelfällen erfolgte die Diagnose aus Gelenken, dem Zentralen Nervensystem oder aus Lymphknoten. Im Rahmen eines von der EU geförderten Projektes standen nach schriftlichem Einverständnis für diese Arbeit von 104 M. Whipple Patienten Proben zur Verfügung (Tab. 9). Diese werden im Nachfolgenden „MW-Patienten“ genannt. Die Behandlung des M. Whipple erfolgte in der Regel initial mit einer zweiwöchigen intravenösen Therapie mit Ceftriaxon oder Meropenem, gefolgt von einer oralen Gabe von Cotrimoxazol für drei oder zwölf Monate. Einzelne Patienten erhielten eine alleinige Zugabe von Doxycyclin oder in Kombination mit Hydroxychloroquin für zwölf Monate. Sobald sich eine klinische Besserung der Symptome einstellte, wurden die Patienten in die Gruppe „behandelt“ eingeordnet. In der Regel erfolgte dies drei Monate nach Therapiebeginn. Des Weiteren wurde heparinisiertes Vollblut von 53 gesunden Kontrollen verwendet und von 43 gesunden Kontrollen Überstände kultivierter Biopsien genutzt. Diese Patientenproben werden im Nachfolgenden „gesunde Kontrollen“ genannt. Für duodenale Proben wurden auch 51 Patienten rekrutiert, die sich aufgrund von Verdacht bzw. bei der Kontrolle von Magengeschwüren einer Gastroskopie unterzogen. Diese Proben wiesen keine makroskopischen und histologischen Auffälligkeiten im Duodenum auf. Diese Patientenproben werden im Nachfolgenden „Kontrollen ohne Darmsymptomatik“ genannt.

Tab. 9: Patientenübersicht der verwendeten Proben

	<b>MW-Patienten</b>	<b>gesunde Kontrollen</b>	<b>Kontrollen ohne Darmsymptomatik</b>
<b>Proben gesamt</b>	Proben von 104 Patienten (17w, 87m, 57,2 Jahre (35-83)) 51 Patienten vor und nach Therapie 29 unbehandelte Patienten 24 behandelte Patienten	Proben von 150 gesunden Kontrollen (51w, 99m, 40,9 Jahre (20-90))	Proben von 51 Kontrollen (19w, 32m, 52,4 Jahre (17-82))
<b>Blut</b>			
Serumproben	Proben von 51 Patienten (6w, 45m, 57,7 Jahre (35-86)) 31 Patienten vor und nach Therapie 10 unbehandelte Patienten 10 behandelte Patienten	Proben von 70 gesunden Kontrollen (32w, 38m, 42,7 Jahre (20-90))	Proben von 11 Kontrollen (5w, 6m, 51,4 Jahre (32-75))
Heparinisiertes Blut	Proben von 47 Patienten (7w, 40m, 61,3 Jahre (41-77)) 13 Patienten vor und nach Therapie 23 unbehandelte Patienten 37 behandelte Patienten	Proben von 53 gesunden Kontrollen (28w, 25m, 46,2 Jahre (22-84))	
<b>Biopsien aus Duodenum</b>			
Biopsien für Zytokinmessungen	Proben von 34 Patienten (2w, 32m, 55,4 Jahre (40-74)) 5 Patienten vor und nach Therapie 9 unbehandelte Patienten 20 behandelte Patienten	Proben von 43 gesunden Kontrollen (0w, 43m, 30,9 Jahre (22-48))	Proben von 16 Kontrollen (5w, 11m, 50 Jahre (21-75))
Biopsien für Immunhistochemie	Proben von 23 Patienten (2w, 21m, 56,8 Jahre (43-75)) 22 Patienten vor und nach Therapie 1 unbehandelte Patienten		Proben von 15 Kontrollen (7w, 8m, 45,3 Jahre (17-82))
Biopsien für funktionelle Tests	Proben von 32 Patienten (4w, 28m, 48,5 Jahre (39-77)) 5 Patienten vor und nach Therapie 6 unbehandelte Patienten 21 behandelte Patienten		Proben von 29 Kontrollen (13w, 16m, 55,8 Jahre (21-82))

(w=weiblich, m= männlich), angegeben ist das Durchschnittsalter

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Anzucht von *T. whipplei* Bakterien

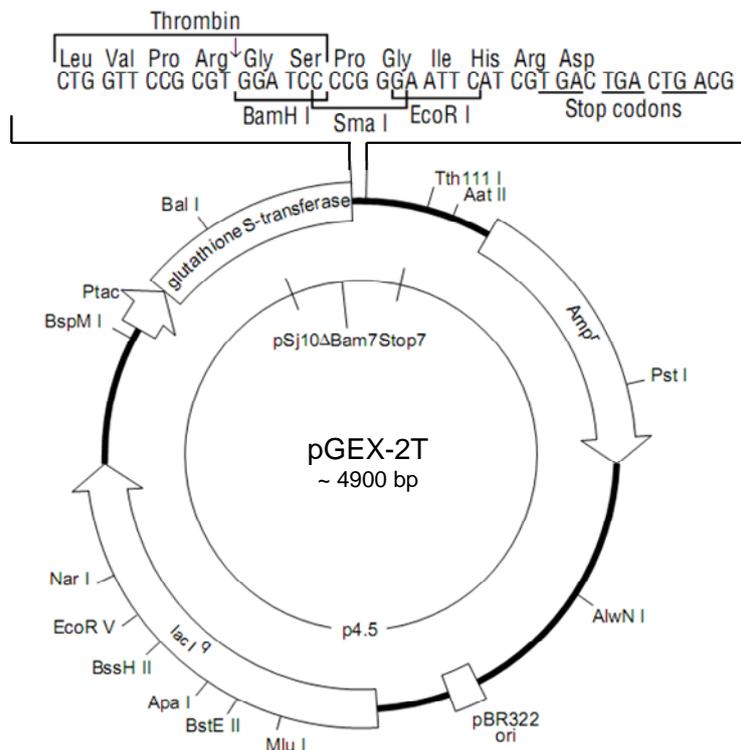
Seit 2003 ist es möglich, *T. whipplei* Bakterien zellfrei im Labor anzuzüchten [10]. Die für diese Arbeit verwendeten Bakterien wurden im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité in Berlin angezüchtet. *T. whipplei* Bakterien vom Stamm Twist-Marseille™ (CNCM I-2202) wurden in Zellkulturflaschen in DMEM-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. *T. whipplei* repliziert sich im Vergleich zu anderen Bakterien sehr langsam. Ein Replikationszyklus dauert ca. 28 Stunden [10]. Nach 20–40 Tagen wurden die Bakterien aus den Zellkulturflaschen entnommen, in 50 ml Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 4.2.2. Herstellung von *T. whipplei* Lysat

Für die einzelnen Stimulationsversuche wurden hitzeinaktivierte Bakterienlysate von *T. whipplei* benutzt. Dazu wurden die Bakterien zunächst 30 min bei 90 °C im Wasserbad inaktiviert. Um die Bakterien zu lysieren, wurden sie dreimal für je eine Minute im Ultraschallbad inkubiert. Die Konzentration der Bakterien wurde mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) der 16s rDNA bestimmt [134]. Anschließend wurde das inaktivierte *T. whipplei*-Lysat auf  $1 \times 10^9$  /ml eingestellt und bei -80 °C gelagert.

### 4.2.3. Herstellung gereinigter rekombinanter Fusionsproteine des Hsp70 von *T. whipplei* und *E. coli* mit der Glutathion-S-Transferase

Für die Identifizierung immunogener Epitope aus *T. whipplei* wurden Fusionsproteine der Hsp70 von *T. whipplei* (*hsp70Tw*) und *E. coli* (*hsp70Ec*) mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in der Arbeitsgruppe Dr. A. Kühl / Dr. U. Erben im Rahmen ihrer zentralen Aufgaben innerhalb des Sonderforschungsbereiches 633 rekombinant hergestellt und als gereinigte Proteinpräparationen zur Verfügung gestellt. Für die Klonierung wurde aus lysierten Bakterien die chromosomale DNA aufgereinigt und mittels spezifischer Primer die Sequenz von DnaK (bakterielles homolog zu hsp70) in einer PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden nach der Klonierung und Verifizierung der Sequenz in den Expressionsvektor pGEX-2T (Abb. 5) integriert, der die Sequenz für die GST, welche später zur Aufreinigung der Fusionsproteine verwendet wurde, enthielt.



#### Abb. 5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGEX-2T

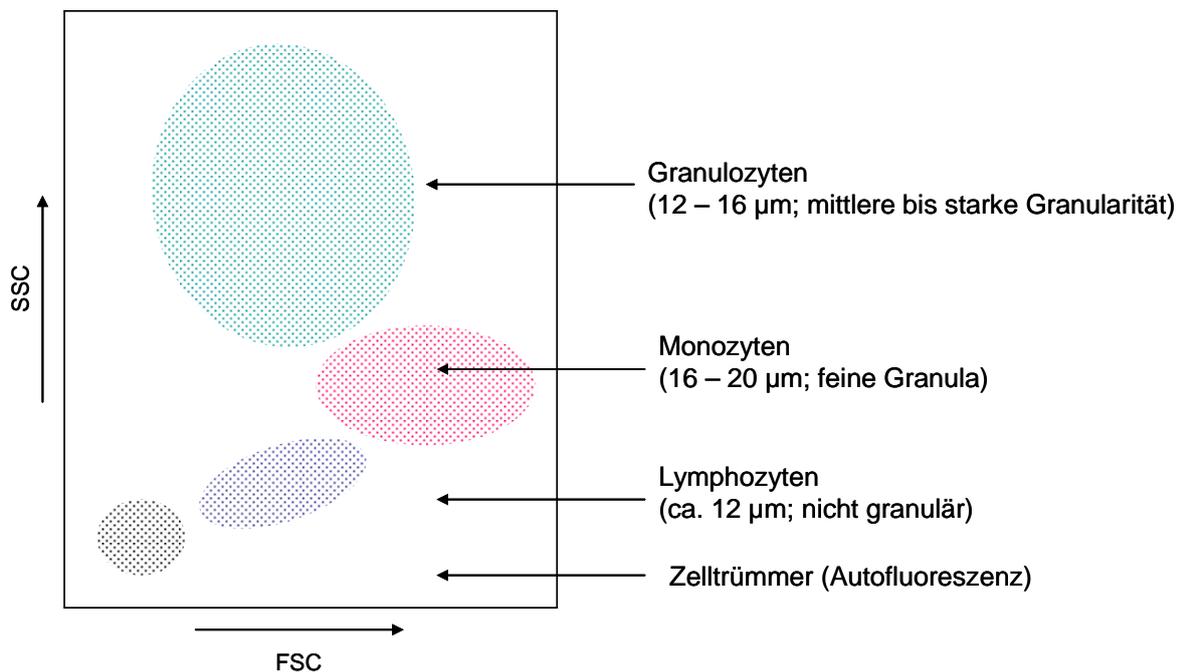
Der Vektor pGEX-2T wurde zur Konstruktion der Fusionsplasmide hsp70Tw und hsp70Ec verwendet. Die Restriktionsenzyme BamH1 und EcoRI wurden benutzt, um die zu integrierende DNA zu schneiden und korrekt einzufügen. (Quelle: GE Healthcare, Freiburg, DE, mit Modifizierungen)

Die Plasmide wurden in *E.coli*TOP10 vermehrt und mit dieser DNA der Produzentenstamm *E.coli*BL21/DE3LysS transformiert. Die Fusionsproteine hsp70Tw und hsp70Ec lagen zytoplasmatisch gelöst vor. Sie wurden nach Lyse der Bakterien affinitätschromatographisch über Glutathion-Sepharose gereinigt und der Puffer durch Ultrafiltration (Ausschlussgröße: 30kDa) gegen PBS ausgetauscht. Die Extraktion mit TritonX-114 [135] entfernte LPS aus den Präparationen so weit, dass der LPS-Gehalt der in den zellbiologischen Experimenten verwendeten Proteinlösungen bei maximal 0,03 Endotoxin U/ml lag. Die Reinheit der Präparation wurde durch SDS-PAGE und anschließende Färbung mit CoomassieR-250 bestätigt. Der Proteingehalt wurde mit dem BCA-Test bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt. Aliquots der Präparationen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.4. Analytische Durchflusszytometrie

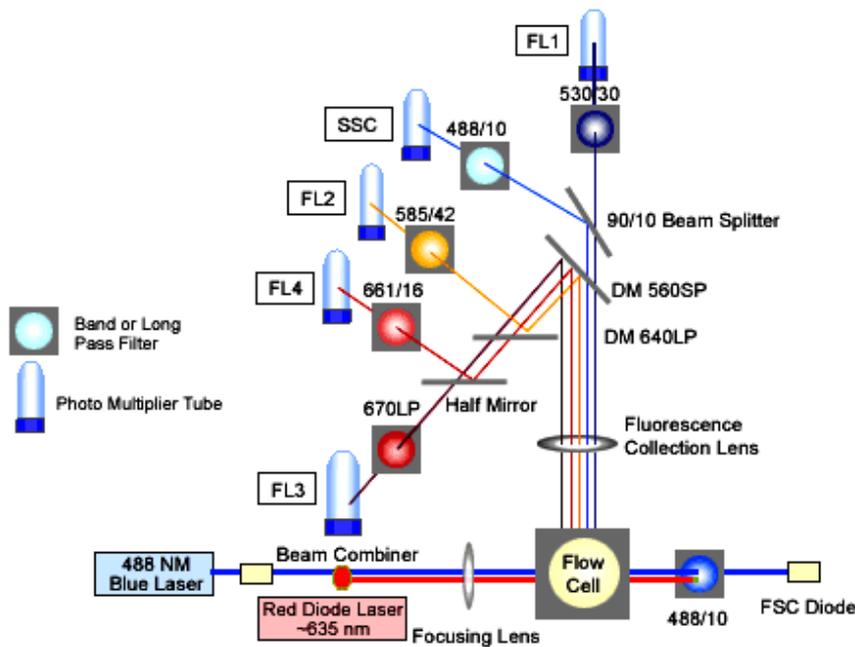
Mit Hilfe der analytischen Durchflusszytometrie wurden Monozyten auf die Expression von Differenzierungsmarkern und Zytokinen analysiert. Die Durchflusszytometrie liefert hierbei

sowohl eine qualitative als auch quantitative Aussage zur Expression des jeweiligen Proteins. Ein System aus Druckluft und Trägerflüssigkeit gewährleistet den Probenfluss durch das Zytometer. Die Suspensionszellen werden in einem Flüssigkeitsstrahl zum Messpunkt transportiert, an dem der Laser auf die Zelle trifft. Pro Zeiteinheit passiert nur eine Zelle den Laserstrahl. Das Licht wird von den Zellen gebeugt ohne dabei die Wellenlänge zu verändern. Dieses Licht wird von Detektoren aufgefangen. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) erfasst die Größe der Zelle, während das sich im 90°-Winkel zum einfallenden Laserlicht befindliche Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) das durch die Granularität der Zelle gestreute Licht misst. Bereits durch die Auftragung von SSC gegen FSC ist es möglich, die Zelltypen einer heterogenen Zellpopulation zu unterscheiden (Abb. 6.).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Zellpopulationen im FSC/SSC-Dot Plot**

Die Klassifizierung weiterer Untergruppen erfolgt durch die Analyse der Expression bestimmter Oberflächenantigene. Diese Immunphänotypisierung erfolgt mit Hilfe der Bindung von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper an spezifische CD-Antigene. Die Fluorochrome absorbieren das Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch Teilerspiegel und verschiedene Filter (Lang-, Kurz- und Bandpassfilter) in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf photosensitive Detektoren (Photomultiplier). Das optische Signal wird zunächst in elektrische Ströme und dann in ein digitales Signal umgewandelt (Abb. 7).



**Abb. 7: Aufbau eines Durchflusszytometers [136]**

Für die vorliegende Arbeit erfolgten die Messungen am FACS Calibur (BD, Heidelberg, DE). Im verwendeten Analysegerät stehen drei Sensoren für 530nm (Fluoreszenzkanal FL-1), 585nm (FL-2) und 650nm (FL-3) über den ersten Laser (Argon, 488nm) zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser (635nm) wird ein weiterer Fluoreszenzparameter mit einer Anregungswellenlänge von 670nm (FL-4) zur Verfügung gestellt.

**Tab. 10: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome**

Fluorochrom	Absorptions-	Emissions-
	Maximum [nm]	Maximum [nm]
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	495	517
Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidyl Ester (CFDA-SE)	495	517
R-Phycoerythrin (PE)	565	575
Peridinium Chlorophyll Protein + Sulfoindocyanin 5.5 (PerCpCy5.5) <sup>3</sup>	482	695
Allophycocyanin (APC)	650	660
Alexa 647	653	669

<sup>3</sup> Tandemkonjugat

Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich jeweils durch ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum aus und können somit spezifisch mit einem der vier Sensoren gemessen und von den anderen Farbstoffen unterschieden werden (Tab. 10).

Die Auswertungen der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (TreeStar, US) oder mit der CellQuestpro Research Software von BD. Die Fluoreszenzintensitäten wurden als zweidimensionale Punktdiagramme (Dot Plots) oder als Histogramme (Histogramm-Plots) dargestellt. Die FSC- und SSC-Signale wurden linear, alle anderen Fluoreszenzsignale in logarithmischer Form, dargestellt. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von Analysefenstern kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden.

#### ***4.2.5. Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Markern von Monozyten im Vollblut***

Um Oberflächenmoleküle auf Monozyten im Vollblut näher zu charakterisieren, wurden jeweils 50 µl Vollblut von Patienten und Kontrollen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden direkt ins Vollblut pipettiert. Für die Phänotypisierung der Monozyten im Vollblut wurden Antikörper gegen CD14, CD40, CD86, CD80, HLA-DR, CD206, CD11b, CD11c, CD163, CD64, CD16, CD33 und Integrin-β7 verwendet. Zu jeder Färbung wurde Beriglobin (aufgereinigtes humanes Immunglobulin G, 1 µg/ml) hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln wurden die Erythrozyten durch die Zugabe von 450 µl Lysepuffer lysiert. Nach weiteren 15 min wurden die Zellen zentrifugiert (2500 x g, 5 min, 4 °C), das Pellet in 100 µl 4 % PFA-Lösung resuspendiert und 15 min bei 37 °C fixiert. Um das PFA zu entfernen, wurden die Zellen anschließend in PBA gewaschen (2500 x g, 5 min, 4 °C). Für die intrazelluläre Färbung mit dem Monozytenmarker CD68 wurde eine Färbelösung mit anti-CD68 Antikörper, Beriglobin, Saponin (0,5 %) und PBA angesetzt. Saponin ist ein pflanzliches Detergenz, welches reversibel die Zellmembran perforiert und somit der Detektion intrazellulärer Moleküle ermöglicht. Die Zellen wurden mit 50 µl Färbelösung für 15 min inkubiert (RT, im Dunkeln). Anschließend wurden die Zellen mit PBA gewaschen, in 200 µl PBA aufgenommen und die Expression der Proteine durchflusszytometrisch bestimmt.

## **4.2.6. Antigenstimulationen im Vollblut**

### **4.2.6.1. Antigenstimulation der Lymphozyten im Vollblut**

Durch die *in vitro* Stimulation von Lymphozyten mit einem Antigen kann eine spezifische Immunantwort ausgelöst und die Zytokinproduktion gemessen werden. Dazu wurden 500 µl frisches heparinisiertes Vollblut in 15 ml Röhrchen in der Anwesenheit von anti-CD28 und anti-CD49 insgesamt über sechs Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit 2 µg/ml *Staphylococcus Enterotoxin B* (SEB). SEB gehört zu der Klasse der Superantigene und aktiviert durch die seitliche Vernetzung von MHC-Klasse-II und TZR unabhängig von einer spezifischen Bindung eines Antigens CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche daraufhin größere Mengen an Zytokinen freisetzen. Für die antigenspezifische Immunantwort wurde hitzeinaktiviertes *T. whipplei*-Lysat (*Tw*), hsp70*Tw*, hsp70*Ec*, GST, Tetanus Toxoid, hCMV und Tuberkulin für die Stimulation eingesetzt. Die GST als ein Bestandteil der Fusionsplasmide hsp70*Tw* und hsp70*Ec* und wurde als Kontrollansatz immer mitgeführt und bei der Auswertung der Daten als Leerwert abgezogen. Als Negativkontrolle für die restlichen Antigene wurde ein Ansatz ohne Antigen verwendet.

Nach drei Stunden Präinkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit dem entsprechenden Antigen wurden 10 µg/ml Brefeldin A für weitere drei Stunden zu den Stimulationsansätzen gegeben. Brefeldin A unterbindet die cis-trans-Translokation der Proteine innerhalb des Golgiapparates. Die synthetisierten Zytokine akkumulieren innerhalb der Zelle und können so intrazellulär durch Antikörper detektiert werden. Nach der Stimulation wurden die Zellen zunächst mit EDTA von der Oberfläche der Stimulationsröhrchen gelöst. EDTA wurde in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben, anschließend wurde zehn Minuten bei RT inkubiert. Die Erythrozyten wurden mit 4,5 ml Lysepuffer 15 min bei RT lysiert und fixiert. Nach dem Waschen mit PBA wurde das Pellet in 50 µl Färbelösung resuspendiert, welche folgende Antikörper beinhaltet: anti-CD40L, anti-CD4, anti-CD3, anti-IFN $\gamma$ -APC sowie Beriglobin und Saponin verdünnt mit PBA. Nach 15-minütiger Inkubation (RT, im Dunkeln) wurden die Zellen mit PBA gewaschen (2500 x g, 5 min 4 °C) und in 200 µl PBA für die Durchflusszytometrie aufgenommen.

### **4.2.6.2. Antigenstimulation der Monozyten im Vollblut**

Frisches heparinisiertes Vollblut (500 µl) wurde in 15 ml Röhrchen insgesamt über sechs Stunden mit verschiedenen Antigenen stimuliert. Für die spezifische Immunantwort wurden Lipopolysaccharide (LPS), *T. whipplei*-Lysat, hsp70*Tw*, hsp70*Ec* und GST für die Stimulation eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Antigen verwendet. Nach drei Stunden Präinkubation im Brutschrank mit dem entsprechenden Antigen wurden 10 µg/ml

Brefeldin A zu den Stimulationsansätzen dazugegeben und für weitere drei Stunden inkubiert. Nach der Antigenstimulation wurde der Antikörper gegen CD14 sowie Beriglobin direkt in das Vollblut gegeben und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 20 mM EDTA (pH 7,5) hinzugeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Erythrozyten wurden mit 4,5 ml Lysepuffer 15 min bei RT lysiert und fixiert. Um die Monozytenpopulation besser von den Granulozyten und Lymphozyten in der Durchflusszytometrie im SSC und FSC abgrenzen zu können, wurden die Zellen mit 4 % PFA für 15 min bei 37 °C fixiert. Nach dem Waschen wurden die Zellsuspensionen zu gleichen Teilen auf je zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellen wurden zentrifugiert (2500 x g, 4 °C, 5 min) und die eine Hälfte in 50 µl Färbeansatz 1, der die PBA verdünnten Antikörper gegen IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, Beriglobin und Saponin enthielt, aufgenommen. Die zweite Hälfte der Zellen wurde für die Detektion von IL-1 $\beta$  und IL-1ra mit den entsprechenden Antikörpern verwendet. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in 200 µl PBA aufgenommen und die Expression der Zytokine durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **4.2.7. Zellkultur**

##### **4.2.7.1. Zellseparation primärer mononukleärer Blutzellen (PBMC)**

Das Spenderblut wurde in heparinbeschichteten Vacutainer-Röhrchen entnommen, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 Stunden verarbeitet. Zur Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) aus frischem Vollblut von Kontrollen und Patienten wurde die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation benutzt. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate, die meisten Granulozyten und tote Zellen die Ficollschicht passieren und auf dem Boden sedimentieren. Die mononukleären Zellen reichern sich in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an.

Es wurden 15 ml Ficoll Paque in ein LeucoSep-Röhrchen mit Filterscheibe gegeben und kurz zentrifugiert, damit sich das Ficoll unterhalb der Filterscheibe befand. Danach wurden vorsichtig 15-30 ml Blut auf die Filterscheibe gegeben und anschließend das Röhrchen für 10 min zentrifugiert (2100 x g, RT, ohne Bremse). Das Plasma wurde abgenommen und in Einfrierröhrchen bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die mononukleäre Zellschicht sehr vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

#### 4.2.7.2. Waschen der Zellen

Die Zellen wurden in PBS/BSA resuspendiert und bei 650 x g für 7 min bei 4 °C zentrifugiert. Erythrozyten wurden durch fünfminütige Inkubation in Erylysepuffer bei RT lysiert. Dieser Puffer wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt.

#### 4.2.7.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

10 µl der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen einer 2 %igen Trypanblau-Lösung gemischt. Dieser Farbstoff dient der tot/ lebend-Differenzierung, da er nur bei toten Zellen die Zellmembran durchdringen und das Zytoplasma blau färben kann. 10 µl dieser Mischung wurden in die Zählkammer eingefüllt und vier mal 16 Felder (vier Großquadrate) ausgezählt. Anhand folgender Gleichung wurde aus dem Mittelwert der Zählungen durch Multiplikation des Verdünnungsfaktors (Vf) und des Kammerfaktors ( $10^4$ ) die Zellzahl/ ml berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

#### 4.2.7.4. Einfrieren der Zellen

Nach dem Zählen wurden die Zellen in Zellkulturmedium gewaschen. Zum Einfrieren wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Es wurde eine Zellzahl zwischen  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen/ ml eingestellt. Um die Vitalität der Zellen zu erhalten, ist es erforderlich, die Zellen langsam und schonend einzufrieren. Dazu wurden die Einfrierröhrchen in eine Einfrierkiste gestellt, die mit Isopropanol (4 °C) gefüllt ist. Diese gewährleistet, dass die Zellen, nach dem Transfer in den Gefrierschrank, kontinuierlich um 1 °C/ min auf -80 °C heruntergekühlt werden.

#### 4.2.7.5. Lagerung der Zellen und Überstände

Die Einfrierröhrchen mit den Ficollüberständen (Blutplasma) wurden bei -20 °C eingefroren und nach einer Woche in -80 °C überführt. Nach dem schonenden Herunterkühlen auf -80 °C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) bei -196 °C dauerhaft gelagert.

#### 4.2.7.6. Auftauen der Zellen

In einem 50 ml Röhrchen wurden 40 ml Zellkulturmedium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die tiefgefrorenen Zellen wurden kurz im Wasserbad bei 37 °C angetaut und sofort in das warme Medium gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (650 x g, 7 min, 4 °C) wurde das Zellpellet mit Zellkulturmedium gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Danach wurden die Zellen in warmem Zellkulturmedium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig bei 4 °C gelagert.

#### 4.2.7.7. Separation von Monozyten und Lymphozyten mit magnetischen Antikörpern (MACS)

##### 4.2.7.7.1. Prinzip der Zellseparation mit magnetischen Antikörpern

Für die magnetische Zellseparation wurden monoklonale Antikörper, die spezifisch für Oberflächenrezeptoren sind und mit ihrem Fc-Ende an molekulare Mikromagneten gebunden sind, verwendet. Während einer 15-minütigen Inkubation binden diese magnetischen Antikörper mit dem Fab-Ende an die spezifischen Antigene der suspendierten Zellen. Die Separation erfolgt in einer Säule, welche in einem Magneten platziert wird. Die magnetisch markierten Zellen verbleiben in der Säule, während die nicht markierten Zellen hindurchlaufen und aufgefangen werden. Nach Entfernung der Säule aus dem Magneten können die markierten Zellen diese ebenfalls passieren und aufgefangen werden.

##### 4.2.7.7.2. Ablauf der Separation von Monozyten und Lymphozyten

Im Gegensatz zu Lymphozyten exprimieren Monozyten, Makrophagen und zum Teil auch neutrophile Granulozyten und myeloide DCs an ihrer Oberfläche den LPS Rezeptor CD14. CD14 wird auf der Membranoberfläche von Monozyten und Makrophagen besonders stark exprimiert, was eine positive Selektion dieser Population ermöglicht. Zur Isolation von Monozyten aus frischen PBMC werden die Zellen daher mit magnetischen Antikörpern gegen CD14 markiert.

Frisch isolierte PBMC wurden dafür mit MACS Puffer gewaschen und anschließend mit anti-CD14 MicroBeads (10 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die PBMC in 10 ml MACS-Puffer zur Entfernung nicht gebundener Antikörper gewaschen und für sieben Minuten mit 650 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2-3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss auf eine LS-Säule gegeben, die vorher mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert wurde. Die negative d. h. unmarkierte Zellfraktion wurde in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Die Säule wurde nach dem ersten Durchlauf noch zweimal mit je

3 ml MACS-Puffer gespült, um restliche unmarkierte Lymphozyten aus der Säule zu waschen. Die CD14<sup>+</sup> Zellen wurden gewonnen, indem die Säule aus dem Magneten entfernt und auf einem frischen 50 ml Röhrchen platziert wurde. Für die Elution wurden 3 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und die Flüssigkeit mit einem Stempel durch die Säule gepresst. Der Durchfluss wurde als Monozyten-Eluat in 10 ml Zellkulturmedium aufgefangen und noch einmal gewaschen. Nach der Zentrifugation (7 min, 650 x g, 4 °C) wurde das Pellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt.

Für die Gewinnung von Lymphozyten aus der CD14 negativen Zellfraktion wurden magnetische anti-HLA-DR Antikörper verwendet. Die magnetische Separation lief nach dem gleichen Schema wie die Isolation von CD14<sup>+</sup> Monozyten ab. Nach der Isolation wurde lediglich die HLA-DR negative Zellfraktion behalten, gewaschen und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt. Je  $1 \times 10^7$  HLA-DR<sup>-</sup> Zellen wurden eingefroren und für eine Woche bei -80 °C gelagert. Für die Reinheitsüberprüfung der beiden Separationen wurden 50 µl Zellsuspension von jedem Eluat abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (620 x g, 10 min 4 °C). Das Zellpellet wurde in 50 µl Antikörperlösung resuspendiert, die den in PBA verdünnten Antikörper gegen CD14 bzw. HLA-DR sowie Beriglobin enthielt. Nach einer 15-minütigen Inkubation (RT, im Dunkeln) wurden die Zellen mit PBA gewaschen, in 150 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer die Expression von CD14 bzw. HLA-DR bestimmt. Die Reinheit von Monozyten war stets zwischen 92 % und 97 %, die Reinheit der Lymphozyten (HLA-DR<sup>-</sup> Zellen) lag bei 99 %.

#### **4.2.8. *In vitro* differenzierte Makrophagen**

##### **4.2.8.1. *In vitro* Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen**

Um *in vitro* aus Monozyten Makrophagen zu generieren, wurden von den frisch isolierten CD14<sup>+</sup> Monozyten  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Zellkulturmedium aufgenommen und je 2 ml Zellsuspension in eine Kulturplatte mit sechs Kavitäten überführt. M1 wurden durch die Zugabe von GM-CSF generiert, wohingegen M2 durch M-CSF erzeugt wurden. Alle zwei bis drei Tage wurden frische Wachstumsfaktoren hinzugegeben. Am achten Tag waren die Zellen ausgereift, so dass sie für verschiedene Experimente eingesetzt werden konnten.

##### **4.2.8.2. Ablösen von *in vitro* differenzierten Makrophagen aus Kulturschalen**

Aus den Kulturplatten wurde der Überstand abgesaugt und der Zellrasen mit 0,5 ml 10 mM EDTA für 20 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die adhärennten Makrophagen vom Boden ablösen. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Kulturplatte zweimal mit 0,5-1 ml Zellkulturmedium gespült, um möglichst viele Makrophagen zu

gewinnen. Anschließend wurden die Zellen bei 650 x g, 7 min, bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt.

#### 4.2.8.3. Analyse von Differenzierungsmarkern bei *in vitro* differenzierten Makrophagen

Um den Einfluss von *T. whipplei* auf die Expression verschiedener Makrophagenmarker hin zu untersuchen, wurden am achten Tag der Differenzierung je 2 x 10<sup>5</sup> M1 und M2 Makrophagen in je zwei Kavitäten einer Kulturplatte mit 24 Kavitäten überführt. Eine Kavität wurde über 48 Stunden mit *T. whipplei* (5 x 10<sup>6</sup> CFU/ml) stimuliert, die andere blieb unstimuliert. Die Makrophagen wurden weiterhin ihre Wachstumsfaktoren M-CSF bzw. GM-CSF versorgt. Am Tag zehn wurden die Zellen drei Stunden mit Brefeldin A inkubiert, die Zellen abgelöst (siehe 4.2.8.2.) und anschließend auf je drei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellen wurden bei 620 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 50 µl Antikörperlösung, die die Antikörper gegen die in Tab. 11 aufgeführten Oberflächenmoleküle sowie Beriglobin enthielt, resuspendiert und 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert.

**Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Phänotypisierung der *in vitro* differenzierten Makrophagen**

(verdünnt in PBA, in rot sind die Antikörper gegen intrazelluläre Proteine dargestellt)

Ansatz	Antikörper/Reagenz
1	anti-CD16, anti-CD64, anti-CD14, anti-CD71, Beriglobin
2	anti-CD68, anti-CD163, anti-HLA-DR, anti-CCL-18, Beriglobin, Saponin
3	anti-25F9 <sup>4*</sup>

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit PBA gewaschen (620 x g, 10 min, 4 °C), das Zellpellet in 100 µl 4 % PFA Lösung resuspendiert und die Zellen 15 min bei 37 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBA gewaschen (2500 x g, 5 min, 4 °C), die Zellen mit dem ersten Färbeansatz in 150 µl PBA aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Im zweiten Ansatz wurde das Zellpellet in 50 µl Antikörperlösung resuspendiert, die die in PBA verdünnten Antikörper gegen CD68 und CCL-18 sowie Beriglobin und Saponin enthielten. Nach einer 15-minütigen Inkubation (RT, im Dunkeln) wurden die Zellen mit PBA gewaschen, die Zellen in 150 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

<sup>4</sup> unkonjugierter Primäantikörper, als Sekundäantikörper wurde rabbit anti mouse IgG-RPE verwendet

\*

#### 4.2.8.4. Wechsel der Makrophagenpolarisierungen von *in vitro* differenzierten Makrophagen

Um zu überprüfen, ob sich M1 zu M2 Makrophagen entwickeln können, und umgekehrt, wurden im Doppelansatz in acht Kavitäten einer Kulturplatte mit zwölf Kavitäten je  $5 \times 10^5$  CD14<sup>+</sup> Monozyten pro ml Zellkulturmedium gegeben. Je vier Kavitäten wurden mit GM-CSF bzw. M-CSF über acht Tage stimuliert, um entweder M1 oder M2 Makrophagen zu generieren. Am achten Tag wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit 1 ml warmen (37 °C) PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml frisches Zellkulturmedium (37 °C), Wachstumsfaktoren und Zytokine (Tab. 12) zugegeben, die einen Wechsel zwischen den Makrophagenpolarisierungen ermöglichen sollen.

Die Makrophagen in den einzelnen Ansätzen wurden bis Tag 15 mit ihrem Zytokincocktail stimuliert, wobei alle zwei bis drei Tage frische Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren hinzugegeben wurden. Am 15. Tag der Differenzierung wurden die Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktionalität überprüft. Dazu wurde eine Ansatzreihe mit LPS stimuliert, nach einer Stunde Brefeldin A ins Medium gegeben und die Makrophagen für weitere fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Der zweite Ansatz für die Bestimmung des Phänotyps wurde für drei Stunden mit Brefeldin A inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus den Kulturschalen abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

**Tab. 12: Übersicht über die verwendeten Zytokine für den Wechsel der Markrophagenpolarisierung**

(alle Zytokine wurden in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt, lila unterlegte Ansätze stellen den Wechsel von M2 zu M1, grüne unterlegte Ansätze den Wechsel von M1 zu M2 Makrophagen dar.)

Ansatz	Zytokine Tag 0 - 8	Zytokine Tag 8 - 15
1	GM-CSF = M1	GM-CSF
2		M-CSF
3		M-CSF + rh IL-4
4		M-CSF + rh IL-10
5	M-CSF = M2	M-CSF
6		GM-CSF
7		GM-CSF + rh IFN $\gamma$
8		GM-CSF + rh TNF $\alpha$

Nach der Zentrifugation (620 x g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen 15 min (auf Eis, im Dunkeln) mit der ersten Antikörperlösung (anti-CD163, anti-CD14 und Beriglobin bzw. mit anti-CD14 und Beriglobin) inkubiert, welche die Detektion von Oberflächenmolekülen ermöglicht.

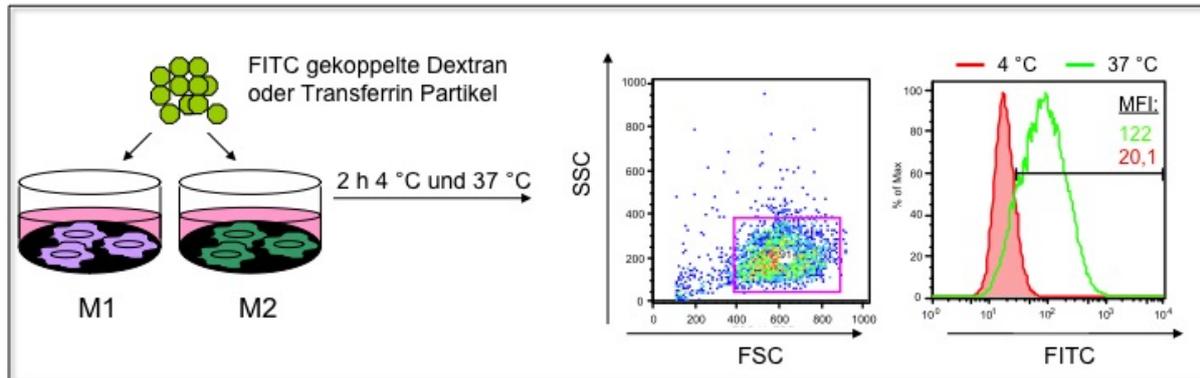
Anschließend wurden die Zellen mit PBA gewaschen (620 x g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 100  $\mu$ l 4 % PFA aufgenommen, um die Zellen bei 37 °C für 15 min zu fixieren. Nach dem Waschen der Zellen (2500 x g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 50  $\mu$ l der zweiten Antikörperlösung (anti-CD68, anti-CCL-18, Beriglobin und Saponin) für die Detektion intrazellulärer Moleküle resuspendiert und 15 min (auf Eis, im Dunkeln) inkubiert. Für den

Nachweis der intrazellulären Zytokinproduktion nach LPS Stimulation wurden die Zellen mit anti-IL-6, anti-TNF $\alpha$  und anti-IL-10 Antikörpern angefärbt und 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBA gewaschen, in 150  $\mu$ l PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

#### **4.2.8.5. Phagozytostest mit *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen**

Um den Einfluss von *T. whipplei* auf die Phagozytose zu untersuchen, wurden Dextran- bzw. Transferrin-Partikel verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt waren. Somit waren die phagozytierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie detektierbar. Transferrin-Partikel werden über den Transferrinrezeptor CD71 in die Zelle aufgenommen und dienen als Nachweis einer rezeptorvermittelten Phagozytose. Dextran-Partikel hingegen werden rezeptorunabhängig von den Zellen aufgenommen. Um den Einfluss von *T. whipplei* auf die Phagozytose zu analysieren, wurden am achten Tag der Differenzierung je  $0,8 \times 10^6$  M1 und M2 Makrophagen entnommen, zentrifugiert (620 x g, 10 min, 4 °C) und in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro ml Zellkulturmedium resuspendiert. Je 400  $\mu$ l Zellsuspension ( $1 \times 10^5$ ) von M1 bzw. M2 Makrophagen wurden in eine Kulturplatte mit 48 Kavitäten überführt. Eine Kavität blieb unstimuliert und in die andere wurde *T. whipplei* ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) hinzugegeben und über 48 Stunden bei 37 °C stimuliert.

Nach 48 Stunden (Tag zehn des Versuchsansatzes) wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei -20 °C gelagert. Je Kavität wurden 100  $\mu$ l frisches Zellkulturmedium hinzugegeben und die Kulturplatten 30 min auf Eis inkubiert, um den Zellmetabolismus einzuschränken. Anschließend wurden die Makrophagen mit Dextran-FITC Partikel (10  $\mu$ g/ml) bzw. Transferrin-FITC Partikel (20  $\mu$ g/ml) über zwei Stunden inkubiert, dabei wurden eine Kulturplatte bei 37 °C und die andere bei 4 °C inkubiert (Abb. 8). Nur bei 37 °C kann eine aktive Aufnahme der Dextran bzw. Transferrin Partikel stattfinden, da der Zellstoffwechsel bei 4 °C eingeschränkt ist. Nach der Phagozytose wurden die nicht phagozytierten Partikel durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit je 0,5 ml PBS entfernt. Die Makrophagen wurden aus der Kulturplatte entnommen, zentrifugiert (620 x g, 10 min, 4 °C), das Zellpellet in 150  $\mu$ l PBA aufgenommen und die Proben im Durchflusszytometer analysiert.



**Abb. 8: Ablauf eines Phagozytostests mit *in vitro* differenzierten Makrophagen**

*In vitro* M1 und M2 differenzierte Makrophagen wurden mit Dextran-FITC bzw. Transferrin-FITC Partikeln für zwei Stunden bei 37 °C bzw. 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im Durchflusszytometer analysiert. Mit Hilfe des FSC und SSC wurden alle lebenden Makrophagen eingegrenzt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Makrophagen, die Dextran bzw. Transferrin aufgenommen hatten, bestimmt. Die Werte der 4 °C Proben wurden von den 37 °C Proben abgezogen.

#### 4.2.8.6. Proliferationstest mit *in vitro* differenzierten Makrophagen

Um die Funktion der *in vitro* differenzierten Makrophagen als APZ zu überprüfen, wurden Proliferationstests mit Makrophagen und autologen T-Zellen (HLA-DR<sup>-</sup> Zellen), die mit 5-(und-6)-Carboxyfluoreszein-Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) markiert wurden, in unterschiedlichen Verhältnissen durchgeführt (Tab. 13).

**Tab. 13: Zellzahlverhältnisse zwischen Makrophagen und T-Zellen beim Proliferationstest**

Makrophagen:T-Zell Verhältnis	Zellzahl [ x 10 <sup>4</sup> ]	
	Makrophagen	T-Zellen
1:5	2	10
1:10	1	10
1:20	0,5	10
1:40	0,25	10
1:80	0,125	10

In der Zelle wird CFDA-SE von unspezifischen Esterasen durch Abspaltung zweier Azetatgruppen zu anionischem und fluoreszierendem CFSE gespalten, das aminoreaktiv und nicht mehr membrangängig ist [137]. Bei der Zellteilung wird das CFSE gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt. Im Durchflusszytometer kann man aufgrund der Halbierung der Fluoreszenz pro Teilungszyklus erkennen, wieviel Zellteilungsrunden durchlaufen wurden. Am achten Tag der Differenzierung wurden 2 x 10<sup>5</sup> M1 und M2 Makrophagen entnommen, zentrifugiert (620 x g, 10 min, 4 °C) und in 2 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml Zellkulturmedium aufgenommen ( $\pm$ 1:5 Verdünnung). In einer Verdünnungsreihe wurden 500  $\mu$ l Zellkulturmedium in jedes 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die Makrophagen der 1:5 Verdünnung jeweils um den Faktor 2 bis zur 1:80 Verdünnung weiter verdünnt. Je 100  $\mu$ l Zellsuspension jeder Verdünnung von M1 bzw. M2 Makrophagen wurden in eine Kavität einer Kulturplatte mit 96

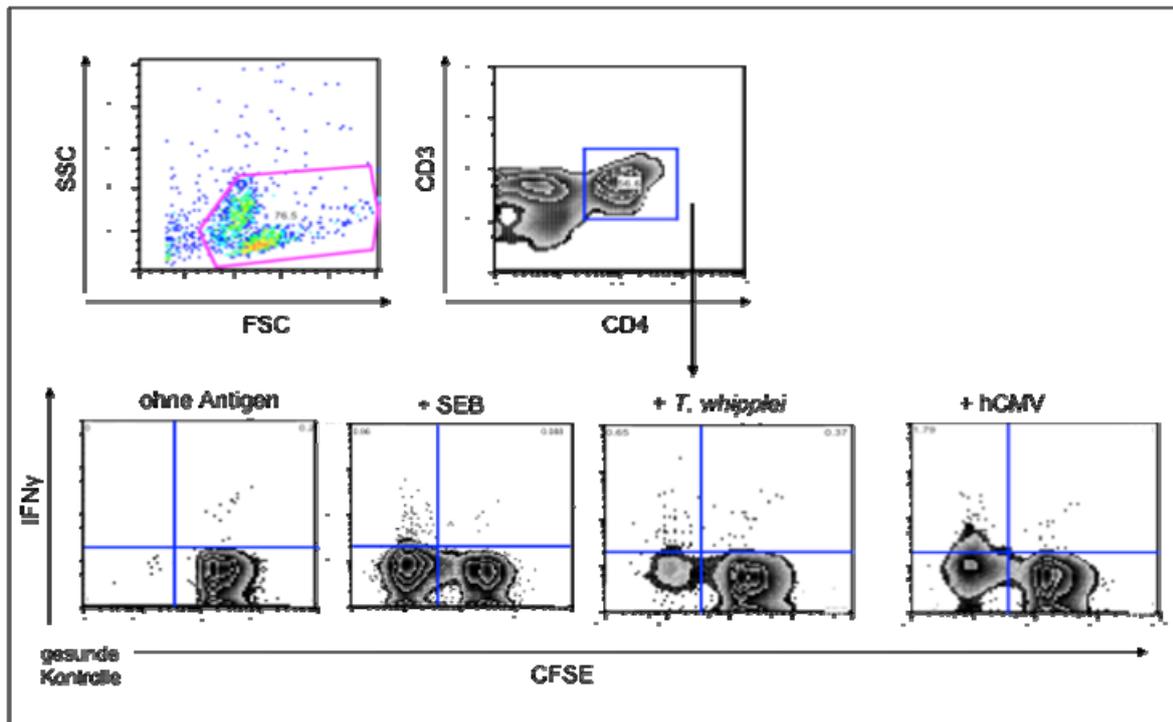
Kavitäten überführt und vor T-Zellzugabe eine Stunde bei 37 °C inkubiert, damit die Makrophagen adhären. Für die Negativkontrolle ohne Makrophagen wurden 100 µl Zellkulturmedium in die Kavität gegeben und die T-Zellen ohne APZ inkubiert.

Anschließend wurden  $2 \times 10^7$  autologe T-Zellen, die am Tag null isoliert wurden, aufgetaut und mit Medium gewaschen, um restliches DMSO zu entfernen. Um die T-Zellen mit CFDA zu markieren, wurden die Zellen in PBS gewaschen und die Zellzahl auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die gleiche Menge CFDA-SE-Lösung (1 µM) wurde hinzugegeben und die Zellsuspension für drei Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 20 ml Zellkulturmedium gewaschen und die Lebendzellzahl bestimmt. Die CFDA-SE<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mit Zellkulturmedium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und 100 µl Zellsuspension in jede Kavität der Kulturplatte mit 96 Kavitäten zu den Makrophagen pipettiert. Um die antigenspezifische Proliferation der T-Zellen zu messen, wurden die Ansätze mit SEB, *T. whipplei* ( $2 \times 10^7$  CFU/ml) und hCMV über fünf Tage stimuliert. Am fünften Tag wurden die Zellen für drei Stunden mit Brefeldin A inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in eine Kulturplatte mit 96 Kavitäten überführt. Dabei wurden 50 µl Zellsuspension der 1:5 Verdünnungen gesondert abgenommen, da diese später mit den Isotypkontrollen der verwendeten Antikörper gefärbt wurden. Die Zellen wurden bei 620 x g, 7 min, bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in PBA resuspendiert und die Zellen noch einmal zentrifugiert. Zum Fixieren wurde das Zellpellet in 100 µl 4 % PFA aufgenommen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 50 µl Antikörperlösung (Tab. 14) resuspendiert und 15 min im Dunkeln inkubiert.

**Tab. 14: Übersicht über die verwendeten Antikörper beim Proliferationstest**  
(verdünnt mit PBA)

Ansatz	Antikörper/Reagenz
1	anti-CD4, anti-CD3, anti-IFN $\gamma$ , Beriglobin, Saponin (0,5 %)
2 (Isotypkontrolle, nur 1:5 Verdünnung)	anti-IgG1 in den Konjugaten PE, PerCpCy5.5, APC sowie Beriglobin und Saponin (0,5 %)

Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden die Zellen mit PBA gewaschen, in 150 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurden zunächst die lebenden Zellen im FSC/SSC eingegrenzt und in einem weiteren Punktdiagramm die T-Zellen betrachtet, die sowohl CD3 als auch CD4 exprimieren. Des Weiteren wurden die Proliferation (Abnahme der CFSE Konzentration) und die IFN $\gamma$  Produktion der T-Zellen nach einer fünftägigen Antigenstimulation untersucht (Abb. 9).



**Abb. 9: Analyseschema für die Auswertung eines Proliferationstest am Beispiel einer gesunden Kontrolle**

Nach der Färbung der Zellen mit anti-CD4, anti-CD3 und anti-IFN $\gamma$  wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Lebende Zellen wurden anhand des FCS/SSC eingegrenzt. Des Weiteren wurden nur die T-Zellen betrachtet, die sowohl CD3 als auch CD4 exprimieren. Betrachtet wurde sowohl die Proliferation der T-Zellen (Abnahme der CFSE Konzentration) als auch die IFN $\gamma$  Produktion nach fünftägiger SEB-, *T. whipplei*- oder hCMV Stimulation.

#### 4.2.9. Aufarbeitung von humanen Biopsien aus dem Duodenum

Zur Kontrolle der Therapie mussten sich die MW-Patienten regelmäßig einer Gastroskopie unterziehen, wobei fünf bis sechs duodenale Biopsien abgenommen wurden. Bis zur Verwendung wurden die Biopsien in NaCl bei 4 °C gelagert. Zum einen wurden frisch isolierte Biopsien in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit flüssigen Stickstoff schock gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zum anderen wurden die Biopsien über einen Zeitraum von 48 Stunden kultiviert.

##### 4.2.9.1. Kurzzeitkultivierung von duodenalen Biopsien

Für die Bestimmung der Zytokin-, Nitrit- und Harnstoffproduktion wurden duodenale Biopsien über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 5 % CO $_2$  und 80 % O $_2$  im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Das Gewicht der Biopsien wurde mit einer Analysewaage bestimmt und die Biopsien in eine Kulturplatte mit 24 bzw. 48 Kavitäten mit 500  $\mu$ l bzw. 300 $\mu$ l LPL-Medium überführt. Für die Nitrit- und Harnstoffproduktion wurden die Makrophagen zusätzlich mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  aktiviert und je eine Biopsie wurde mit *T. whipplei* oder LPS kultiviert. Ein Ansatz blieb unstimuliert. Der Kulturüberstand wurde nach 48 Stunden abgenommen und bei

-20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Biopsien wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.10. Nitrit- und Harnstoff Nachweis

##### 4.2.10.1. Kulturbedingungen für den Nachweis von Nitrit, Harnstoff und der Arginaseaktivität in *in vitro* differenzierten Makrophagen

Für die funktionelle Unterscheidung von M1 und M2 Makrophagen wurde die Produktion von Nitrit bzw. Harnstoff nach Antigenstimulation in Zellkulturüberständen gemessen (Abb. 10). Die pro-inflammatorischen M1 Makrophagen produzieren nach Antigenstimulation mittels iNOS eher NO und seine Derivate (Nitrit und Nitrat) für eine effektive Immunantwort [88, 89]. Die anti-inflammatorischen M2 Makrophagen produzieren nach Antigenstimulation aufgrund erhöhter Arginaseaktivität bevorzugt Harnstoff und Ornithin, welche für Geweberneuerung verwendet werden [60, 138].

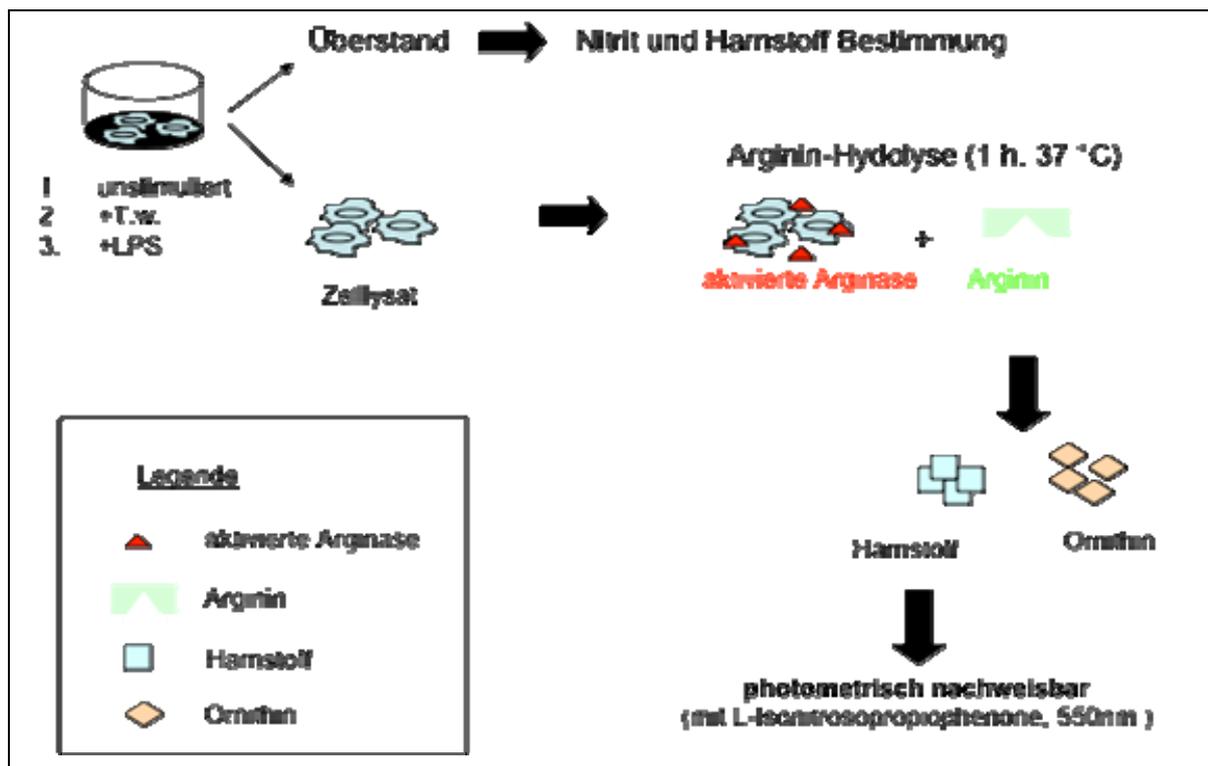


Abb. 10: Testprinzip zum Nachweis von Nitrit- und Harnstoffproduktion und der Arginaseaktivität in *in vitro* differenzierten Makrophagen

Um die Harnstoff- und Nitrit-Produktion in Makrophagenüberständen und die Arginaseaktivität in lysierten Makrophagen nachzuweisen, wurden am achten Tag der Differenzierung  $7,5 \times 10^5$  M1 und M2 Makrophagen entnommen, zentrifugiert (620 x g, 10 min, 4 °C) und in Zellkulturmedium aufgenommen. Für die Aktivierung der Makrophagen *in vitro* wurden  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  zugegeben. In drei Kavitäten einer Platte mit 24 Kavitäten

wurden je  $2,5 \times 10^5$  M1 oder M2 Makrophagen (300  $\mu$ l) gegeben und die Makrophagen über 48 Stunden mit *T. whipplei* ( $2 \times 10^7$  CFU/ml) oder LPS stimuliert. Ein Ansatz blieb als Negativkontrolle unstimuliert. Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert (620 x g, 10 min, 4 °C) und 250  $\mu$ l davon in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Auf den Zellrasen wurden 300  $\mu$ l 10 mM EDTA gegeben und die Zellen wie in 4.2.8.2. beschrieben abgelöst. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (620 x g, 10 min, 4 °C), das Zellpellet in 100  $\mu$ l 0,1 % Triton-x 100-Lösung resuspendiert und 30 min bei 4 °C geschüttelt, um die Zellen chemisch zu lysieren. Hinterher wurden 100  $\mu$ l Tris-HCl (25 mM, beinhaltet 5 mM  $MnCl_2$ , pH 7,4) in jedes Reaktionsgefäß gegeben und die Zellen 30 min bei 4 °C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Zelllysate bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.10.2. Bestimmung des Proteingehalts in Makrophagenlysaten

Um die Arginaseaktivität in den einzelnen Makrophagenlysaten zu vergleichen, wurde nach der Lyse der Zellen die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit von Pierce®. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

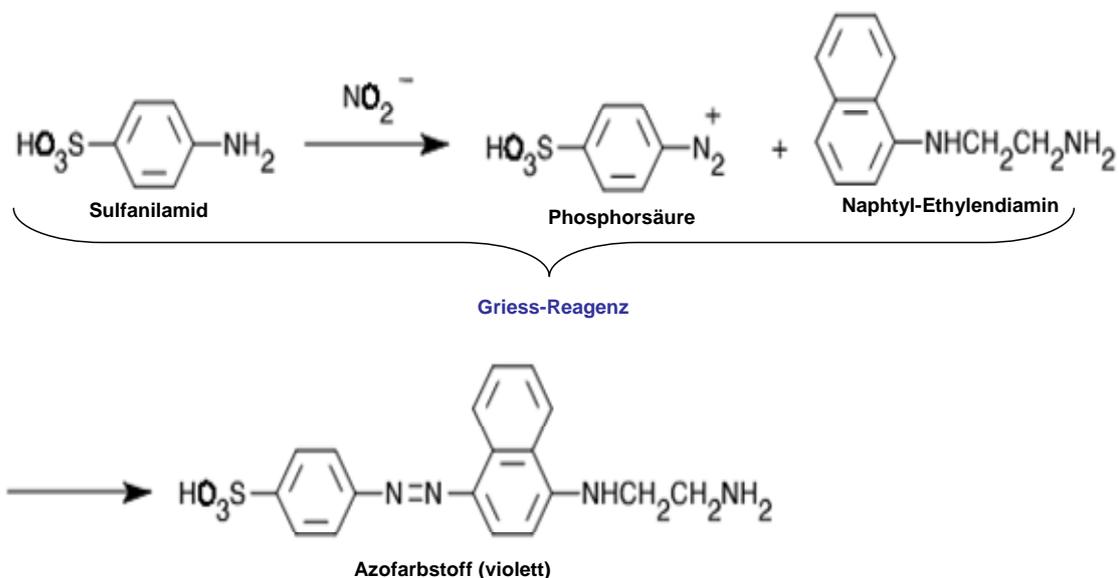
Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit  $Cu^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die  $Cu^{2+}$ -Ionen dieses Komplexes werden zu  $Cu^+$ -Ionen reduziert, die mit Bicinchinonsäure einen violetten Farbkomplex bilden [139]. Die Absorption dieses Farbkomplexes kann bei 562 nm mit einem Photometer gemessen werden.

Die Erstellung der Proteineichlösung erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) als Standard aus einer Stammlösung von 2 mg/ml BSA gelöst in destilliertem Wasser in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,025 bis 2 mg Protein/ml. Das BCA-Arbeitsreagenz besteht aus Lösung A und B, die im Verhältnis 1:50 zusammen gegeben wurden. Lösung A beinhaltet BCA in einem alkalischen Puffer und Lösung B besteht aus 4 % Kupfersulfat.

Die Makrophagenlysate wurden aufgetaut, 8  $\mu$ l entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden zunächst im Verhältnis 1:8 mit destilliertem Wasser verdünnt. 25  $\mu$ l jeder verdünnten Probe wurde in eine Platte mit 96 Kavitäten überführt, je Kavität 200  $\mu$ l BCA-Arbeitsreagenz zugeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Proteingehalt photometrisch mit einem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Reader über die Extinktion bei 562 nm ermittelt, wobei die entstandene Farbreaktion proportional zur Proteinkonzentration ist.

### 4.2.10.3. Nitrit-Nachweis

Nitrit kann als stabiles Abbauprodukt des NO-Metabolismus mittels Griess-Reagenz nachgewiesen werden (Abb. 11). Dazu wurden die bei -20 °C gelagerten Kulturüberstände von *in vitro* differenzierten Makrophagen und Biopsien aufgetaut und jeweils 2 x 100 µl (Doppelansätze) in eine Platte mit 96 Kavitäten überführt. Eine Standardverdünnungsreihe von 80 µM bis 0,675 µM Nitrit wurde mit NaNO<sub>2</sub> angefertigt und ebenfalls in einer Doppelbestimmung je 2 x 100 µl in eine Platte mit 96 Kavitäten pipettiert. Als Negativkontrolle diente Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Makrophagenkulturüberstände und Standardproben 45 min bei 37 °C mit 1,5 µg des Kofaktors NADPH (10 µl) und 0,05 U Nitratreduktase (10 µl) inkubiert, um entstandenes Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, da nur Nitrit photometrisch mit Griess-Reagenz nachzuweisen ist [140].



**Abb. 11: Nachweis von Nitrit mit Griess-Reagenz**  
(modifiziert nach [141])

Nach der Reduktion wurden die Proben mit 100 µl bzw. 120 µl Griess-Reagenz für 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 550 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die Farbentwicklung ist proportional zur Nitritkonzentration.

### 4.2.10.4. Harnstoff-Nachweis

Um die Harnstoffkonzentration in Kulturüberständen zu bestimmen, wurden 400 µl eines Säuregemischs aus H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O (1:3:7 v/v) zu 25 µl Kulturüberstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Als Standard wurde eine Eichkurve im Bereich von 1,95 µg/ml bis

500 µg/ml Harnstoff vorbereitet. Zu den Proben und Standardlösungen wurden 25 µl  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (9 % gelöst in 100 % Ethanol) zugegeben, 30 s gut gemischt und dann für 60 min bei 100 °C inkubiert. Je nach Harnstoffkonzentration bildet sich in diesem Reaktionsschritt eine violette Farbreaktion unterschiedlicher Intensität aus. Anschließend wurden 2 x 100 µl aus den 1,5 ml Reaktionsgefäßen in eine Platte mit 96 Kavitäten überführt und die Absorption bei 550 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Farbentwicklung ist proportional zur Harnstoffkonzentration.

#### **4.2.10.5. Bestimmung der Arginaseaktivität**

Die Arginaseaktivität wurde anhand eines Harnstofftests (siehe 4.2.10.4.) in Anlehnung an eine etablierte Methode quantifiziert [142]. Die Arginaseaktivität wurde in den Zelllysaten von Makrophagen und duodenalen Biopsien bestimmt. Die bei -80 °C gelagerten Biopsien wurden bei 4 °C aufgetaut und in 400 µl 0,1 % Triton X-100 Lösung aufgenommen. Jede Probe wurde 20-30 s mit einem elektrischen Mörser zerkleinert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Tris-HCl (25 mM, beinhaltet 5 mM  $MnCl_2$ , pH 7,4) in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Die Makrophagenlysate wurden aufgetaut und bei 3900 x g, 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Von jedem Lysat wurden 25 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Erhitzen auf 56 °C für 10 min in einem Wasserbad wurde die Arginase durch Bindung des  $Mn^{2+}$  (enthalten im Tris-HCl) an das Enzym aktiviert. Nachdem zu den Lysaten je 25 µl L-Arginin (0,5 M, pH 9,7) gegeben wurde, erfolgte die Arginin-Hydrolyse bei 37 °C für 60 min im Brutschrank. Die Reaktion wurde mit 400 µl eines Säuregemischs aus  $H_2SO_4$  :  $H_3PO_4$  :  $H_2O$  (1:3:7 v/v) gestoppt und die Harnstoffproduktion, wie in 4.2.10.4. beschrieben, bestimmt. Eine Einheit der Enzym-Aktivität (Unit, U) ist definiert durch die Menge an Arginase, die benötigt wird um 1 µM Arginin pro Minute zu hydrolysieren. Die Arginaseaktivität wurde anschließend auf den Proteingehalt der Makrophagenlysate bzw. auf das Gewicht der Biopsie bezogen.

#### **4.2.10.6. Bestimmung der Arginaseaktivität im Plasma**

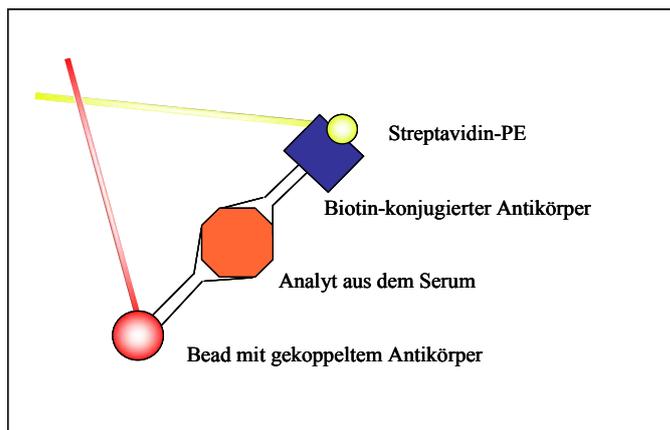
Plasma von gesunden Kontrollen und Patienten wurde aufgetaut und 1:1 mit Tris-HCl verdünnt. Für jede Probe wurde der Harnstoffgehalt mit und ohne Argininhydrolyse bestimmt (siehe 4.2.10.4./5.). Der Harnstoffgehalt, welcher sich grundsätzlich im Serum befand, wurde von der Harnstoffkonzentration nach der Argininhydrolyse abgezogen und die Arginaseaktivität (U/ml Serum) berechnet.

#### 4.2.11. *Messung von Zytokinen, Chemokinen und Immunglobulinen in humanen Blutseren, Biopsie- und Kulturüberständen*

Mit dem FlowCytomix Kit (Bender MedSystems) und dem Cytometric Bead Array (CBA) von Becton Dickinson (BD) sind quantitative Analysen von löslichen Komponenten des Immunsystems, wie Zytokinen, Chemokinen und Immunglobulinen, mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich.

##### 4.2.11.1. Zytokinmessungen mit FlowCytomix Kit

Das System basiert auf dem Prinzip des Sandwich-Immunoassays. Die spezifischen Antikörper werden über ihre Fc-Teile an Polystyrol-Mikropartikel (synthetische Kügelchen mit Fluoreszenzfarbstoff im Inneren) gekoppelt. Mit den Fab-Teilen werden die gewünschten löslichen Substanzen gebunden. Ein weiterer biotinkonjugierter Antikörper, der ein anderes Epitop derselben Substanz bindet, wird zur Detektion eingesetzt. Für die Analyse im Durchflusszytometer wird an das Biotin PE markiertes Streptavidin gekoppelt (Abb. 12).



**Abb. 12: Schema des FlowCytomix Systems [143]**

Die Mikropartikel emittieren das Licht bei 690 nm, während PE bei 578 nm sein Emissionsmaximum erreicht. Es wurden Mikropartikel mit zwei verschiedenen Größen verwendet: Größe A hat einen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  und Größe B von 4  $\mu\text{m}$ . Für beide Mikropartikelgrößen werden unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten angeboten. Größe A ist in elf und Größe B in neun Fluoreszenzstärken erhältlich. So ist es möglich, bis zu 20 verschiedene lösliche Substanzen gleichzeitig zu detektieren. Die Analyse der Proben wurde mit einem Durchflusszytometer (FACS Calibur) vorgenommen. Im FSC und SSC wurden die Mikropartikel hinsichtlich ihrer Größe identifiziert, je mit einem Feld (A und B) markiert und dann die Fluoreszenzintensitäten in den Kanälen FL-2 (578 nm) und FL-3 (690 nm) aufgezeichnet.

Aus der Anzahl spezifisch leuchtender Mikropartikel und der simultanen Messung der durch PE hervorgerufenen Emission pro Mikropartikel, lässt sich mittels Standardverdünnungsreihe

einer definierten Zytokinmischung die Zytokinkonzentration in den Seren und Biopsie-Überständen bestimmen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowCytomix Pro 2.2 Software. Der Versuch wurde in einer Filterplatte mit 96 Kavitäten durchgeführt. Dies bietet den Vorteil, dass die Flüssigkeit nach den Inkubations- und Waschschritten mit einer Vakuumpumpe abgesaugt werden konnte. Da die Probe auf dem Filter verbleibt, wird der Analytverlust bei den Waschschrritten minimiert. Vor Versuchsbeginn wurde die Filterplatte mit 100 µl „Assaypuffer“ äquilibriert.

Insgesamt wurden sieben Zytokine, vier Chemokine und fünf Immunglobulinklassen in humanem Serum und in Biopsieüberständen gemessen (Tab. 15).

**Tab. 15: Übersicht der nachgewiesenen Zytokine, Chemokine und Immunglobulinklassen in Seren und Biopsie-Überständen**

Zytokin	Beadpopulation	Nachweisgrenze in pg/ml	Nachweissystem
TGF-β	A3	10,0	FlowCytomix
CCL-2	A7	18,2	FlowCytomix
CCL-3	A9	1,0	FlowCytomix
CCL-4	A5	1,0	FlowCytomix
CXCL-9	B4	0,9	FlowCytomix
IL-1β	B4	2,3	CBA
IL-4	A5	1,4	CBA
IL-6	A7	1,6	CBA
IL-10	B7	0,13	CBA
IL-17a	B5	0,3	CBA
TNF $\alpha$	D9	0,7	CBA
IFN $\gamma$	E7	1,8	CBA
IgG1	C4	150	CBA
IgG2	C5	850	CBA
IgG4	C7	80	CBA
IgM	C8	60	CBA
IgA	C9	7350	CBA

Die bei -20 °C gelagerten Biopsieüberstände und Serumproben wurden bei 4 °C ü. N. aufgetaut. Im Gegensatz zu den anderen Zytokinen musste zur Messung von TGF-β die Probe mit Säure vorbehandelt werden, um latentes TGF-β in seine aktive Form umzuwandeln. Daher war es notwendig TGF-β in einem separaten Ansatz zu messen. Zu diesem Zweck wurden je 20 µl Probe in ein Reaktionsgefäß überführt, 1:10 mit „Assaypuffer“ verdünnt und für eine Stunde mit 20 µl 1 N HCl bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit 20 µl 1 N Natriumhydroxid (NaOH) neutralisiert. Aus diesen Ansätzen wurden je 25 µl in eine Filterplatte überführt. Für alle anderen Zytokine wurden je 25 µl unverdünntes Serum oder Biopsieüberstand in Filterplatten überführt. Für jedes Experiment wurde eine Standardverdünnungsreihe aller zu messenden Faktoren in Duplikaten angefertigt. Dazu

wurde der lyophilisierte Standard gemäß Herstellerangaben mit destilliertem Wasser aufgefüllt und in sieben Stufen jeweils um den Faktor 20 verdünnt. Je 25 µl Standardlösung wurden in die ersten beiden Reihen der Filterplatte pipettiert. Die spezifischen Mikropartikel wurden 1:20 mit Reagenzverdünnungspuffer (*Reagent Diluent Buffer*, RDB) verdünnt und je 25 µl in jede Kavität gegeben. Dann wurden die Biotin-Konjugate 1:20 mit RDB verdünnt und 50 µl zu jeder Kavität hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Platte mit lichtundurchlässiger Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte mit „Assaypuffer“ gewaschen und mit der Vakuumpumpe abgesaugt. Für die zweite Inkubation wurden 100 µl „Assaypuffer“ in jede Kavität vorgelegt. Das Streptavidin-PE-Konzentrat wurde im Verhältnis 1:31,25 mit „Assaypuffer“ verdünnt und davon je 50 µl in jede Kavität gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Platte erneut gewaschen, die Proben in 200 µl „Assaypuffer“ aufgenommen und für die Messung im Durchflusszytometer in Rundbodenröhrchen überführt.

#### **4.2.11.2. Zytokinmessungen mit dem Cytometric Bead Array von BD**

Mit dem CBA von BD können ebenfalls bis zu 30 Proteine simultan nachgewiesen werden. Die Funktionsweise ist dem FlowCytomix sehr ähnlich. Der Unterschied besteht darin, dass der PE gekoppelte Detektionsantikörper direkt und spezifisch an das am Polystyrol-Mikropartikel gebundene Protein bindet.

Die bei -20 °C gelagerten Biopsieüberstände und Serumproben wurden bei 4 °C ü. N. aufgetaut. Für jedes Experiment wurde eine Standardverdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurden die lyophilisierten Standardkugeln von jedem zu messenden Protein in ein 15 ml Röhrchen überführt und in 4 ml „Assay Diluent“ gelöst und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Standardverdünnungsreihe mit dem Faktor zwei hergestellt. Als Nullwert diente eine Probe mit „Assay Diluent“. Je 20 µl Standardlösung und 20 µl Probe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die spezifischen Mikropartikel wurden 1:20 mit „Bead Diluent“ verdünnt und je 20 µl in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Reaktionsgefäße im Dunkeln für eine Stunde bei RT inkubiert. Die spezifischen PE gekoppelten Reportermoleküle wurden 1:20 mit „Detection Diluent“ verdünnt und je 20 µl in alle Reaktionsgefäße überführt und die Proben für weitere zwei Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 1400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 200 µl PBA aufgenommen. Die Analyse der Proben wurde mit dem FACS Calibur vorgenommen und die Daten wurden mit der FCAP Array Software ausgewertet.

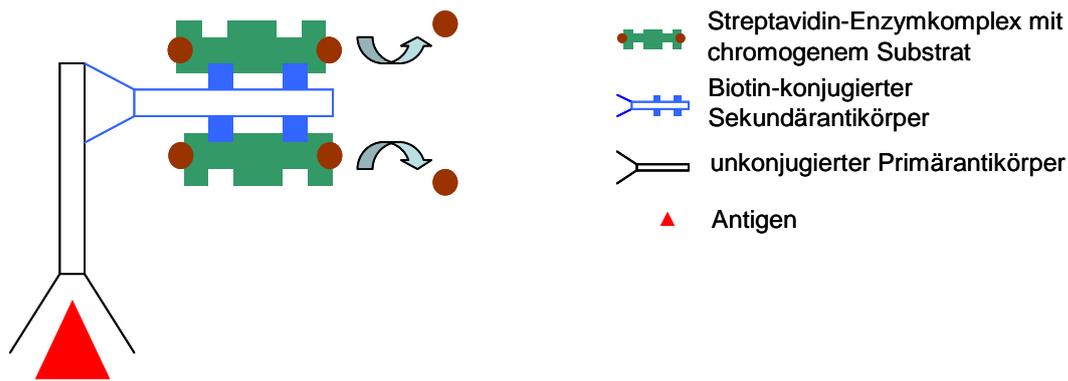
#### 4.2.12. Immunhistochemische Färbungen

Für die Immunhistochemie standen Objektträger mit Dünnschnitten von formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Biopsien des Duodenums von Patienten und Kontrollen zur Verfügung. Zur Entparaffinisierung wurden die Objektträger dreimal für je fünf Minuten in Xylol inkubiert, um dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % - 70 % Ethanol) rehydriert zu werden. Bei der Fixierung der Biopsien mit Formalin kann es zur Konformationsänderung der antigenen Bindungsstellen (Epitope) kommen. Daraus kann ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunreaktivität resultieren. Zur Wiederherstellung der Reaktivität (Demaskierung) der Epitope wurden die Objektträger für zwei Minuten in Zitratpuffer (10 mM, pH 6) in einem Dampfdrucktopf gekocht. Die Färbungen erfolgten in einer Feuchtkammer, damit die Schnitte nicht austrocknen. Es wurden Kontrollen sowohl nur mit Primärantikörper als auch nur mit Sekundärantikörper bei allen Färbungen mitgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab. 16 zusammengestellt.

**Tab. 16: Protokollübersicht der nachgewiesenen Proteine in der Histochemie**

Antigen	Primärantikörper	Verdün- -nung	Inkuba- -tionszeit	Sekundär- -antikörper	Verdün- -nung	Inkuba- -tionszeit
CD68	Maus- $\alpha$ - humanes CD68	1:200	1 h, RT	Esel- $\alpha$ - Maus-Biotin	1:400	30 min, RT
CD163	Maus- $\alpha$ - humanes CD163	1:200	1 h, RT	Esel- $\alpha$ - Maus-Biotin	1:400	30 min, RT
IL-10	Ziege- $\alpha$ - humanes IL-10	1:100	1 h, RT	Esel- $\alpha$ - Ziege-Biotin	1:400	30 min, RT
IL-17	Ziege- $\alpha$ - humanes IL-17	1:50	ü. N., 4 °C	Esel- $\alpha$ - Ziege-Biotin	1:400	30 min, RT
iNOS	Kaninchen- $\alpha$ - humanes iNOS	1:100	1 h, RT	Esel- $\alpha$ - Kaninchen- Biotin	1:400	30 min, RT
Stab-1	Kaninchen- $\alpha$ - humanes Stab-1	1:100	1 h, RT	Esel- $\alpha$ - Kaninchen- Biotin	1:400	30 min, RT

Alle Reagenzien wurden entsprechend Tab. 16 in Antikörperverdünnungspuffer verdünnt und je 50  $\mu$ l auf jeden Schnitt aufgetragen. Um die Signalstärke zu erhöhen, wurden für alle Färbungen biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, die im nächsten Schritt mit einem Streptavidin-Enzymkomplex reagierten. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und kann so die Farbreaktion des Substrates um ein Vielfaches erhöhen (Abb. 13).



**Abb. 13: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung**

Als Enzym diente Alkalische Phosphatase (AP, 1:400; 30 min, RT), die an das Streptavidin gekoppelt war. Als Substrat wurde das Real Detektionskit von Dako gemäß den Vorgaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss an die Antigenfärbung wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin (modifiziert nach Gill, 10 s) vorgenommen. Zur Konservierung und Lagerung der Präparate wurden die Schnitte mit Hilfe von Glyceringelatine mit einem Deckgläschen versehen. Nach dem Aushärten des Einbettmediums wurden jeweils zehn Gesichtsfelder (je 0,237mm<sup>2</sup>) unter dem Lichtmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt.

#### 4.2.13. Software

**Tab. 17: Verwendete Software**

Software	Hersteller
Cellquest pro	BD, Heidelberg, DE
FCAP Array 1.0	BD, Heidelberg, DE
FlowCytomix Pro 2.2	Bendermed Systems, AT
FlowJo 8.8.4	TreeStar, Ashland, US
GraphPad Prism 5	GraphPad, La Jolla, US
SoftMax Pro 4.8.	Molecular Devices, Chicago, US

#### 4.2.14. Statistik

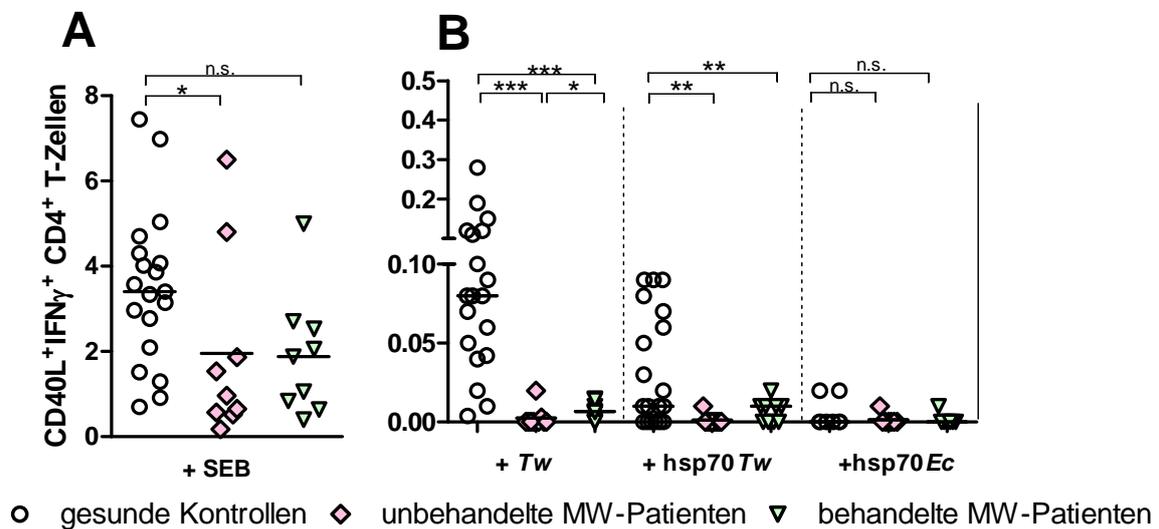
Für die grafische Darstellung wurden Balken- und Einzelpunktdiagramme mit einer gruppenspezifischen Farbgestaltung gewählt. Alle in dieser Arbeit dargestellten Diagramme, die eine Ratio darstellen, wurden als Mittelwert mit dem Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) abgebildet. Die meisten Daten wurden einer einfachen Varianzanalyse mittels Mann Whitney-U-Test unterzogen. Bei einigen Experimenten konnten paarige Daten gemessen werden (gleicher Patient vor und nach Behandlung); diese wurden einer Varianzanalyse mit einem Wilcoxon-Test unterzogen. Bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem DUNN-Test verwendet.

Der Referenzbereich wurde auf 95 % festgelegt (95 % der Messwerte befinden sich im Referenzbereich). Ein Stern in den Diagrammen kennzeichnet jeweils signifikante Unterschiede, dies entspricht einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Zwei Sterne entsprechen  $p < 0,01$  und drei Sterne einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ .

## 5. Ergebnisse

### 5.1. $IFN\gamma$ Produktion von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen nach Antigenstimulation im Vollblut

Um das Vorhandensein von *T. whipplei*-spezifischen Th1 Zellen zu untersuchen, wurde frisches Heparinblut von gesunden Kontrollen und MW-Patienten mit unterschiedlicher Behandlungsdauer mit SEB, *T. whipplei*-Lysat (*Tw*) und den rekombinant hergestellten hsp70 von *T. whipplei* (*hsp70Tw*) und *E. coli* (*hsp70Ec*) über sechs Stunden stimuliert und die intrazelluläre  $IFN\gamma$  Produktion der  $CD4^+$  T-Zellen bestimmt.



#### Abb. 14: $IFN\gamma$ Produktion von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen im Vollblut nach Antigenstimulation

Frisches Heparinblut von gesunden Kontrollen und MW-Patienten wurde für sechs Stunden mit SEB (A), *T.w.* und den rekombinant hergestellten hsp70 Proteinen von *T.w.* und *E. coli* (B) stimuliert, in den letzten drei Stunden der Stimulation wurde Brefeldin A zugegeben. Danach wurden die  $CD4^+$ T-Zellen auf ihre Expression von CD40L und  $IFN\gamma$  im Durchflusszytometer untersucht und der Prozentsatz doppelt positiver Zellen bestimmt. Abgebildet sind die Einzelergebnisse mit dem Median und die MW-Patienten jeweils vor und nach Therapie (paarig). Als statistische Tests wurde Mann Whitney-U-Test und der Wilcoxon-Test für paarige Datensätze verwendet. *Tw* = *T. whipplei*, hsp70 = Hitzeschockprotein 70, *Ec* = *E. coli*

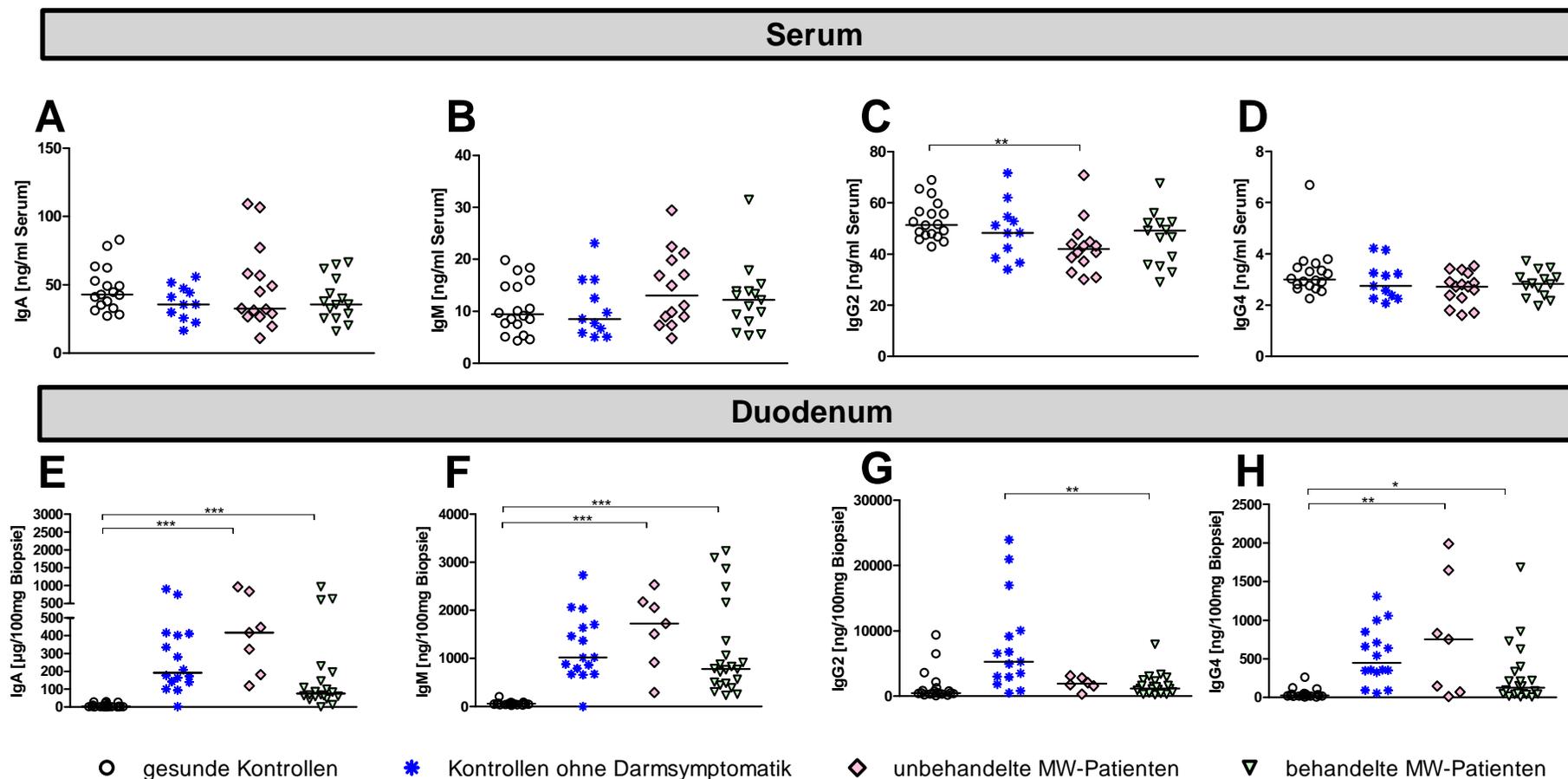
Um die funktionelle Aktivität der T-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen als Positivkontrolle mit SEB stimuliert. Dabei zeigte sich bei unbehandelten MW-Patienten ein verringerter Prozentsatz von  $CD40L^+IFN\gamma^+$  innerhalb der  $CD4^+$ T-Zellen im Vollblut (Abb. 14.A). Stimulierte man die Zellen mit *T. whipplei*, zeigten  $CD4^+$ T-Zellen der MW-Patienten einen verminderten Prozentsatz  $CD40L^+IFN\gamma^+$  der  $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen unabhängig vom Behandlungszustand (Abb. 14.B). Um potentielle Antigene von *T. whipplei* für die Immunabwehr zu ermitteln, wurde mit hsp70 von *T. whipplei* stimuliert. Auch hierbei zeigte sich eine verminderte Th1 Antwort bei den MW-Patienten. Als

Kontrolle wurde die Th1 Antwort gegenüber dem hsp70 von *E. coli* überprüft. Sowohl gesunde Kontrollen als auch MW-Patienten reagierten darauf kaum und es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 14.B). Gegenüber anderen Antigenen, wie z. B. Tetanus Toxoid, Tuberkulin und CMV konnten die MW-Patienten eine effektive Th1 Antwort aufbauen, die mit der Reaktion gesunder Kontrollen vergleichbar war (ohne Abb.) [31].

## 5.2. *Bestimmungen von Immunglobulinen im Serum und Biopsie-Überständen*

Immunglobuline, speziell IgA, sind Hauptabwehrmechanismen gegen Infektionen an den Schleimhäuten. Daher wurden die Immunglobuline IgA, IgM, IgG1, IgG2 und IgG4 in Serumproben und Biopsieüberständen von gesunden Kontrollen und Kontrollen ohne Darmsymptomatik sowie von unbehandelten bzw. behandelten MW-Patienten mit Hilfe eines CBA untersucht.

Im Serum gab es keine Unterschiede in den IgA (Abb. 15.A), IgM (Abb. 15.B), IgG4 (Abb. 15.D) und IgG1 (ohne Abb.) Konzentrationen zwischen MW-Patienten und Kontrollen. Lediglich die IgG2 Konzentration (Abb. 15.C) bei unbehandelten MW-Patienten war im Serum erniedrigt. Im Duodenum war die Konzentration an IgA bei MW-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen erhöht. Vergleicht man hingegen die Kontrollen ohne Darmsymptomatik mit den behandelten MW-Patienten, so war tendenziell eine Abnahme der IgA Konzentration in der Mukosa zu verzeichnen (Abb. 15.E). MW-Patienten wiesen, unabhängig von ihrem Behandlungszustand, höhere Konzentrationen an IgM und IgG4 in Biopsieüberständen auf als gesunde Kontrollen (Abb. 15.F+H). Behandelte MW-Patienten zeigten in der Mukosa erniedrigte Konzentrationen von IgG2 im Vergleich zu Kontrollen ohne Darmsymptomatik (Abb. 15.G).



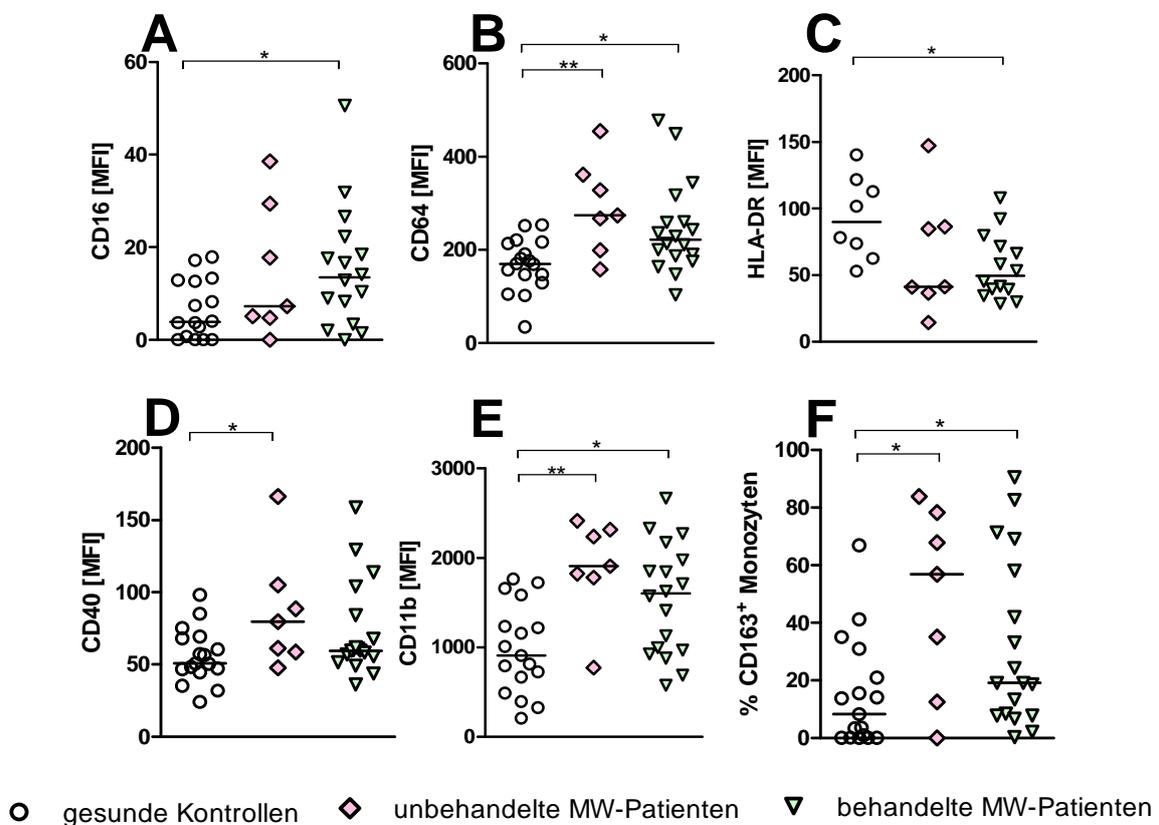
**Abb. 15: Bestimmung von Immunglobulinen in Serumproben und duodenalen Biopsien**

Konzentrationen von IgA (A+E), IgM (B+F), IgG2 (C+G) und IgG4 (D+H) wurden in Serumproben (obere Reihe) und duodenalen Biopsien (untere Reihe) mit Hilfe eines CBA bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden die Daten mit dem Kruskal-Wallis Test mit anschließendem DUNN-Test ausgewertet.

### 5.3. Charakterisierung der Monozyten / Makrophagen ex vivo

#### 5.3.1. Phänotypisierung der Monozyten im Vollblut ex vivo

Da die verringerte *T. whipplei*-spezifische Th1 Immunantwort der MW-Patienten unter anderem an einer gestörten Funktion der APZ liegen könnte, wurde der Phänotyp der Monozyten im peripheren Blut untersucht. Dabei wurde mit Hilfe fluoreszierender Antikörper gegen die Oberflächenstrukturen von CD11b, CD11c, CD16, CD40, CD64, CD80, CD86, CD163, CD206 und HLA-DR die Expression der Moleküle im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 16).



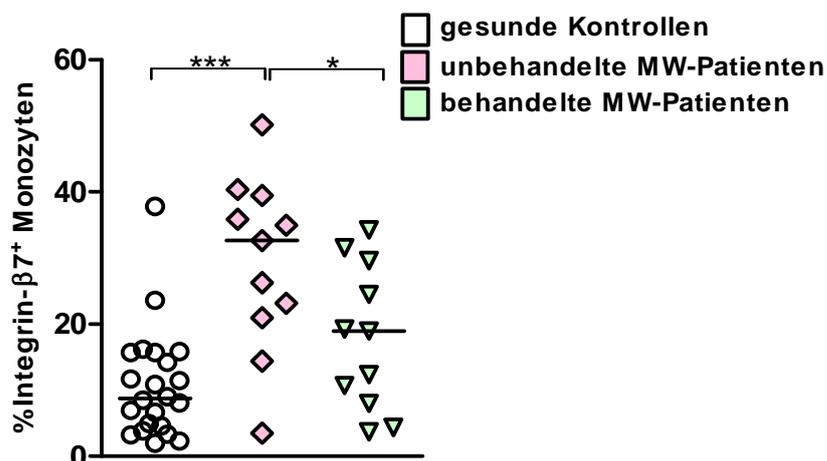
#### Abb. 16: Phänotypisierung der Monozyten im Vollblut ex vivo

Heparinblut von gesunden Kontrollen und MW-Patienten wurde auf die Oberflächenexpression von CD11b, CD11c, CD16, CD40, CD64, CD80, CD86, CD163, CD206 und HLA-DR auf CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der Monozyten/Makrophagenmarker CD68 wurde intrazellulär gemessen. Im FSC/SSC wurden zunächst die Monozyten und anschließend alle CD14<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt. Dargestellt ist die MFI von CD16, CD64, HLA-DR, CD40 und CD11b (A-E) von CD14<sup>+</sup> Monozyten im Vollblut. Der Prozentsatz CD163<sup>+</sup> Zellen wurde auf die gesamten Monozyten bezogen (F). Dargestellt sind die Einzelergebnisse mit dem Median. Als statistischer Test wurde der Mann Whitney-U-Test verwendet. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

Dabei zeigte sich, dass die Expression der Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16 und CD64 bei Monozyten von behandelten MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht war (Abb. 16.A-B). Monozyten unbehandelter MW-Patienten zeigten eine erhöhte Expression

von CD40 (Abb. 16.D). Die Expression des Integrins CD11b war bei MW-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen erhöht, unabhängig vom Behandlungszustand der MW-Patienten (Abb. 16.E). Des Weiteren konnte ein erhöhter Prozentsatz CD163<sup>+</sup> Monozyten bei MW-Patienten festgestellt werden (Abb. 16.F). Bereits zwei Stunden nach der Blutentnahme beginnt regelmäßig eine leichte, aber kontinuierliche Zunahme der Expressionsdichte von HLA-DR [144]. Daher wurde für die Analyse der HLA-DR Expression ausschließlich ein Tag altes Blut von MW-Patienten und gesunden Kontrollen verwendet, da das Probenmaterial der MW-Patienten aus organisatorischen Gründen erst einen Tag nach der Abnahme zur Verfügung stand. Monozyten von behandelten MW-Patienten zeigten eine verminderte HLA-DR Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 16.C). Die Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD11c, CD68, CD80, CD86 und CD206 war bei MW-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (ohne Abb.).

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Monozyten von MW-Patienten ein verstärktes Potential besitzen, in den Darm einzuwandern, da dort die Infektion mit dem Erreger *T. whipplei* stattfindet. Dazu wurden periphere Blutmonozyten von MW-Patienten und gesunden Kontrollen auf die Expression des Darm-*homing* Markers Integrin- $\beta$ 7 untersucht. Es zeigte sich, dass unbehandelte MW-Patienten eine höhere Frequenz von Integrin- $\beta$ 7<sup>+</sup> Monozyten im Blut besitzen als gesunde Kontrollen. Nach Antibiotikatherapie nahm der Prozentsatz der Integrin- $\beta$ 7<sup>+</sup> Monozyten wieder ab (Abb. 17).



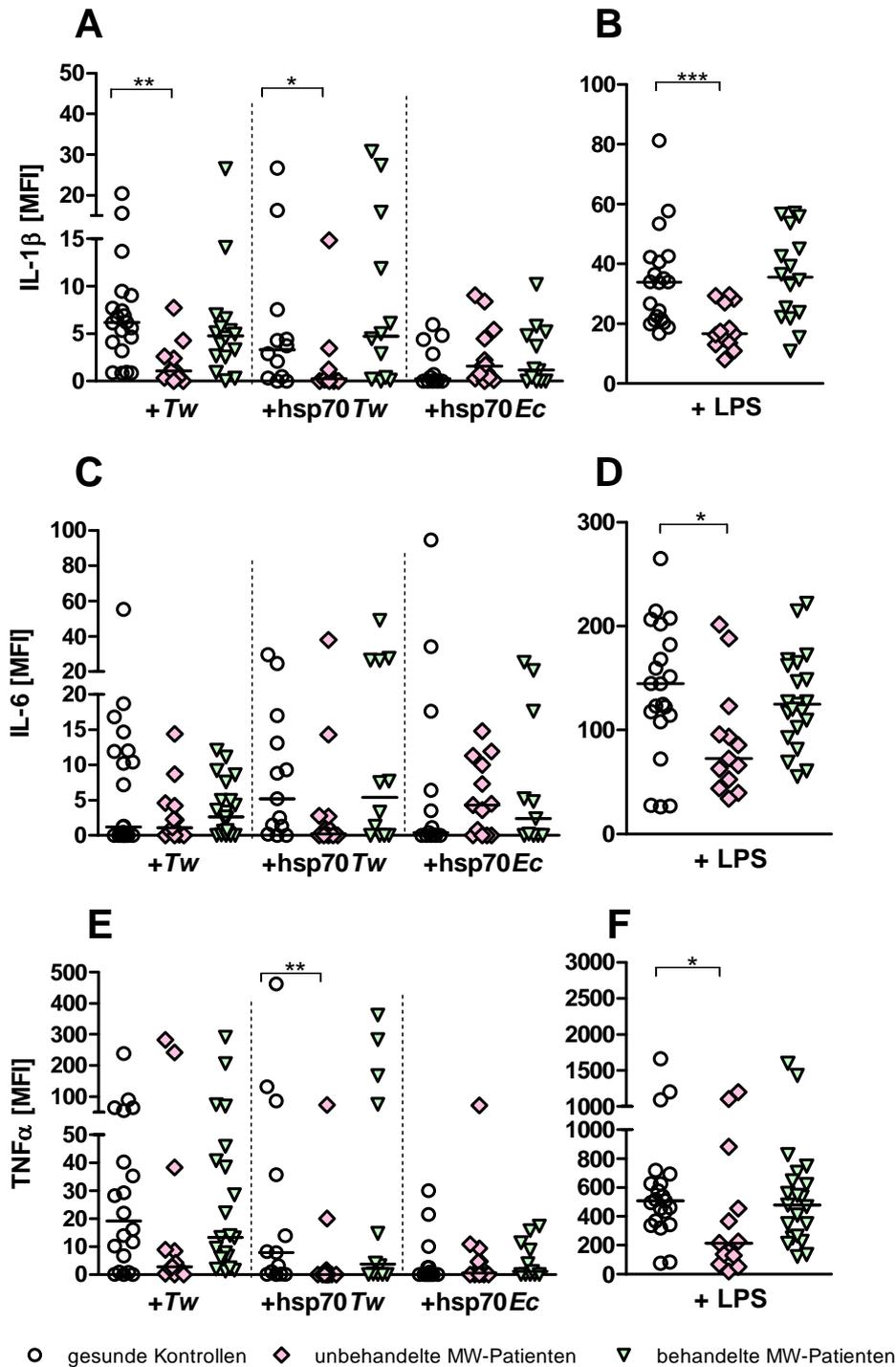
**Abb. 17: Messung des Darm-*homing* Markers Integrin- $\beta$ 7 auf Monozyten im Vollblut**

Heparinblut von gesunden Kontrollen und MW-Patienten wurde auf die Oberflächenexpression von Integrin- $\beta$ 7 auf CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Monozyten, die Integrin- $\beta$ 7 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

### **5.3.2. Nachweis intrazellulärer Zytokinproduktion von Monozyten nach Antigenstimulation**

Da die Phänotypisierung der Monozyten im Vollblut zeigte, dass bei MW-Patienten ein erhöhter Prozentsatz CD163<sup>+</sup>, alternativ aktivierter Monozyten vorlag, sollte überprüft werden, ob sich die Monozyten von MW-Patienten und gesunden Kontrollen auch in der Zytokinproduktion nach Antigenstimulation unterscheiden. Dazu wurde frisches Vollblut mit *T. whipplei*, hsp70 von *T. whipplei*, hsp70 von *E. coli*, GST und LPS für sechs Stunden inkubiert und die intrazelluläre Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1ra von Monozyten bestimmt.

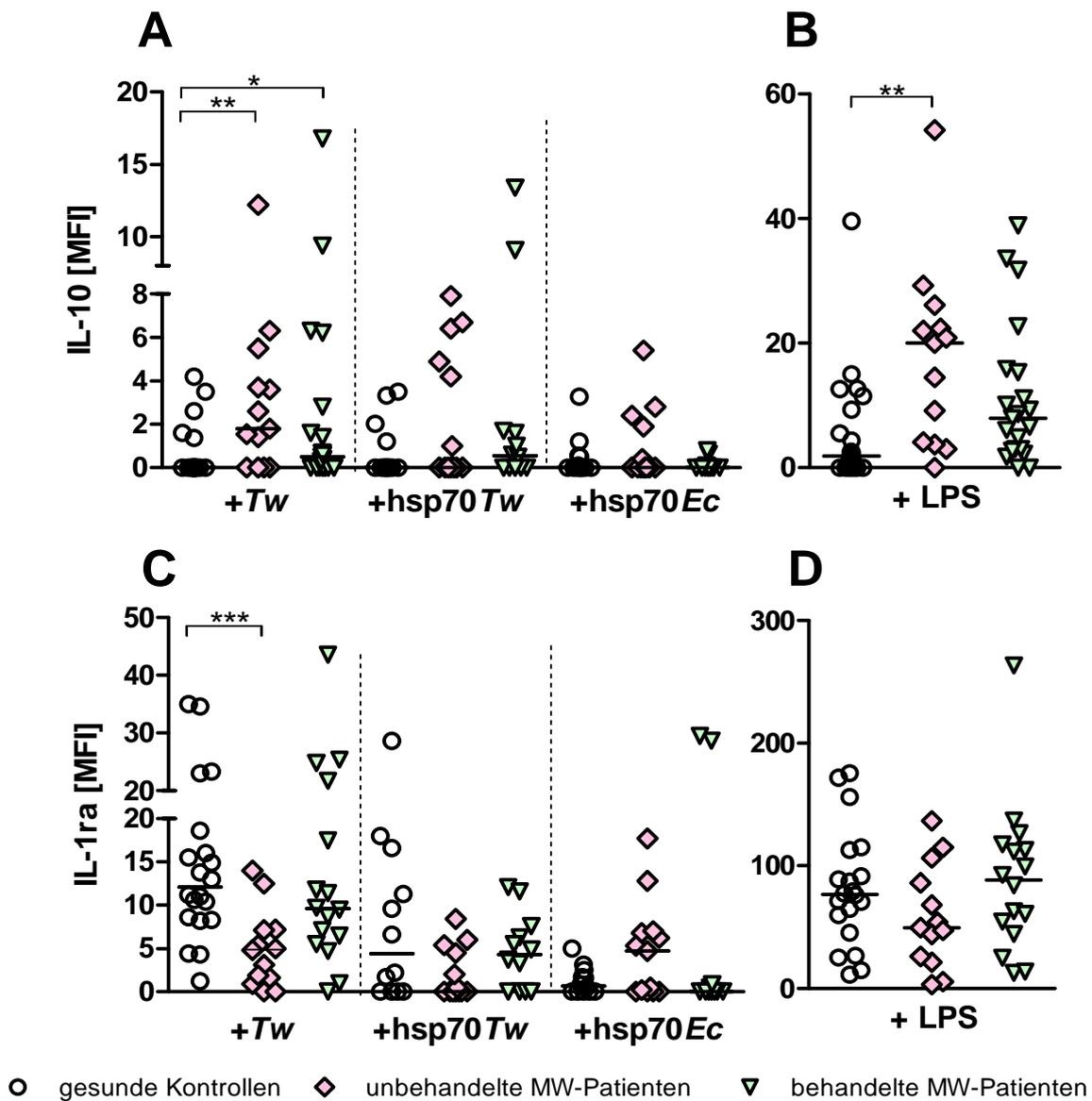
Monozyten von unbehandelten MW-Patienten zeigten eine deutlich verminderte IL-1 $\beta$  Produktion nach Stimulation mit *T. whipplei*, hsp70 von *T. whipplei* und LPS, wobei Monozyten behandelter Patienten vergleichbar Mengen an IL-1 $\beta$  nach Antigenstimulation produzierten wie Monozyten gesunder Kontrollen (Abb. 18.A+B). Das hsp70 von *E. coli* stimulierte in Monozyten bei MW-Patienten und gesunden Kontrollen ähnliche Mengen an IL-1 $\beta$ . Eine verringerte IL-6 Expression zeigten Monozyten unbehandelter MW-Patienten nur nach Stimulation mit LPS (Abb. 18.D). *T. whipplei* und die hsp70 Proteine von *T. whipplei* und *E. coli* verursachten keine unterschiedlich hohen Expressionen von IL-6 (Abb. 18.C). Zusätzlich war die TNF $\alpha$  Produktion in Monozyten unbehandelter MW-Patienten nach Stimulation mit *T. whipplei* und hsp70 von *T. whipplei* im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt (Abb. 18.E+F). Das hsp70 von *E. coli* stimulierte in Monozyten bei MW-Patienten und gesunden Kontrollen ähnliche Mengen an TNF $\alpha$  (Abb. 18.E).



### Abb. 18: Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten nach Antigenstimulation

Frisches Vollblut wurde für sechs Stunden mit *Tw*, *hsp70Tw*, *hsp70Ec*, GST und LPS stimuliert. Monozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität im FCS und SSC identifiziert. Die Expression von IL-1 $\beta$  (A+B), IL-6 (C+D) und TNF $\alpha$  (E+F) wurde für CD14<sup>+</sup> Monozyten bestimmt. Messergebnisse von unstimulierten Kontrollansätzen wurden von allen Stimulationen abgezogen. Zusätzlich wurden die Werte der Stimulation mit GST von den beiden *hsp70* Stimulationen abgezogen. Dargestellt sind die Einzelergebnisse mit dem Median. Als statistischer Test wurde der Mann Whitney-U-Test verwendet. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *Tw* = *T. whipplei*, *hsp70* = Hitzeschockprotein 70, *Ec* = *E. coli*

In Abb. 19 ist die intrazelluläre Produktion anti-inflammatorischer Zytokine von Monozyten nach Antigenstimulation dargestellt. Monozyten von MW-Patienten zeigten eine erhöhte Produktion von IL-10 nach Stimulation mit *T. whipplei* und LPS unabhängig vom Behandlungszustand (Abb. 19.A-B). Die hsp70 Konstrukte von *T. whipplei* und *E. coli* induzierten eine ähnlich hohe Expression von IL-10 bei gesunden Kontrollen und MW-Patienten (Abb. 19.A-B).

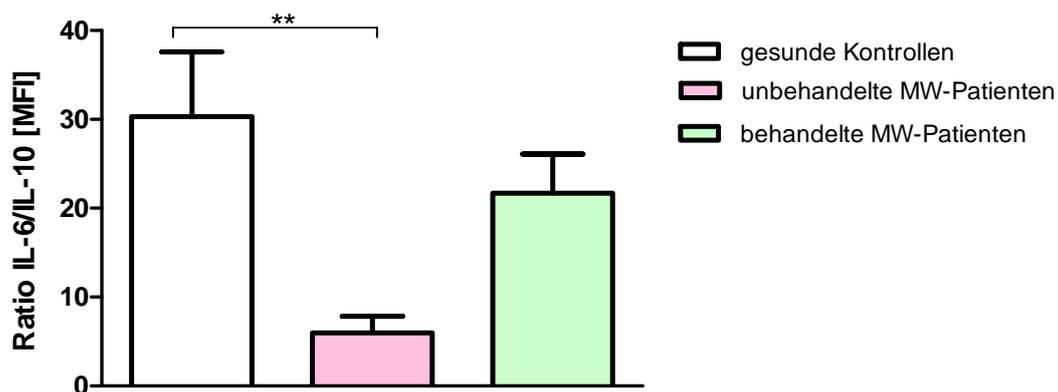


**Abb. 19: Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten nach Antigenstimulation**

Frisches Vollblut wurde für sechs Stunden mit *Tw*, hsp70*Tw*, hsp70*Ec*, GST und LPS stimuliert. Die Monozyten wurden anhand ihrer Größe und Granularität im FCS und SSC identifiziert. Die Expression von IL-10 (A+B), und IL-1ra (C+D) wurde in CD14<sup>+</sup> Monozyten bestimmt. Messergebnisse aus unstimulierten Kontrollansätzen wurden von allen Stimulationen abgezogen, zusätzlich wurden die Werte der Stimulation mit GST von den beiden hsp70 Stimulationen abgezogen. Dargestellt sind die Einzelergebnisse mit dem Median. Als statistischer Test wurde der Mann Whitney-U-Test verwendet. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität, *Tw* = *T. whipplei*, hsp70 = Hitzeschockprotein 70, *Ec* = *E. coli*

Die Analyse von IL-1ra ergab bei Monozyten unbehandelter MW-Patienten dagegen eine verringerte Produktion von IL-1ra auf *T. whipplei* im Vergleich zu behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollen (Abb. 19.C-D). Eine vergleichbare Expression von IL-1ra zeigten Monozyten von gesunden Kontrollen und MW-Patienten nach Stimulation mit den hsp70 Konstrukten von *T. whipplei* und *E. coli* sowie nach LPS Stimulation (Abb. 19.C-D).

Um ein Verständnis dafür zu bekommen, in welche Richtung die Immunantwort bei MW-Patienten nach einer Antigenstimulation verschoben ist, wurde exemplarisch in Abb. 20 die Ratio zwischen IL-6 und IL-10 Produktion von Monozyten nach LPS Stimulation gebildet. Monozyten gesunder Kontrollen zeigten eine pro-inflammatorische Immunantwort mit einer vermehrten Produktion von IL-6 nach LPS Stimulation, wohingegen die Monozyten unbehandelter MW-Patienten eine anti-inflammatorische Reaktion zeigten, die in Richtung IL-10 Produktion verschoben war (Abb. 20).



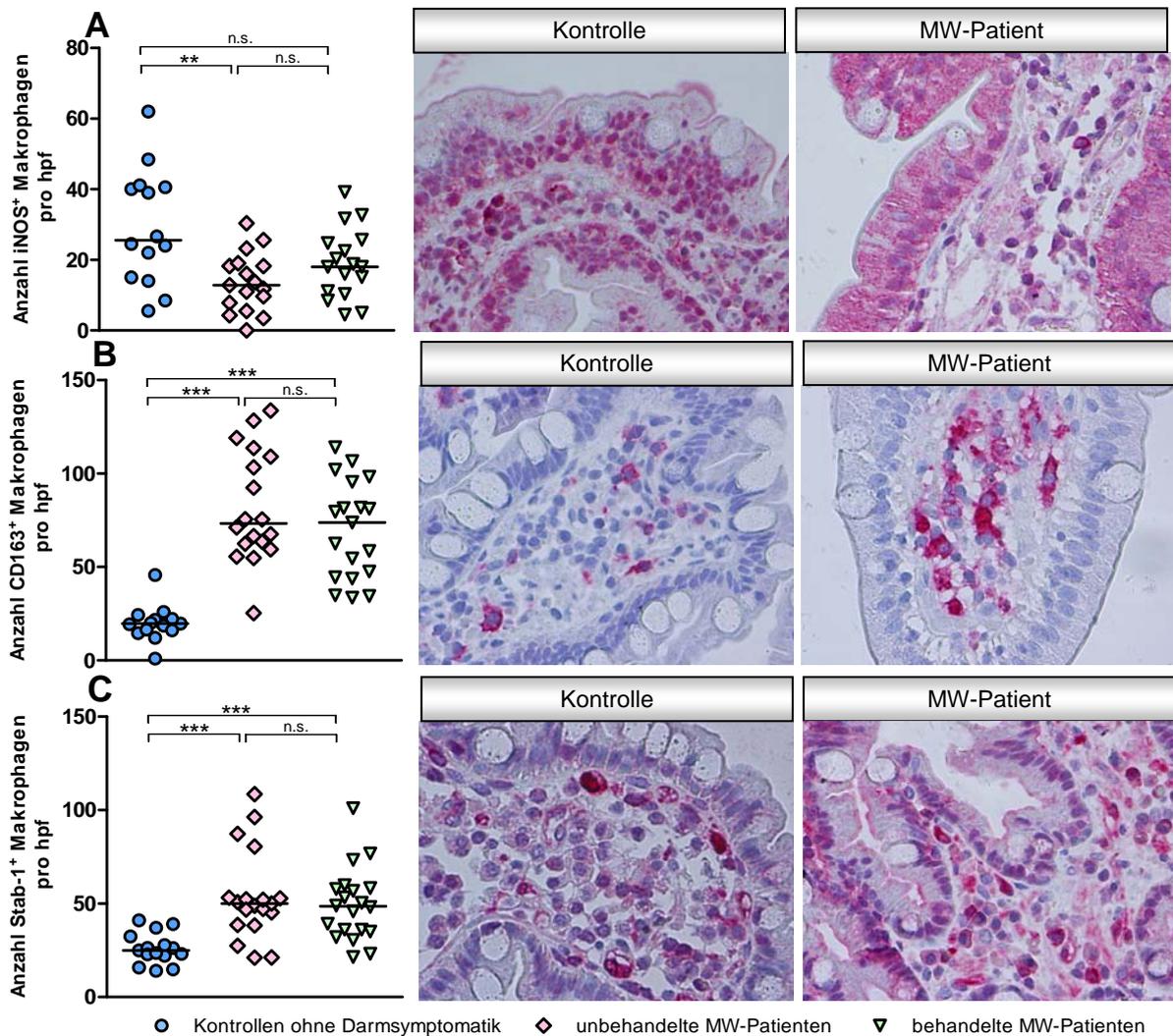
**Abb. 20: Ratio zwischen IL-6 und IL-10 Produktion in Monozyten nach LPS Stimulation**  
MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

### 5.3.3. Phänotypisierung der Makrophagen im Duodenum

Für die Charakterisierung von M1 und M2 Makrophagen in der Lamina propria wurden Dünnschnitte formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter duodener Proben in der Immunhistochemie mit Hilfe von Antikörpern gegen CD68, iNOS, Stablin-1 (Stab-1), CD163, IL-17 und IL-10 gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop die Anzahl positiver Zellen ausgezählt. CD68 wird von allen humanen Monozyten und Gewebemakrophagen exprimiert [145] und wurde somit für die Identifikation der Makrophagen verwendet.

Die Oberflächenmoleküle CD163, iNOS, und Stab-1 werden hauptsächlich von Makrophagen exprimiert, wobei CD163 und Stab-1 charakteristisch für alternativ aktivierte Makrophagen sind und durch Glukokortikoide, IL-4, IL-10 und IL-13 induziert werden können.

iNOS wird durch  $\text{IFN}\gamma$  hochreguliert und charakterisiert daher die klassische/M1 Makrophagenaktivierung.

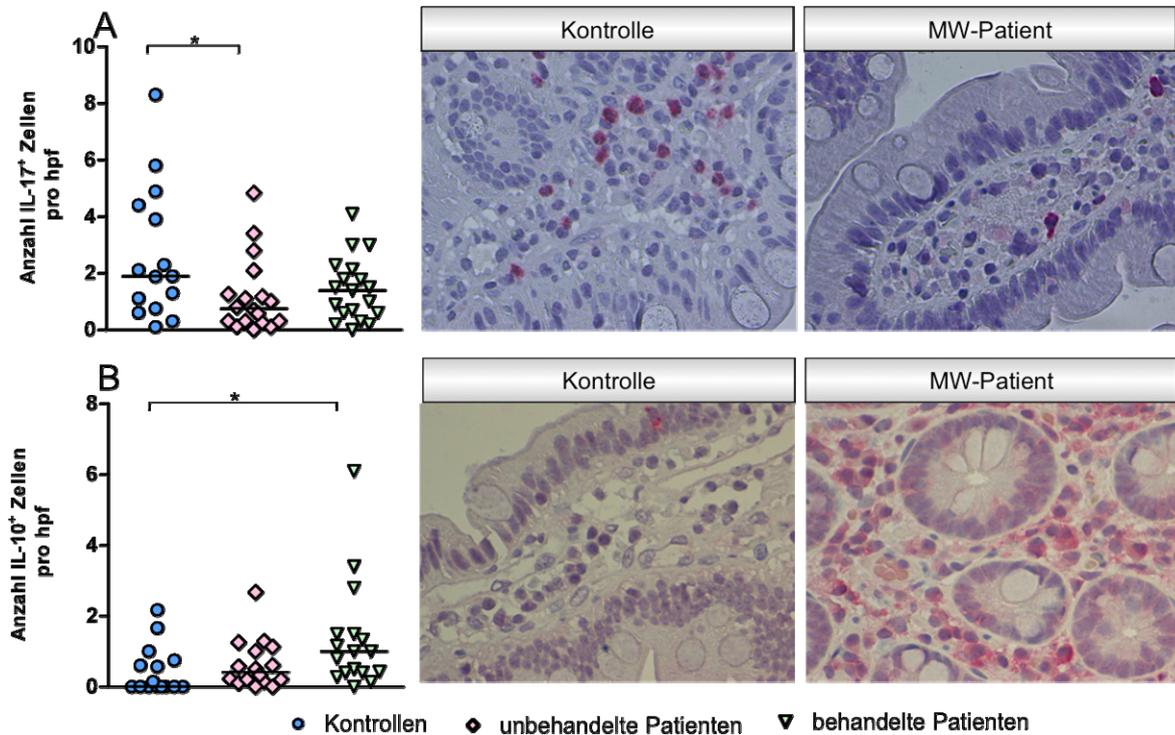


### Abb. 21: Phänotypisierung der Makrophagen in der Lamina propria

Makrophagen in der Lamina propria wurden mittels Immunhistochemie mit Antikörpern gegen iNOS (A), CD163 (B) und Stab-1 (C) angefärbt und im Lichtmikroskop die Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld (hpf, *high power field*) bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Positive Zellen sind in rot dargestellt. Insgesamt wurden zehn Gesichtsfelder pro Schnitt ausgezählt und der Median gebildet. Als statistischer Test wurde der Mann Whitney-U-Test verwendet.

Bei MW-Patienten konnte eine erhöhte Anzahl Stab-1 und CD163 positiver Makrophagen (Abb. 21.B-C) in der Lamina propria im Vergleich zu Kontrollen ohne Darmsymptomatik festgestellt werden. Die Anzahl iNOS positiver Makrophagen im Duodenum unbehandelter MW-Patienten (Abb. 21.A) war im Vergleich zu Kontrollen verringert, wobei die Anzahl CD68<sup>+</sup> Makrophagen bei Kontrollen ohne Darmsymptomatik und MW-Patienten vergleichbar war (ohne Abb.). Der Behandlungsstatus der Patienten hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von M1 und M2 Makrophagen in der Lamina propria.

Um einen Einblick in das umgebende Milieu der Makrophagen in der Lamina propria zu bekommen, wurden die funktionell relevanten Zytokine IL-17 und IL-10 in der Immunhistochemie nachgewiesen.



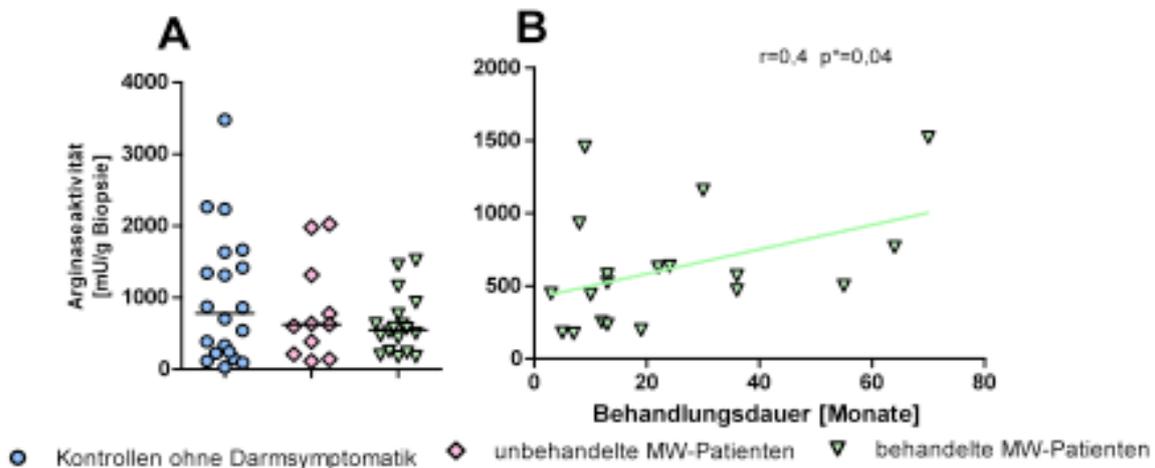
#### Abb. 22: Zytokinmilieu in der Lamina propria

Die Zytokine IL-17 (**A**) und IL-10 (**B**) wurden in der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen IL-17 und IL-10 angefärbt und unter dem Lichtmikroskop die Anzahl positiver Zellen pro hpf bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Positive Zellen sind in rot dargestellt. Insgesamt wurden zehn Gesichtsfelder pro Schnitt ausgezählt und der Median gebildet. Als statistischer Test wurde der Mann Whitney-U-Test verwendet.

Immunhistochemische Färbungen ergaben, dass unbehandelte MW-Patienten in der Lamina propria eine geringere Anzahl IL-17 positiver Zellen (Abb. 22.A) aufwiesen als Kontrollen ohne Darmsymptomatik. Die Anzahl IL-10 positiver Zellen (Abb. 22.B) war hingegen in der Lamina propria von behandelten MW-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ohne Darmsymptomatik erhöht. Es konnte mittels Immunhistochemie keine Produktion von IL-17 durch Makrophagen nachgewiesen werden.

### 5.3.4. Harnstoff und Nitrit-Nachweis im Duodenum

Für die funktionelle Unterscheidung von M1 und M2 Makrophagen wurde zunächst die Arginaseaktivität in frischen duodenalen Biopsien gemessen.

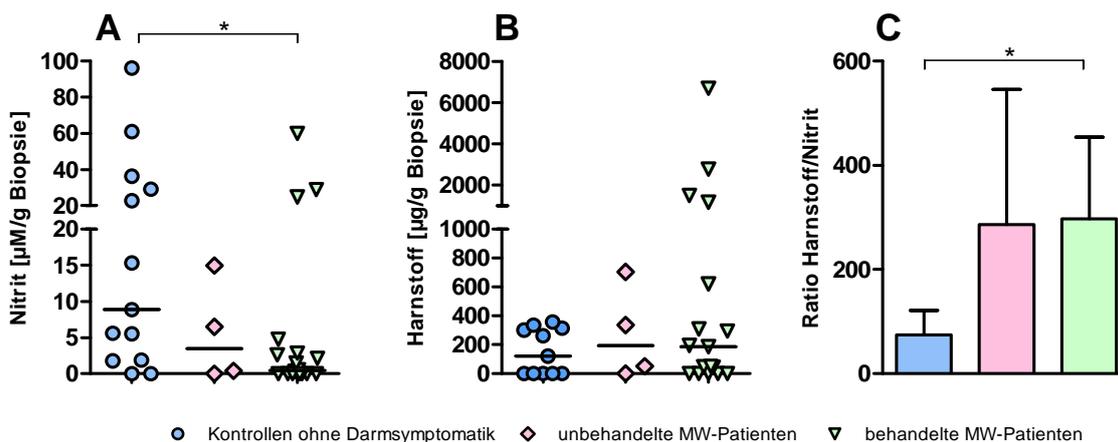


#### Abb. 23: Bestimmung der Arginaseaktivität in frisch isolierten duodenalen Biopsien

In frisch isolierten duodenalen Biopsien von behandelten und unbehandelten MW-Patienten sowie von Kontrollen ohne Darmsymptomatik wurde die Arginaseaktivität bestimmt (A). Durch photometrische Messungen wurde die Umwandlung von L-Arginin in Harnstoff quantitativ bestimmt. (B) Die Arginaseaktivität wurde gegen die Behandlungsdauer behandelter Patienten (ab drei Monate) aufgetragen. Mit Hilfe des Spearman-Korrelations-Tests wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Arginaseaktivität und Behandlungsdauer besteht.  $r$  = Korrelationskoeffizient

In Abb. 23.A ist die Arginaseaktivität in frisch isolierten duodenalen Biopsien dargestellt. Zwischen MW-Patienten und Kontrollen ohne Darmsymptomatik konnte kein Unterschied in der Arginaseaktivität festgestellt werden (Abb. 23.A). Betrachtete man hingegen die Arginaseaktivität, bezogen auf die Behandlungsdauer der MW-Patienten, konnte festgestellt werden, dass mit fortschreitender Behandlungsdauer die Arginaseaktivität in den duodenalen Biopsien zunahm (Abb. 23.B).

Um die Nitrit-Produktion zu messen, wurden die frischen Biopsien mit Zellkulturmedium überschichtet und für 48 Stunden mit  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und LPS stimuliert. Im Überstand wurde mittels Griess-Reagenz die Nitrit-Produktion nachgewiesen.



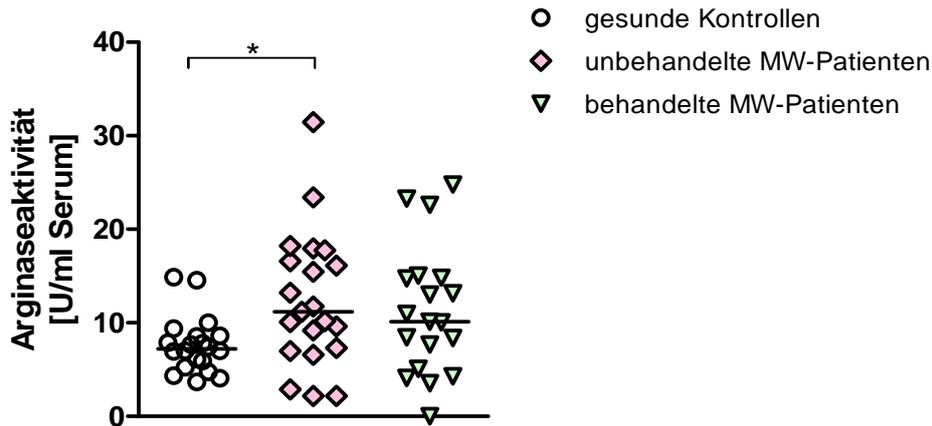
**Abb. 24: Nitrit- und Harnstoffnachweis in Biopsieüberständen nach Stimulation mit LPS**

Frische duodenale Biopsien wurden mit LPL-Medium überschichtet und für 48 Stunden mit  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und LPS stimuliert. Im Überstand konnte zum einen mittels Griess-Reagenz Nitrit (A) und zum anderen Harnstoff (B) nachgewiesen werden. In (C) ist die Ratio zwischen Harnstoff- und Nitritproduktion in kultivierten Biopsien dargestellt.

Die Nitritmessungen ergaben, dass behandelte MW-Patienten signifikant weniger Nitrit nach LPS Stimulation produzierten als Biopsien von Kontrollen ohne Darmsymptomatik (Abb. 24.A). Stimulierte man die Biopsien hingegen für 48 Stunden mit *T. whipplei*, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Nitritproduktion zwischen Kontrollen und MW-Patienten (ohne Abb.). Die Harnstoffmessungen in Biopsieüberständen nach der Stimulation mit LPS (Abb. 24.B) waren bei MW-Patienten und Kontrollen vergleichbar. Betrachtet man die Ratio zwischen Nitrit- und Harnstoffproduktion nach LPS Stimulation war ersichtlich, dass die Immunantwort bei MW-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ohne Darmsymptomatik zu einer erhöhten Harnstoffproduktion hin verschoben war (Abb. 24.C). Die Arginaseaktivität wurde nach 48-stündiger Stimulation mit *T. whipplei* oder LPS sowohl im Überstand als auch in Biopsien bestimmt. Allerdings konnte, weder bei Kontrollen ohne Darmsymptomatik noch bei MW-Patienten, eine spezifische Arginaseaktivität in Biopsien detektiert werden.

### 5.3.5. Nachweis der Arginaseaktivität in Serumproben

In Serumproben von MW-Patienten und gesunden Kontrollen wurde die Arginaseaktivität direkt gemessen. Dazu wurde Serum von gesunden Kontrollen und Patienten mit und ohne Arginin inkubiert und es zeigte sich, dass im Serum von unbehandelten MW-Patienten eine erhöhte Arginaseaktivität vorlag (Abb. 25).



**Abb. 25: Arginaseaktivität im Serum**

Serumproben wurden mit und ohne extrazellulärem Arginin für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Harnstoffproduktion bestimmt. Über die Menge an gebildeten Harnstoff konnte man auf die Arginaseaktivität schließen.

### 5.3.6. Zytokinbestimmungen im Serum und Biopsie-Überständen

Um Aufschluss über das Zytokinmilieu im peripheren Blut und im Duodenum zu erhalten, wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17a, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  sowie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  als Vertreter der anti-inflammatorischen Zytokine in Serumproben und Biopsie-Überständen von Kontrollen und MW-Patienten gemessen.

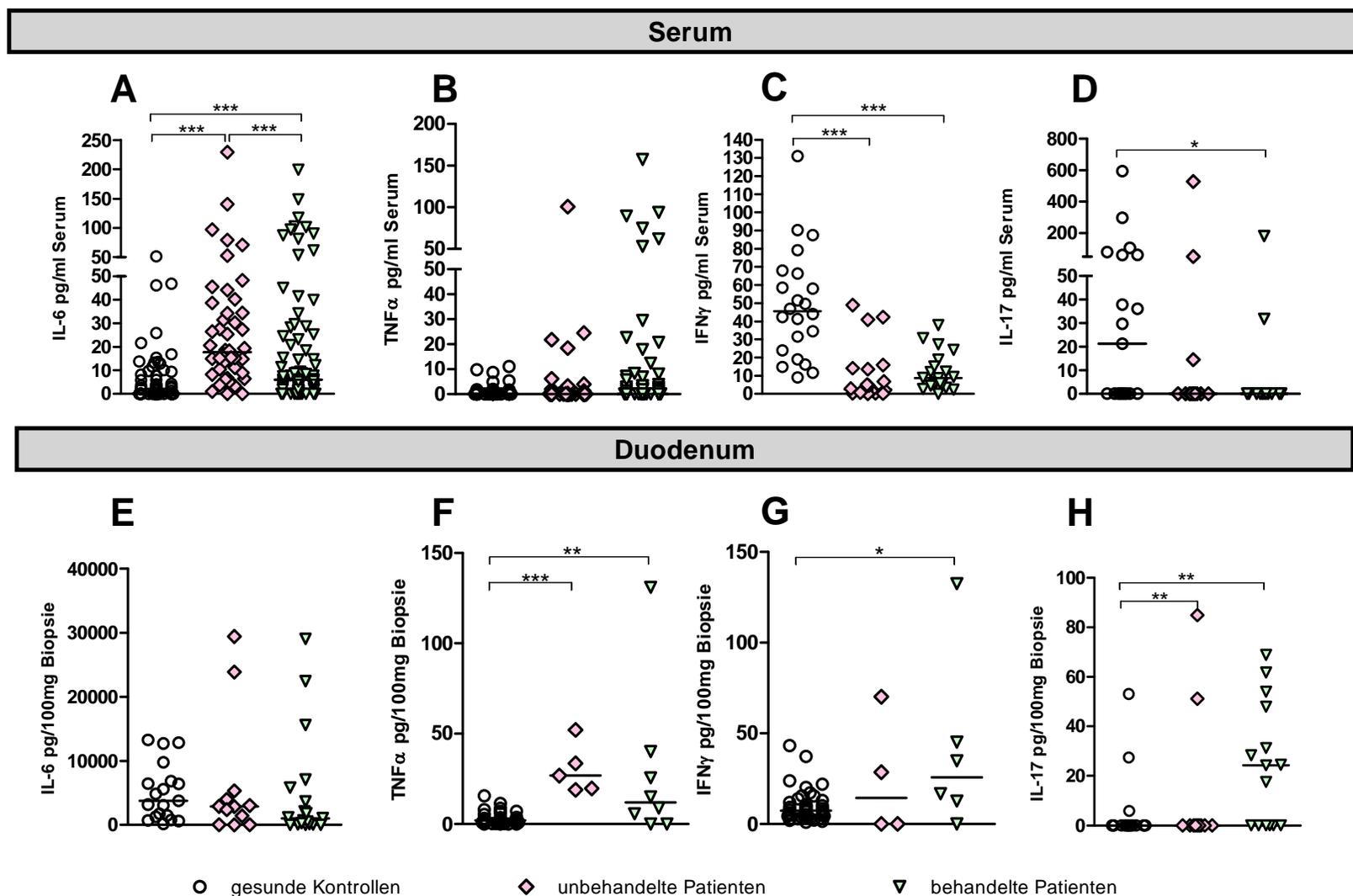
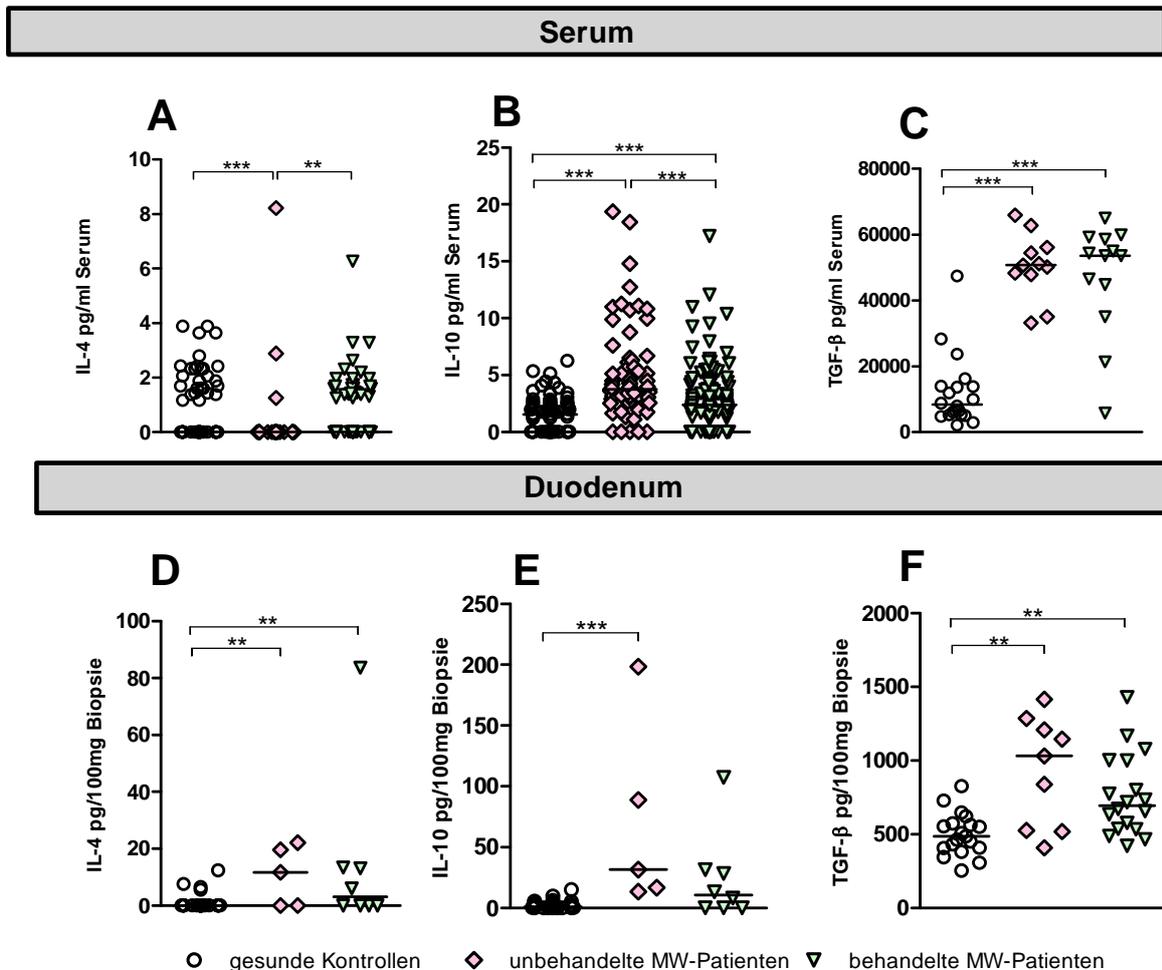


Abb. 26:

**Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine in Serumproben und duodenalen Biopsien**

Zytokinkonzentration von IL-6 (A+E), TNF $\alpha$  (B+F), IFN $\gamma$  (C+G) und IL-17a (D+H) wurden in Serumproben (obere Reihe) und duodenalen Biopsien (untere Reihe) mit Hilfe eines CBA bestimmt.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 war im Serum (Abb. 26.A) bei MW-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen erhöht, wobei im Duodenum (Abb. 26.E) keine signifikant unterschiedlichen Expressionen vorlagen.  $\text{TNF}\alpha$  hingegen war nur im Duodenum (Abb. 26.F) bei MW-Patienten erhöht und im Serum (Abb. 26.B) unverändert. MW-Patienten vor und nach Behandlung zeigten eine geringere  $\text{IFN}\gamma$  Konzentration im Serum (Abb. 26.C), wobei behandelte MW-Patienten im Duodenum eine leicht erhöhte Produktion aufwiesen (Abb. 26.G). Im Serum behandelter MW-Patienten lag eine verringerte Konzentration von IL-17a im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor (Abb. 26.D). In duodenalen Biopsien von MW-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte IL-17a Produktion festgestellt werden (Abb. 26.H). Für IL-1 $\beta$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Serumproben und Überständen duodenaler Biopsien zwischen MW-Patienten und Kontrollen (ohne Abb.).



**Abb. 27: Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine in Serumproben und duodenalen Biopsien**

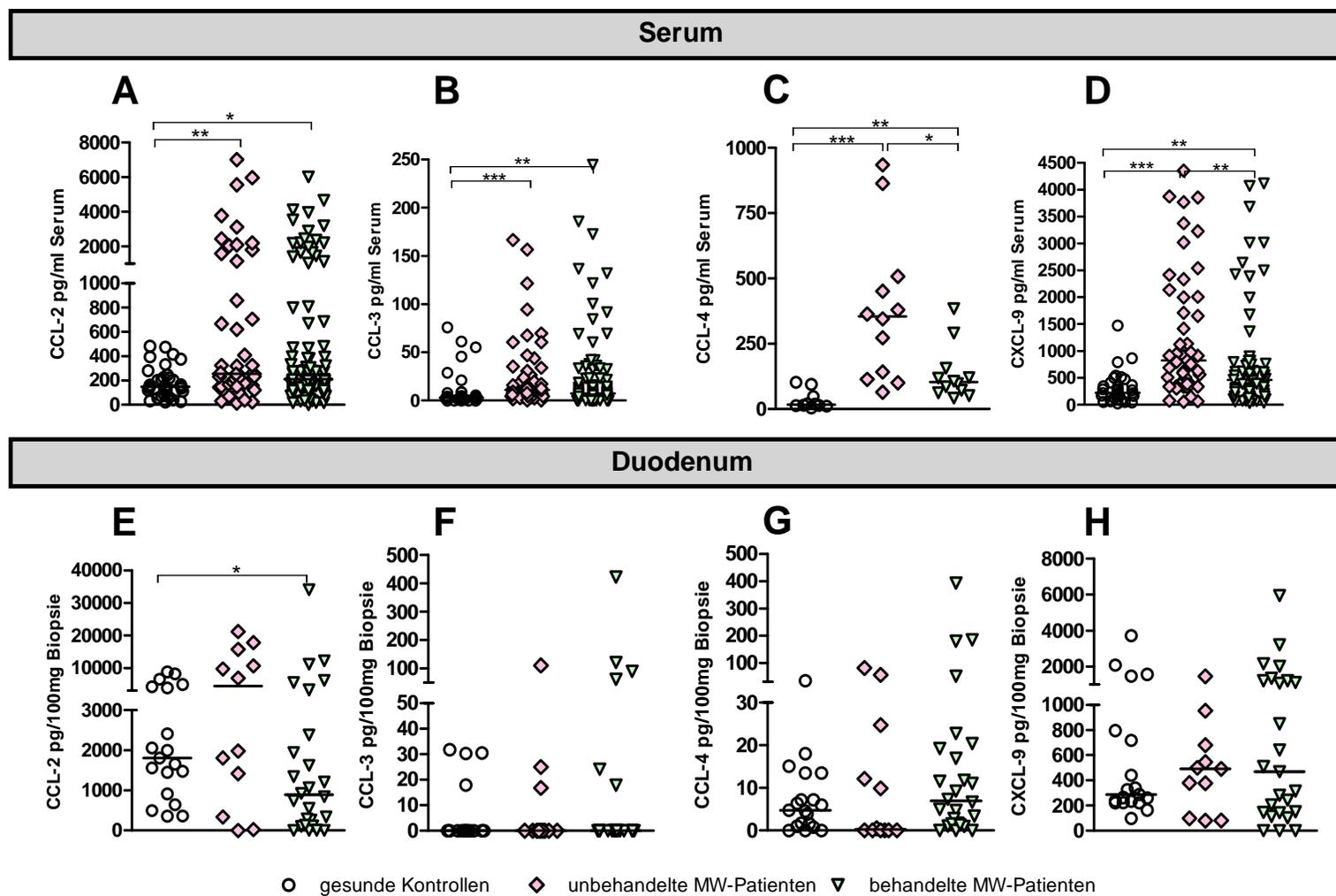
Zytokinkonzentrationen von IL-4 (A+D), IL-10 (B+E) und TGF- $\beta$  (C+F) wurden in Serumproben (obere Reihe) und duodenalen Biopsien (untere Reihe) mit Hilfe eines CBA bestimmt.

Im Serum konnte eine geringere Konzentration an IL-4 bei unbehandelten MW-Patienten im Vergleich zu MW-Patienten nach Antibiotikatherapie und gesunden Kontrollen festgestellt werden (Abb. 27.A). Im Duodenum dagegen wiesen die MW-Patienten sowohl vor als auch nach der Behandlung eine höhere IL-4 Produktion auf als gesunde Kontrollen (Abb. 27.D). Die Produktion der regulatorisch wirkenden Zytokine IL-10 (Abb. 27.B+E) und TGF- $\beta$  (Abb. 27.C+F) war bei unbehandelten und behandelten MW-Patienten sowohl im Serum als auch im Duodenum erhöht.

### **5.3.7. Bestimmungen von Chemokinen im Serum und Biopsie-Überständen**

Chemokine sind eine Gruppe von Zytokinen, die auf anderen Zellen chemotaktisch wirken und sie so an den Ort der Entzündung locken. Es wurden die Chemokine CCL-2, CCL-3, CCL-4 und CXCL-9 in Seren und Biopsieüberständen von gesunden Kontrollen und Patienten mittels CBA analysiert.

Die Konzentrationen der Chemokine CCL-2, CCL-3, CCL-4 und CXCL-9 (Abb. 28.A-D) waren bei MW-Patienten unabhängig vom Behandlungszustand gegenüber Kontrollen im Serum erhöht, wobei unbehandelte MW-Patienten eine höhere CCL-4 und CXCL-9 Produktion aufwiesen als MW-Patienten nach Antibiotikatherapie (Abb. 28.C-D). In duodenalen Proben konnten bezüglich CCL-3, CCL-4 und CXCL-9 keine signifikanten Unterschiede zwischen MW-Patienten und den Kontrollen festgestellt werden (Abb. 28.F-H), lediglich behandelte MW-Patienten zeigten eine erniedrigte CCL-2 Produktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 28.E).



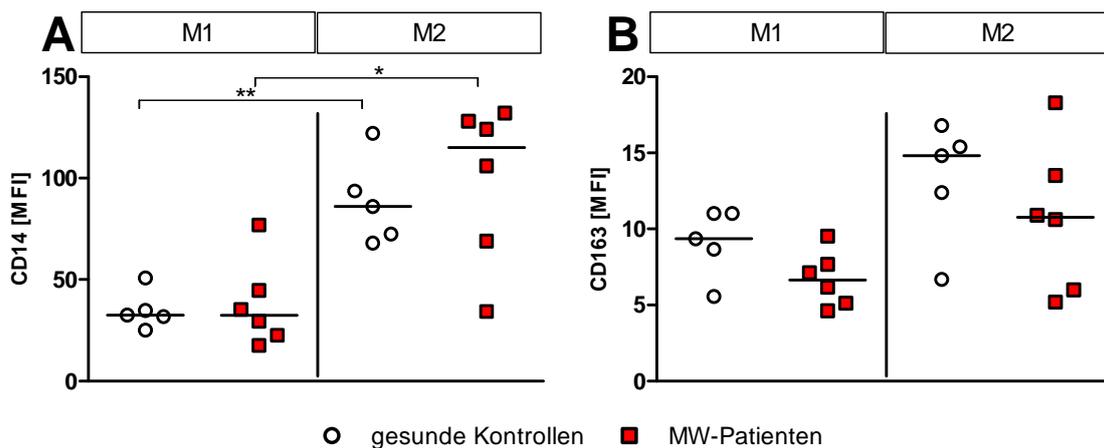
**Abb. 28: Bestimmung von Chemokinen in Serumproben und duodenalen Biopsien**

Chemokinkonzentrationen von CCL-2 (A+E), CCL-3 (B+F), CCL-4 (C+G) und CXCL-9 (D+H) wurden in Serumproben (obere Reihe) und duodenalen Biopsien (untere Reihe) mit Hilfe eines CBA bestimmt.

## 5.4. Charakterisierung von *in vitro* differenzierte Makrophagen

### 5.4.1. Phänotyp der *in vitro* differenzierten Makrophagen

Um die Reifung und Differenzierung von *in vitro* differenzierten Makrophagen zu bestimmen wurden am Tag zehn der *in vitro* Makrophagendifferenzierung, die Expression von CD68, HLA-DR, CD14, CD64, CD16, CD71, CD163 und 25F9 (Marker für spät-aktivierte Makrophagen) im Durchflusszytometer untersucht.



**Abb. 29: Phänotypisierung der *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen**

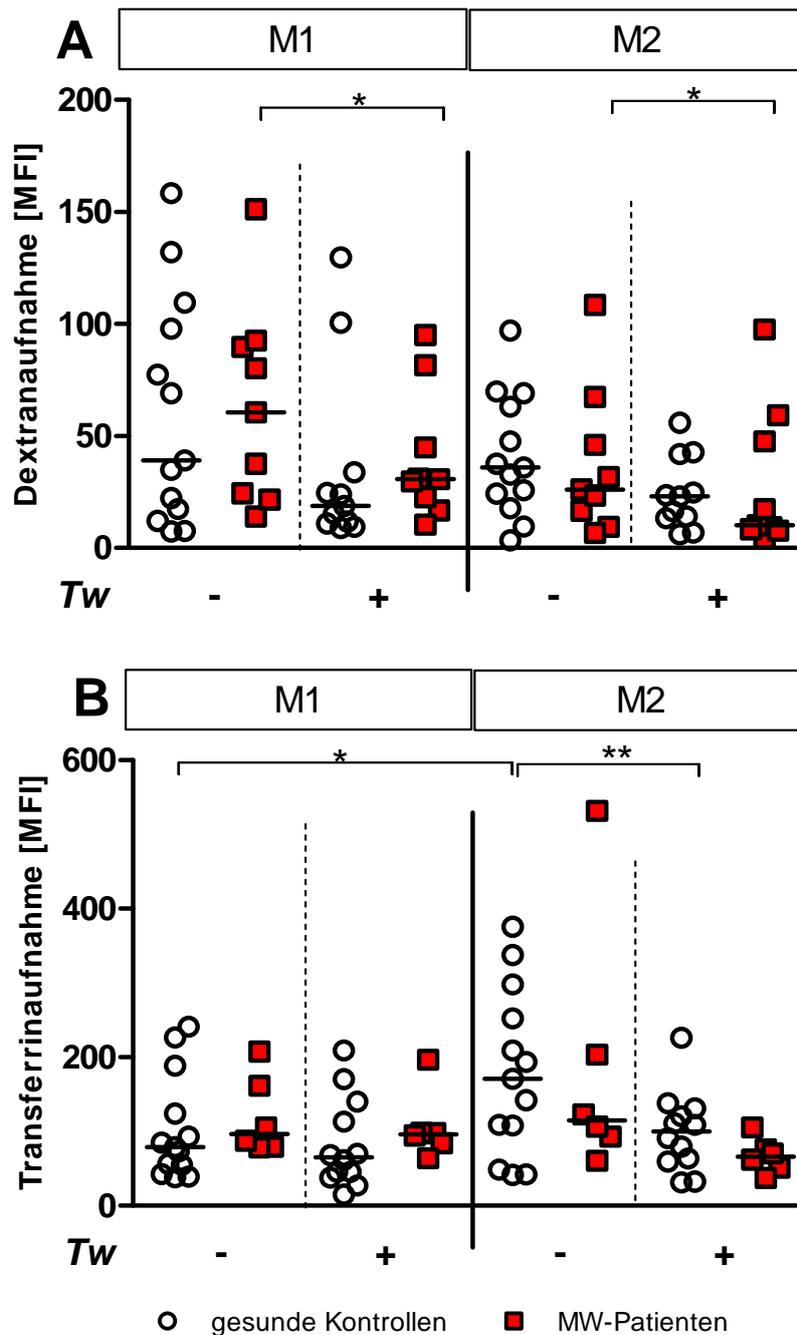
M1 und M2 Makrophagen wurden am Tag zehn ihrer Differenzierung auf die Oberflächenexpression von CD14 (A) und CD163 (B) im Durchflusszytometer analysiert.

Die klassisch aktivierten M1 Makrophagen wiesen eine geringere CD14 (Abb. 29.A) und CD163 (Abb. 29.B) Expression auf als die alternativ aktivierten M2 Makrophagen. Die Expression anderer Makrophagenmarker wie CD68, HLA-DR, CD64, CD16, CD71 und 25F9 unterschieden sich nicht signifikant zwischen M1 und M2 Makrophagen. Es konnten keine Unterschiede in der *in vitro* Differenzierung zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten festgestellt werden.

### 5.4.2. Funktionelle Tests mit *in vitro* differenzierten Makrophagen

#### 5.4.2.1. Phagozytose mit *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen

Makrophagen besitzen in ihrer Funktion als APZ die funktionelle Eigenschaft, fremde Partikel oder Mikroorganismen aufzunehmen. In diesem Experiment sollte die Rezeptor-unabhängige Phagozytose mit Dextran Partikeln, die mit dem Fluorochrom FITC gekoppelt sind, getestet werden. Transferrin, ebenfalls mit FITC markiert, wurde für die Detektion der rezeptor-abhängigen Phagozytose verwendet, da Transferrin nur über den Transferrinrezeptor CD71 aufgenommen werden kann.



### Abb. 30: Phagozytose von Dextran und Transferrin Partikel von M1 und M2 Makrophagen

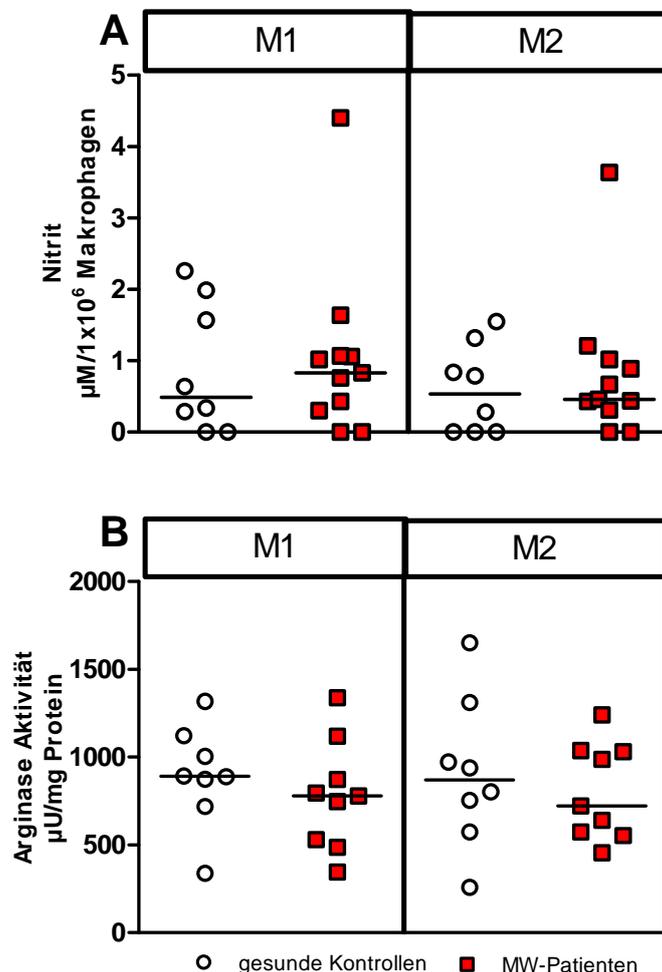
M1 und M2 Makrophagen von gesunden Kontrollen und MW-Patienten wurden ab dem achten Tag der Differenzierung entweder mit oder ohne inaktivierte *T. whipplei* für weitere 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Makrophagen für weitere zwei Stunden mit Dextran-FITC Partikeln (**A**) bzw. Transferrin-FITC Partikeln (**B**) bei 37 °C und 4 °C inkubiert und deren Aufnahme im Durchflusszytometer analysiert. Die unspezifische Phagozytose bei 4 °C wurde von den 37 °C Proben abgezogen.

Die Phagozytose von Dextran war zwischen M1 und M2 Makrophagen von gesunden Kontrollen und MW-Patienten vergleichbar (Abb. 30.A). Inkubierte man die Makrophagen jedoch 48 Stunden vor dem Phagozytose-Test mit *T. whipplei*, verringerte sich die Aufnahme von Dextran Partikeln in beiden Makrophagenpopulationen. M2 Makrophagen von gesunden

Kontrollen zeigten eine erhöhte Aufnahme von Transferrin Partikeln im Vergleich zu M1 Makrophagen (Abb. 30.B). Bei MW-Patienten hingegen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen M1 und M2 Makrophagen in der Transferrinaufnahme, lediglich die vorherige Inkubation mit *T. whipplei* verringerte die Transferrinaufnahme bei M2 Makrophagen. Eine Vorinkubation mit *E. coli* oder *C. Celluans*<sup>5</sup> ergaben ebenfalls eine erniedrigte Aufnahme von Dextran- bzw. Transferrin Partikeln (ohne Abb.).

#### 5.4.2.2. Nitritproduktion und Arginaseaktivität *in vitro* generierter Makrophagen

Für die funktionelle Unterscheidung von M1 und M2 Makrophagen wurde die Produktion von Nitrit in Zellkulturüberständen bzw. die Arginaseaktivität in lysierten Makrophagen gemessen.



**Abb. 31: Bestimmung der Nitritproduktion in Kulturüberständen und die Bestimmung der Arginaseaktivität von *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen**

M1 und M2 Makrophagen von gesunden Kontrollen und MW-Patienten wurden ab dem achten Tag der Differenzierung zur Aktivierung mit  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert. Im Kulturüberstand wurde die Nitritproduktion (**A**) mittels Griess-Reagenz nachgewiesen. Die Arginaseaktivität (**B**) wurde über die Harnstoffproduktion nach der Argininhydrolyse in Zelllysaten bestimmt.

<sup>5</sup> Gram positives Bakterium aus der Gruppe der Aktinomyzeten, nächster Verwandter von *T. whipplei*

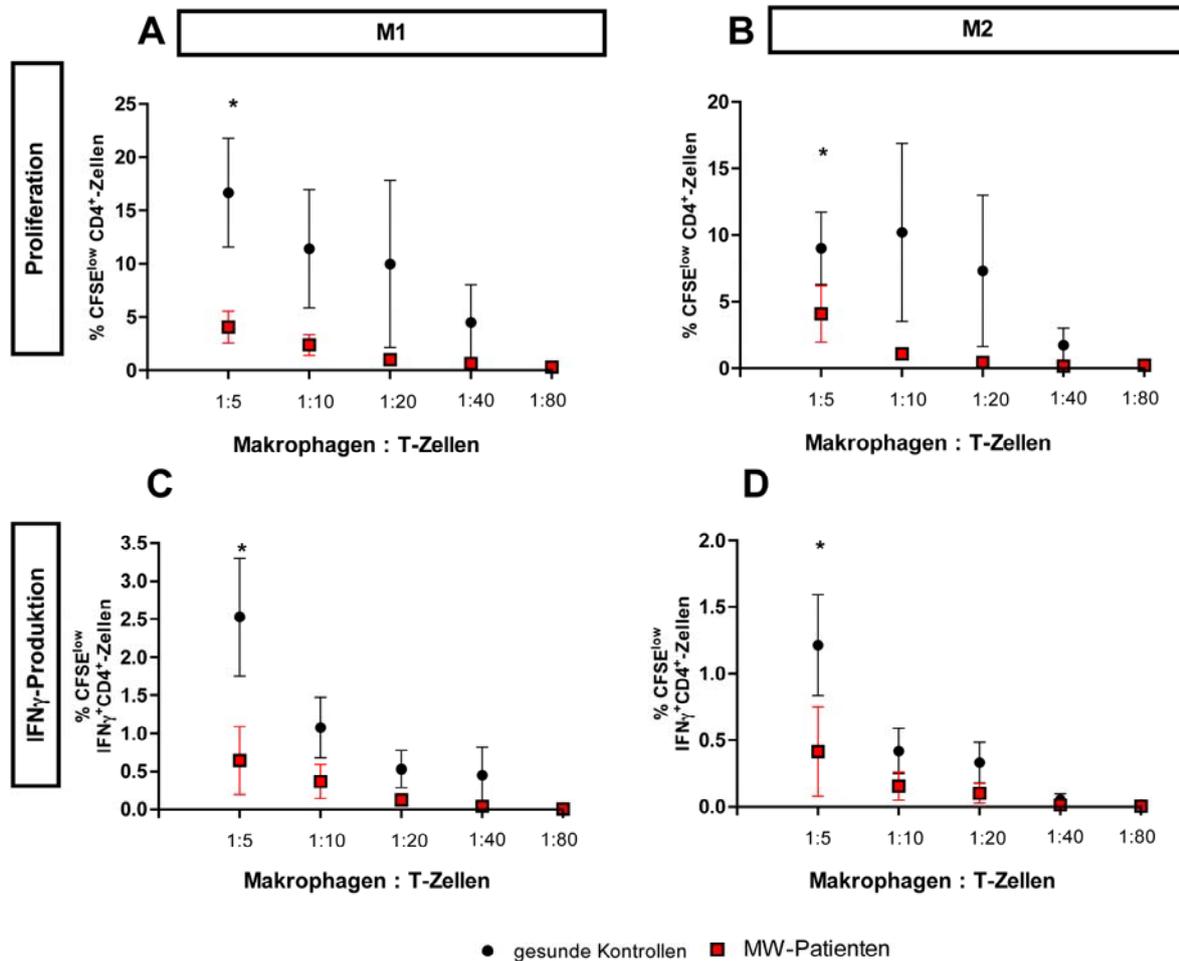
Dazu wurden *in vitro* differenzierte M1 und M2 Makrophagen zur Aktivierung für 48 Stunden mit  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert. Zusätzlich wurde in einem Ansatz entweder *T. whipplei* oder LPS hinzugegeben. Nach Abzug der unstimulierten Probe konnte kaum eine Nitritproduktion nach *T. whipplei* oder LPS Stimulation festgestellt werden (ohne Abb.). Daher wurde die Nitritproduktion (Abb. 31.A) und die Arginaseaktivität (Abb. 31.B) ohne Stimulus dargestellt. Es konnte weder bei gesunden Kontrollen noch bei MW-Patienten ein Unterschied in der Nitritproduktion und der Arginaseaktivität zwischen M1 und M2 Makrophagen festgestellt werden.

#### **5.4.2.3. Antigenpräsentation der *in vitro* differenzierten Makrophagen**

Um die Funktion der *in vitro* differenzierten Makrophagen als APZ zu überprüfen, wurden Proliferationstests mit autologen, CFDA-SE markierten T-Zellen und *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen in unterschiedlichen Verhältnissen durchgeführt.

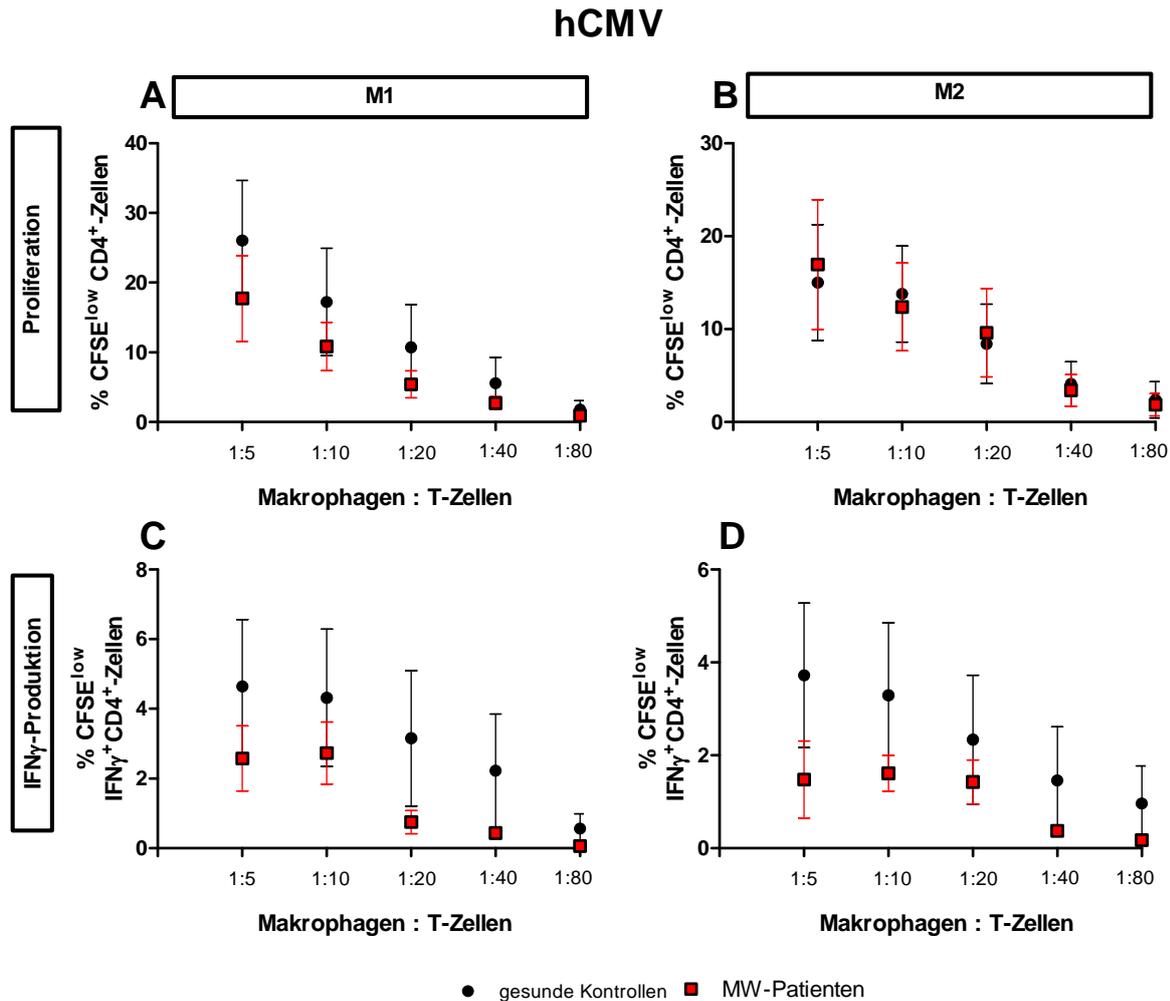
Um die generelle Funktionalität der T-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen mit SEB als Positivkontrolle stimuliert. Als spezifische Antigene wurden *T. whipplei* und hCMV benutzt. Nach fünf Tagen Antigenstimulation wurden die T-Zellen auf Proliferation und  $\text{IFN}\gamma$  Produktion mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die T-Zellen der MW-Patienten zeigten eine verringerte *T. whipplei* spezifische Proliferation (Abb. 32.A-B) und  $\text{IFN}\gamma$  Produktion (Abb. 32.C-D) sowohl in Gegenwart von M1 als auch von M2 Makrophagen im Verhältnis 1:5 im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu wiesen die T-Zellen der MW-Patienten eine Proliferation und  $\text{IFN}\gamma$  Produktion auf SEB und hCMV auf, die genauso stark wie die der gesunden Kontrollen war (Abb. 33).

*T. whipplei*

**Abb. 32: Funktioneller Nachweis der Antigenpräsentation von *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen nach *T. whipplei* Stimulation**

Am siebten Tag der *in vitro* Differenzierung wurden autologe, CFDA-SE markierte T-Zellen und M1 und M2 Makrophagen von gesunden Kontrollen und MW-Patienten in den Verhältnissen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 inkubiert. Die Zellen wurden mit *T.w.* inkubiert und nach weiteren fünf Tagen die Proliferation (A-B) und die IFN $\gamma$  Produktion (C-D) der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

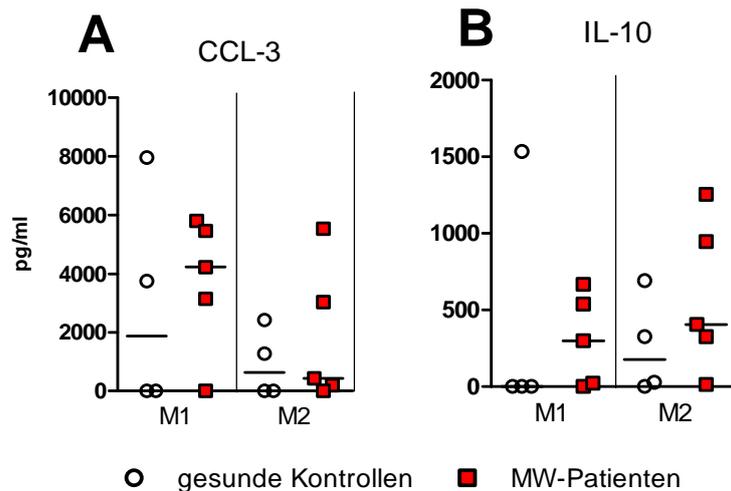


**Abb. 33: Funktioneller Nachweis der Antigenpräsentation von *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen nach hCMV Stimulation**

Am siebten Tag der *in vitro* Differenzierung wurden autologe, CFDA-SE markierte T-Zellen und M1 und M2 Makrophagen von gesunden Kontrollen und MW-Patienten in den Verhältnissen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 inkubiert. Die Zellen wurden mit hCMV inkubiert und nach weiteren fünf Tagen die Proliferation (A-B) und die IFN $\gamma$  Produktion (C-D) der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### 5.4.2.4. Zytokinproduktion von *in vitro* differenzierten Makrophagen nach Stimulation mit *T. whipplei*

M1 und M2 Makrophagen unterscheiden sich in ihrer Zytokinproduktion nach Antigenstimulation. Die klassischen M1 Makrophagen bilden bevorzugt pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF $\alpha$  wohingegen bei den M2 Makrophagen die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine z. B. IL-10, überwiegt. Um zu testen, welche Zytokine nach einer 48-stündigen Inkubation mit *T. whipplei* produziert werden, wurden Makrophagenüberstände mittels CBA auf das Vorhandensein von IL-6, IL-17a, IL-23, TNF $\alpha$ , CCL-3, IL-10 und TGF- $\beta$  untersucht.



**Abb. 34: Zytokinproduktion in Kulturüberständen *in vitro* differenzierter M1 und M2 Makrophagen nach *T. whipplei* Stimulation**

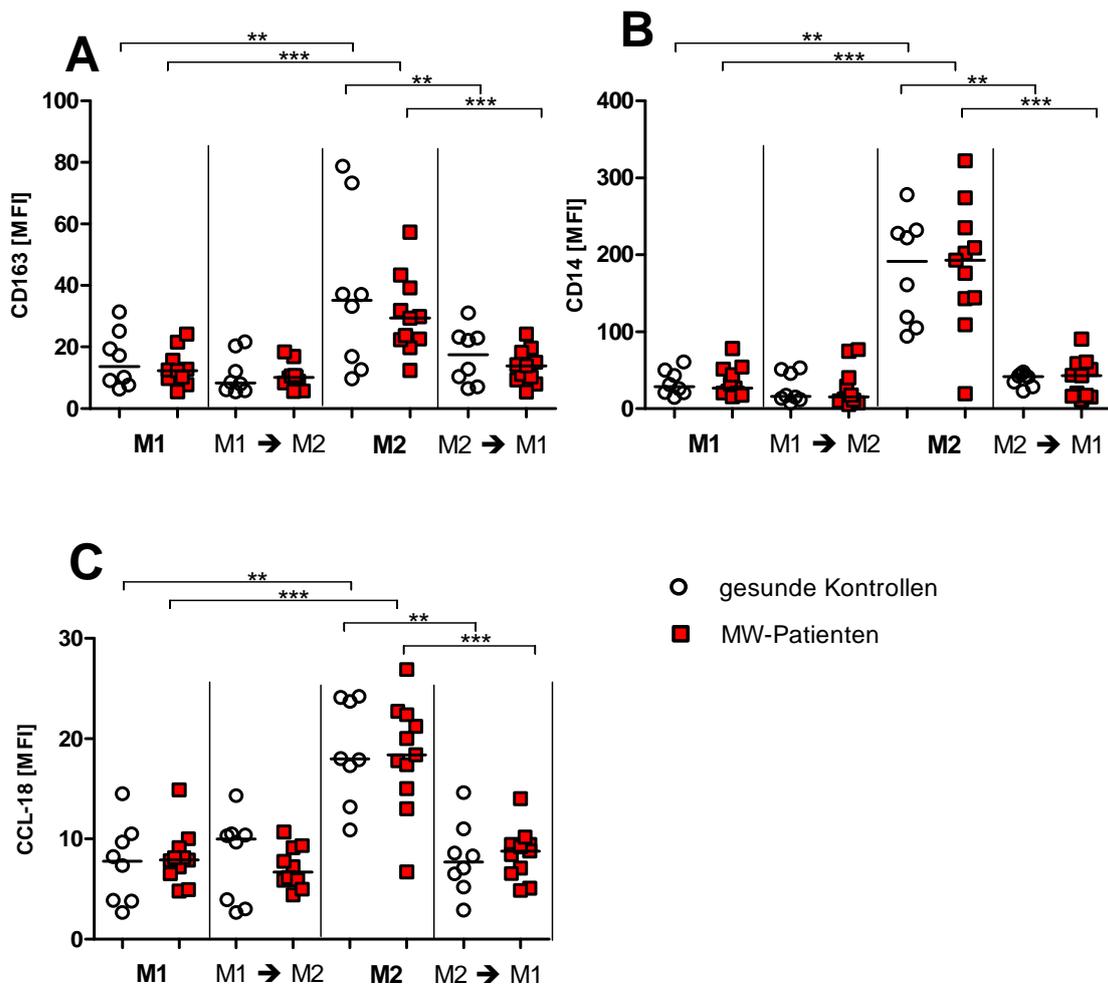
*In vitro* differenzierte M1 und M2 Makrophagen wurden für 48 h mit inaktiviertem *T.w.* inkubiert und die spezifische Produktion von CCL-3 (**A**) und IL-10 (**B**) im Überstand mittels CBA bestimmt.

In Abb. 34 ist die spezifische Zytokinproduktion von M1 und M2 Makrophagen nach Stimulation mit *T. whipplei* dargestellt. M1 Makrophagen von Kontrollen und MW-Patienten produzierten nach Antigenstimulation vermehrt CCL-3 im Vergleich zu M2 Makrophagen (Abb. 34.A). Die Produktion von IL-10 (Abb. 34.B) war in den M2 Makrophagen sowohl bei Kontrollen als auch bei MW-Patienten erhöht wobei M1 Makrophagen von Patienten ebenfalls erhöhte IL-10 Konzentrationen im Vergleich zu M1 Makrophagen von gesunden Kontrollen aufwiesen. Nach der Stimulation mit *T. whipplei* ergaben sich keine Unterschiede in der Produktion von IL-6, TNF $\alpha$  und TGF- $\beta$  zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten. Eine spezifische Produktion der Zytokine IL-17 und IL-23 der Makrophagen nach Antigenstimulation konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abb.).

### 5.4.3. Wechsel der Makrophagenpolarisierung

Es stellte sich die Frage, ob *in vitro* differenzierte M1 Makrophagen sich in M2 Makrophagen, und umgekehrt, umwandeln können. Dazu wurden mit GM-CSF generierte M1 Makrophagen ab dem achten Tag der Differenzierung mit M-CSF (Wachstumsfaktor für M2) und den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-4 oder IL-10 für weitere sieben Tage stimuliert. Für den Wechsel von M2 zu M1 Makrophagen wurden die ursprünglich mit M-CSF generierten Zellen mit GM-CSF und IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  für sieben weitere Tage stimuliert. Der Wechsel der Makrophagenpolarisierung wurde zunächst phänotypisch anhand der Expression der M2 Marker CD14, CD163 und CCL-18 analysiert. M2 Makrophagen wiesen eine höhere CD163 (Abb. 35.A), CD14 (Abb. 35.B) und CCL-18 Expression (Abb. 35.C) im Vergleich zu M1 Makrophagen auf. Beim Wechsel von M2 zu M1 Makrophagen wurde die Expression von

CD163, CD14 und CCL-18 allein durch die Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF herunter reguliert. Durch die zusätzliche Zugabe von  $\text{IFN}\gamma$  oder  $\text{TNF}\alpha$  wurde dieser Wechsel der Makrophagenpolarisierung ebenfalls induziert (ohne Abb.). Bei einem Wechsel von M1 zu M2 Makrophagen sollte die Expression von CD163, CD14 oder CCL-18 gesteigert werden. Dies konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden (Abb. 35.A, B, C – zweite Spalte).

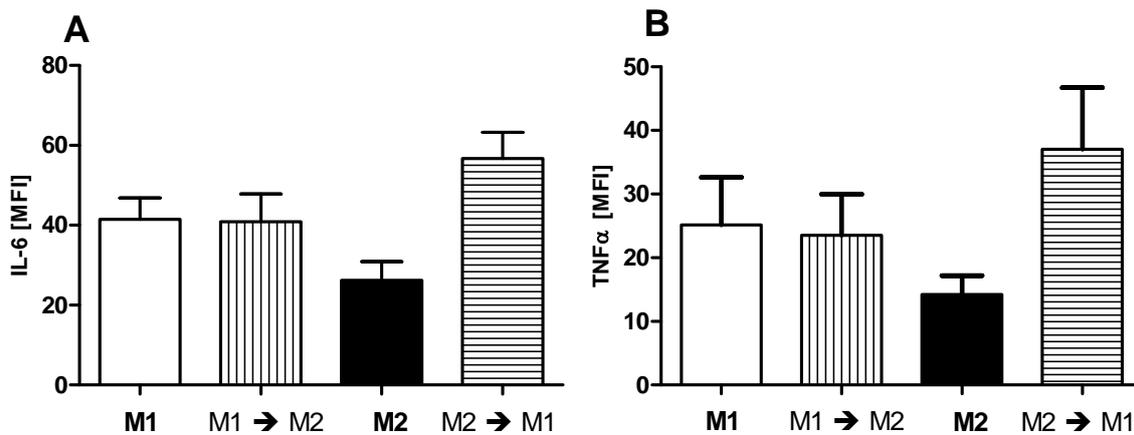


**Abb. 35: Änderung des Phänotyps beim Wechsel der Makrophagenpolarisierung**

M1 und M2 Makrophagen wurden aus peripheren Blutmonozyten von gesunden Kontrollen und MW-Patienten *in vitro* generiert. Ab dem achten Tag der Differenzierung wurden die M1 Makrophagen mit M-CSF (Wachstumsfaktor für M2) und die M2 Makrophagen mit GM-CSF (Wachstumsfaktor für M1) für weitere sieben Tage stimuliert. Anschließend wurde die Expression von CD163 (**A**), CD14 (**B**) und CCL-18 (**C**) im Durchflusszytometer bestimmt. M1 → M2 = Wechsel von M1 zu M2 Makrophagen; M2 → M1 Wechsel von M2 zu M1 Makrophagen

Weiterhin wurde der Wechsel der Makrophagenpolarisierung funktionell untersucht. Dazu wurden die Zellen an Tag 15 für sechs Stunden mit LPS stimuliert und anschließend die intrazelluläre Zytokinproduktion von IL-6,  $\text{TNF}\alpha$  und IL-10 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. M2 Makrophagen wiesen tendenziell eine niedrigere IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$  Produktion nach LPS Stimulation auf als M1 Makrophagen (Abb. 36). Bei einem Wechsel der

Makrophagenpolarisierung von M2 zu M1 Makrophagen konnte die Produktion beider Zytokine deutlich gesteigert werden. Die Analyse der IL-10 Produktion nach sechsständiger LPS Stimulation ergab keine Unterschiede in den einzelnen Makrophagenpopulationen (ohne Abb.). Auch die funktionellen Analysen wiesen auf einen Wechsel der Makrophagenpolarisierung von M2 zu M1 Makrophagen hin. Unter den herrschenden Versuchsbedingungen scheint der Wechsel von M1 zu M2 Makrophagen nicht induzierbar zu sein. Es konnten keine Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten im Wechsel der Makrophagenpolarisierung detektiert werden.



**Abb. 36: Bestimmung der Zytokine nach der Stimulation mit LPS beim Wechsel der Makrophagenpolarisierung**

M1 und M2 Makrophagen wurden aus peripheren Blutmonozyten von fünf MW-Patienten *in vitro* generiert. Ab dem achten Tag der Differenzierung wurden die M1 Makrophagen mit M-CSF (Wachstumsfaktor für M2) und die M2 Makrophagen mit GM-CSF (Wachstumsfaktor für M1) für weitere sieben Tage stimuliert. Am 15. Tag der Differenzierung wurden den Zellen sechs Stunden mit LPS stimuliert (davon fünf Stunden unter Brefeldin A Zugabe). Anschließend wurde die Expression von IL-6 (A) und TNF $\alpha$  (B) im Durchflusszytometer bestimmt. M1 → M2 = Wechsel von M1 zu M2 Makrophagen; M2 → M1 Wechsel von M2 zu M1 Makrophagen

## 6. Diskussion

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation, der Initiierung und der Auflösung von Immunantworten. Verschiedene Erkrankungen, darunter Atherosklerose, Diabetes, Krebs und Rheumatoide Arthritis haben eine Assoziation mit defekten oder veränderten Makrophagenfunktionen [146]. Die Akkumulation von *T. whipplei* in den Makrophagen der Lamina propria des Duodeni zeichnet die Pathogenese des M. Whipple aus. Daher wurde schon früh vermutet, dass die Makrophagen bei MW-Patienten funktionell eingeschränkt sein könnten [7]. Da die bisherigen Untersuchungen nur an kleinen Patientenzahlen durchgeführt wurden und auch immer nur Teilaspekte der Funktionalität der Makrophagen erfasst wurden, wurden in dieser Arbeit die Monozyten und Makrophagen in einer großen Kohorte von MW-Patienten *ex vivo*, *in situ* und *in vitro* phänotypisch und funktionell charakterisiert.

### 6.1. Spezifische Immunantworten von MW-Patienten

Um zu beurteilen, ob die hier untersuchte Kohorte in ihren immunologischen Defiziten den bisherigen Erfahrungen mit MW-Patienten entspricht, wurde die T-Zellreaktivität überprüft. Bereits 2006 konnten Moos et al. zeigen, dass MW-Patienten eine reduzierte *T. whipplei*-spezifische Th1 Antwort im peripheren Blut und in Lymphozyten der Lamina propria des Duodeni besitzen [31]. Dies konnte auch in dieser Arbeit mit einer größeren Kohorte von MW-Patienten bestätigt werden, da der Prozentsatz von  $\text{IFN}\gamma^+\text{CD40L}^+$  in  $\text{CD4}^+$  T-Zellen im Blut nach Stimulation mit *T. whipplei* bei MW-Patienten reduziert war (Abb. 14.B). Auch nach einer Antibiotikatherapie ließ sich die *T. whipplei*-spezifische Immunantwort nicht wieder herstellen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, immunogene Strukturen von *T. whipplei* zu identifizieren und deren Einfluss auf Makrophagen zu untersuchen. Hsp70 von *T. whipplei* erscheint ein vielversprechender Kandidat, da dagegen eine humorale Antwort in Kontrollpersonen ausgebildet wird [12, 147]. Hsp70 von *T. whipplei* scheint also immunogene Epitope zu besitzen, die eine B-Zellantwort generieren. Auch wenn B-Zell- und T-Zell Epitope in der Regel nicht identisch sind, wurde hsp70 von *T. whipplei* rekombinant hergestellt, um es als potentieller T-Zellantigen einzusetzen. Dazu wurde Vollblut mit rekombinant hergestelltem hsp70 von *T. whipplei* stimuliert. Auch hier zeigte sich eine verminderte Th1 Antwort bei MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Abb. 14.B). Als Kontrollantigen wurde das rekombinant hergestellte hsp70 von *E. coli* verwendet, bei dem sich aber keine Unterschiede in der Th1 Antwort zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen ergaben (Abb. 14.B). Ein Sequenzvergleich zwischen dem hsp70 von *T. whipplei* und *E. coli* kann Unterschiede zwischen den beiden hsp70 aufzeigen, um so in Zukunft antigene Epitope innerhalb des hsp70 von *T. whipplei* zu

definieren. Für die weitere Analyse von T-Zellreaktionen wäre die Definition von CD4 und CD8 Epitopen essentiell, da die Reaktivität der Makrophagen jedoch nicht von Epitopen abhängt, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Die Stimulation mit SEB zeigte eine reduzierte Th1 Antwort bei unbehandelten MW-Patienten (Abb. 14.A) und spiegelt die verminderte Reaktivität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf polyklonale Stimulation wieder [148]. Trotzdem sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen von MW-Patienten in der Lage, auf herkömmliche Antigene wie Tetanus Toxoid, Tuberkulin oder CMV eine effektive Th1 Antwort aufzubauen [31].

Als Maß für die Reaktivität von B-Zellen wurden Immunglobuline analysiert. Immunglobuline, speziell IgA, gehören zu den Hauptabwehrmechanismen gegen Infektionen auf mukosalen Oberflächen [149]. IgA wird in das Darmlumen sekretiert, bindet dort Bakterien und mikrobielle Produkte und verhindert somit, dass diese in die Mukosa eintreten können [150]. In früheren Publikationen der Arbeitsgruppe konnten verringerte IgA, IgM und IgG4 Mengen im Duodenum von MW-Patienten im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen gezeigt werden [151]. Allerdings zeigte sich in der weiteren Analyse im Rahmen dieser Arbeit, dass im Vergleich zu gesunden Kontrollen, MW-Patienten erhöhte Konzentrationen von IgA, IgM und IgG4 im Überstand duodener Biopsien aufwiesen (Abb. 15.E-H). Diese Diskrepanz in den Ergebnissen ergibt sich daraus, dass bei Geelhaar et al. keine Proben gesunder Kontrollen, sondern ausschließlich von Kontrollen ohne Darmsymptomatik verwendet wurden [151].

Die gesunden Kontrollen waren durchschnittlich viel jünger als MW-Patienten, wohingegen die Kontrollen ohne Darmsymptomatik das gleiche Alter hatten wie MW-Patienten. Die erhöhten IgA Konzentrationen in Biopsie Überständen bei MW-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen (Abb. 15.E) könnte daraus resultieren, dass die IgA Konzentration mit dem Alter steigt [152]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer statistischer Test verwendet und eine größere Kohorte betrachtet, so dass die Patienten nach ihrem Behandlungsstatus unterteilt werden konnten. Erhöhte Konzentrationen von IgG4 (Abb. 15.H) könnten mit der erhöhten Konzentration von IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  im Duodenum von MW-Patienten zusammenhängen (Abb. 27.D-F; Abb. 22.B), da diese die IgG4 Produktion in naiven B-Zellen induzieren können [153]. In Serumproben konnten ähnliche Konzentration von IgA, IgM, IgG1 und IgG4 bei MW-Patienten und gesunden Kontrollen detektiert werden (Abb. 15). Bereits 1977 beschrieben Clancy et al., dass die IgM Konzentrationen bei MW-Patienten im Serum erhöht waren [154], dies deckt sich mit bereits veröffentlichten Daten [151]. In dieser Arbeit wurde eine größere Kohorte betrachtet, wobei unbehandelte MW-Patienten nur tendenziell erhöhte IgM Konzentrationen im Serum aufwiesen (Abb. 15.B). Im Serum und im Überstand duodener Proben zeigten MW-Patienten reduzierte Konzentrationen von IgG2 im Vergleich zu gesunden Kontrollen bzw. Kontrollen ohne

Darmsymptomatik (Abb. 15.C+G). B-Zellen produzieren in der Anwesenheit der Th1 Zytokine  $\text{IFN}\gamma$  und IL-12 das Immunglobulin IgG2 [155]. Aufgrund der verringerten Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  und IL-12 bei MW-Patienten [36] könnte sich so die verringerte IgG2 Produktion bei MW-Patienten erklären.

Die Th1 Antwort auf *T. whipplei* ist in der Peripherie (Abb. 14.B) und in der intestinalen Mukosa bei MW-Patienten beeinträchtigt [32]. Erniedrigte Serumkonzentrationen von IL-12p40, eine reduzierte Produktion von IL-12 in Monozyten [35, 36] und die Anwesenheit von M2 Makrophagen (Abb. 21) scheinen die Entwicklung von Th2 Zellen im Darm zu favorisieren [156] und könnten diese eingeschränkten Th1 Funktionen erklären.

## 6.2. Phänotyp der Monozyten im Vollblut

Die Anzahl der  $\text{CD14}^+$  Monozyten im Vollblut war bei MW-Patienten vergleichbar mit gesunden Kontrollen [157]. Allerdings zeigte sich bei MW-Patienten eine höhere Anzahl  $\text{CD163}^+$  Monozyten im peripheren Blut (Abb. 16.F), die ebenfalls eine verminderte Expression von HLA-DR Molekülen auf der Oberfläche aufwiesen (Abb. 16.C). Da eine erhöhte Expression von CD163 und reduzierte HLA-DR Expression Hinweise auf eine alternative Makrophagenaktivierung sind [52, 55, 68, 158], spiegelt dies die M2 Aktivierung der Monozyten im Blut bei MW-Patienten wider. Erhöhte IL-10 Expressionen von Monozyten (Abb. 19.A-B) und erhöhte Konzentrationen von IL-10 und  $\text{TGF-}\beta$  im Serum (Abb. 27.B-C) tragen zu diesem Erscheinungsbild bei. Eine verminderte HLA-DR Expression ist verbunden mit einer eingeschränkten Fähigkeit zur Antigenpräsentation und einer verringerten Fähigkeit T-Zellen zur Proliferation und  $\text{IFN}\gamma$  Produktion anzuregen. Dies führt dazu, dass die Ausbildung einer effizienten Immunantwort inhibiert wird [159]. Monozyten von MW-Patienten zeigten in der Peripherie erhöhte Expressionen von CD16 und CD64 im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 16.A-B). IL-10, welches ebenfalls im Serum von MW-Patienten erhöht war (Abb. 27.B), kann die Expression von CD16 und CD64 auf humanen Monozyten induzieren [117]. Daraus erfolgt eine erhöhte Phagozytose von opsonierten Partikeln, Bakterien oder Pilzen, andererseits reduziert IL-10 die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen ( $\text{O}_2^-$ ) und die NO Produktion, die für die Eliminierung von Pathogenen benötigt werden [115]. Zwar war die Phagozytoseaktivität der Monozyten bei MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen unverändert [7, 157], jedoch wurde ein verminderter oxidativer Burst der Monozyten von MW-Patienten festgestellt [157]. Insgesamt sprechen die hier präsentierten Ergebnisse für eine M2c Aktivierung von Monozyten der MW-Patienten, da die  $\text{Fc}\gamma$  Rezeptoren (Abb. 16.A-B) und die IL-10 Produktion (Abb. 19.A-B) erhöht und die HLA-DR Expression erniedrigt waren (Abb. 16.C) [52].

Die Expression des Darm-*homing* Marker Integrin- $\beta$ 7 war auf Monozyten unbehandelter MW-Patienten stark erhöht (Abb. 17), was darauf hindeutet, dass Monozyten von MW-Patienten

vermehrt in den Darm einwandern. Immunhistochemischen Analysen der Lamina propria des Duodenums bestätigten eine vermehrte Präsenz von M2 Makrophagen im Darm von MW-Patienten (Abb. 21) [7, 157].

Alle CD14<sup>+</sup> Monozyten exprimieren das  $\beta$ 2-Integrin CD11b auf ihrer Oberfläche, welches in die Phagozytose und dem respiratorischem Burst involviert ist [160]. MW-Patienten zeigten eine verstärkte Expression von CD11b auf Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 16.E), wobei die Anzahl CD11b<sup>+</sup> Monozyten vergleichbar war. In einer frühen Arbeit wurde eine verringerte Anzahl CD11b<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut nachgewiesen [161]. Dieser Unterschied könnte sich dadurch erklären, dass Marth et al. die Expression von CD11b nicht nur auf Monozyten sondern auf allen PBMC betrachteten. Der Prozentsatz CD11b<sup>+</sup> Zellen war größer als die Anzahl CD14<sup>+</sup> Zellen [161], was an der hohen Expression von CD11b durch NK-Zellen gelegen haben könnte [35]. Da die in dieser Arbeit präsentierten Analysen eine vergleichbare Anzahl von CD14<sup>+</sup> Zellen pro  $\mu$ l Vollblut bei MW-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten, könnte eventuell eine verringerte Anzahl der NK-Zellen bei MW-Patienten die von Marth et al. beschriebene Reduzierung der CD11b<sup>+</sup> Zellen erklären. Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte CD11b Expression auf Monozyten von MW-Patienten deutet auf einen starken Aktivierungsstatus der Zellen hin, was im Einklang mit einer verstärkten Expression von CD16 und CD64 ist (Abb. 16.A-B).

### 6.3. Funktionalität der Monozyten im Vollblut

Um die Funktionalität der Monozyten im Vollblut zu untersuchen, wurden Antigenstimulationen durchgeführt und die intrazelluläre Zytokinproduktion von Monozyten im Durchflusszytometer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Monozyten unbehandelter MW-Patienten nach Stimulation mit LPS oder *T. whipplei* erhöhte Mengen von IL-10 produzierten, nicht aber nach Stimulation mit dem hsp70 von *T. whipplei* (Abb. 19.A-B). Die Tatsache, dass nur *T. whipplei* und nicht das hsp70 von *T. whipplei* die IL-10 Produktion erhöht, spricht dafür, dass eine immunmodulatorische Komponente in *T. whipplei* enthalten ist, die im isolierten hsp70 von *T. whipplei* fehlt.

Die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  war in Monozyten unbehandelter Patienten im Vergleich zu behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollen vermindert (Abb. 18). Die Produktion des IL-1 Rezeptorantagonisten IL-1ra war bei MW-Patienten vergleichbar mit der gesunden Kontrollen (Abb. 19.C-D), obwohl IL-10 die IL-1ra Produktion in Monozyten erhöhen kann [115]. Monozyten behandelter Patienten zeigten hingegen vergleichbare Expressionen von IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 und IL-1ra wie gesunde Kontrollen nach LPS oder *T. whipplei* Stimulation (Abb. 18 und 19). IL-10 und TGF- $\beta$  können die Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha/\beta$  in LPS stimulierten Makrophagen inhibieren [162]. IL-10, TGF- $\beta$  und IL-4 können die TNF $\alpha$  Produktion in Monozyten

verhindern [163]. TGF- $\beta$  z. B. verhindert die Translation der TNF $\alpha$  mRNA nach 12-16 Stunden [162]. Denkbar ist aber auch, dass *T. whipplei* selbst an der Modulation der Zytokinproduktion beteiligt ist. So induziert *T. whipplei* z. B. IL-16 in humanen Monozyten, welches als immunmodulatorisch beschrieben ist [43]. Für andere humane Pathogene wie z. B. *Brucella suis*<sup>6</sup> ist bereits bekannt, dass sie die Synthese von TNF $\alpha$  und IL-12 in humanen Makrophagen inhibieren [18].

Da *T. whipplei* Bakterien durch die Antibiotikatherapie abgetötet werden, könnte die Modulation von ausschließlich Monozyten unbehandelter MW-Patienten bedeuten, dass der vitale Erreger selbst aktiv die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine nach Antigenstimulation unterstützt, pro-inflammatorische Immunantworten unterdrückt und so seine Persistenz ermöglicht. Die Verminderung von pro-inflammatorischen Immunantworten von Monozyten unbehandelter MW-Patienten ist nicht auf die mangelnde Expression von *Toll-like-Rezeptoren* (TLR)-2, TLR-4 oder CD14 zurückzuführen, da MW-Patienten vergleichbare Expressionen von TLR-2, TLR-4 und CD14 auf Monozyten zeigten. Außerdem ruft die Stimulation mit *T. whipplei* und LPS ähnliche Tendenzen in der Zytokinproduktion von Monozyten hervor (Abb. 18 und 19), obwohl gram<sup>+</sup> und gram<sup>-</sup> Bakterien bzw. deren Bestandteile unterschiedliche TLRs aktivieren.

Es wäre denkbar, dass bei MW-Patienten Makrophagen mit Endotoxin Toleranz vorliegen, da die funktionell und phänotypisch M2 Makrophagen sehr ähnlich sind [159]. Aus bisher unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass der LPS Gehalt im Serum bei MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht war. Demzufolge könnte bei MW-Patienten tatsächlich eine Überstimulation der Monozyten mit LPS *in vivo* vorliegen. Andererseits, wie bereits erwähnt, induzieren gram<sup>+</sup> *T. whipplei* Bakterien ähnliche Effekte wie das LPS gram<sup>-</sup> Bakterien, so dass es sich bei der verminderten pro-inflammatorischen Immunantwort der Makrophagen um ein LPS unabhängiges Phänomen zu handeln scheint.

Ein weiterer Hinweis auf einen alternativ aktivierten M2 Phänotyp im Rahmen des M. Whipple ist eine erhöhte Arginaseaktivität in Serumproben unbehandelter MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 25). So konnte z. B. bei schwangeren Frauen, die ebenfalls einen immunsupprimierten Phänotyp aufweisen, im peripheren Blut erhöhte Arginasewerte festgestellt werden [89, 164]. Humane Arginase-I wird, neben der induzierbaren Arginase-1 in Makrophagen, auch konstitutiv in Granulozyten exprimiert. Es konnte aber gezeigt werden, dass diese Expression konstant und unabhängig von dem umgebenden Milieu ist und sich nicht durch bestimmte Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$ ) stimulieren lässt [165]. Von daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte Arginaseaktivität im Serum von unbehandelten Patienten (Abb. 25), auf die erhöhte Anzahl von M2 Monozyten im Blut von MW-Patienten zurückzuführen ist (Abb. 16.F). Die Induktion

---

<sup>6</sup> Gramnegatives stäbchenförmiges Bakterium

der Arginaseaktivität beeinflusst die M1-abhängige Pathogenbekämpfung nachteilig und fördert die Proliferation der Pathogene [89]. So erfolgte die erste *in vitro* Kultur von *T. whipplei* in Makrophagen, die mit IL-4 und IL-10 deaktiviert wurden [166], d. h. in einen M2 Phänotyp differenzieren konnten. Außerdem wurde gezeigt, dass *T. whipplei* in Monozyten mit M1 Polarisation eliminiert wird, wohingegen er sich sehr gut in M2 Makrophagen repliziert [18].

#### 6.4. Phänotyp der Makrophagen im Duodenum

Verschiedene Punkte sprechen gegen eine exzessive Entzündungsreaktion im Duodenum von MW-Patienten. Immunhistochemische Färbungen ergaben eine vergleichbare Anzahl CD68<sup>+</sup> Makrophagen im Duodenum von MW-Patienten und Kontrollen ohne Darmsymptomatik [157]. Zudem ist die Anzahl CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lamina propria von MW-Patienten im Vergleich zu Kontrollen reduziert [157]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen bei MW-Patienten im Duodenum im Vergleich zu Kontrollen ohne *M. Whipple* erhöht ist [148]. Die geringe Entzündung spiegelt sich auch in der Makrophagendifferenzierung zu M2 Makrophagen wieder, da in der Lamina propria von MW-Patienten eine erhöhte Anzahl CD163<sup>+</sup> und Stabilin-1<sup>+</sup> Zellen und erniedrigte Mengen iNOS<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Kontrollen ohne Darmsymptomatik detektiert werden konnten (Abb. 21). Fast alle dieser CD163<sup>+</sup> Makrophagen im Duodenum von MW-Patienten hatten *T. whipplei* aufgenommen [157].

Einige dieser CD163<sup>+</sup> *T. whipplei*<sup>+</sup> Makrophagen persistieren auch nach der Behandlung mit Antibiotika für eine lange Zeit im Körper und sind nicht in der Lage, *T. whipplei* abzubauen [157]. Moos et al. zeigten, dass eine Infektion mit verschiedenen Mycobakterien und *Yersinia enterocolitica* nicht mit einer Hochregulation von CD163 und Stabilin-1 bzw. einer Verringerung von iNOS<sup>+</sup> Zellen im Duodenum einhergehen. Dies steht im Einklang mit der bereits beschriebenen klassischen Aktivierung der M1 Makrophagen durch diese Pathogene [157, 167]. Auch bei der Betrachtung der Zytokine in der Lamina propria von MW-Patienten zeigte sich ein Milieu, welches die Entstehung von M2 Makrophagen begünstigt, da die Anzahl IL-17<sup>+</sup> Zellen erniedrigt und die von IL-10<sup>+</sup> Zellen erhöht war (Abb. 22). Bereits Desnues et al. detektierten durch PCR und Mikroarrayanalysen eine erhöhte Genexpression von IL-10 in duodenalen Proben, allerdings bei nur einem MW-Patienten [156]. Die wichtige Bedeutung von IL-10 bei der Pathogenese des *M. Whipple* wurde somit in einer größeren Kohorte bestätigt (Abb. 22.B). Obwohl das im Duodenum nachgewiesene IL-17 bei MW-Patienten in dieser Arbeit zu einem großen Anteil von mehrkernigen Granulozyten produziert wurde, konnte in anderen Arbeiten der Nachweis von CD68<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> Makrophagen erbracht werden [120]. Daher könnte die reduzierte Anzahl an IL-17<sup>+</sup> Zellen in der Lamina propria von MW-Patienten (Abb. 22.A) durchaus auch auf eine erhöhte Anzahl von M2 Makrophagen

zurückzuführen sein. Auch wenn IL-17 nicht direkt von Makrophagen produziert wird, schafft eine verminderte Präsenz von IL-17 ein Milieu, das die entzündliche Aktivierung erschwert.

### 6.5. Funktioneller Nachweis von Makrophagen im Duodenum

Neben den Zytokinen ist der Argininstoffwechsel ein Indikator für die Aktivierung von Makrophagen. Während eine erhöhte Arginaseaktivität auf M2 Makrophagen hindeutet [60, 168], repräsentiert vermehrte iNOS Aktivität M1 Makrophagen [79].

Für den funktionellen Nachweis des Argininstoffwechsels von Makrophagen im Duodenum wurden frische Biopsien für 48 Stunden mit *T. whipplei* oder LPS stimuliert und im Kulturüberstand die Nitrit- und Harnstoffproduktion, als Maß für die Aktivität von iNOS bzw. Arginase, gemessen. Eine Analyse der Arginaseaktivität direkt *in situ* in den kurzzeitkultivierten duodenalen Biopsien war nicht möglich, da sich aufgrund der Kultivierung das Gewebe so weit zersetzt hatte, dass eine zuverlässige Aussage über die Arginaseaktivität nicht mehr möglich war. Die Analyse des Kulturüberstandes ergab jedoch, dass duodenale Proben von MW-Patienten eine reduzierte Nitritproduktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu Kontrollen ohne Darmsymptomatik zeigten (Abb. 24.A-B). Dies spiegelt die erniedrigte iNOS Expression bzw. iNOS Aktivität in der Lamina propria des Duodenums von MW-Patienten wider (Abb. 21.A). Eine verminderte Nitritproduktion in duodenalen Biopsien (Abb. 24.A) und ein reduzierter oxidativer Burst der Monozyten, wie sie bei MW-Patienten nachgewiesen wurden [157] reflektieren funktionelle Eigenschaften von M2 Makrophagen und tragen entscheidend dazu bei, dass M2 Makrophagen Bakterien schlechter eliminieren können als M1 Makrophagen [68, 169]. Zytokine beeinflussen ebenfalls das iNOS/Arginase Verhältnis. So kann TGF- $\beta$ , das vermehrt im Serum und Biopsie Überständen von MW-Patienten nachgewiesen werden konnte (Abb. 27.C+F), den NOS Signalweg herunter regulieren und die Expression von Arginase unterstützen [170].

Als Maß für eine hohe Arginaseaktivität wurde die Harnstoffkonzentration bei der Argininhydrolyse bestimmt [142, 171]. Die Harnstoffmessungen in Biopsieüberständen nach der Stimulation mit LPS oder *T. whipplei* waren jedoch vergleichbar bei MW-Patienten und Kontrollen ohne Darmsymptomatik. Dieses Ergebnis überraschte, da sowohl IL-10 als auch TGF- $\beta$ , welche beide bei MW-Patienten in Überständen von duodenalen Proben erhöht waren (Abb. 27.E-F), Arginase-I induzieren können [89, 94]. Betrachtet man die Ratio zwischen Nitrit- und Harnstoffproduktion nach LPS Stimulation (Abb. 24.C) ist ersichtlich, dass die Immunantwort bei MW-Patienten zu Gunsten einer erhöhten Harnstoffproduktion verschoben ist. iNOS und Arginase konkurrieren um das Substrat Arginin und beide Enzyme regulieren sich gegenseitig [94]. iNOS inhibiert die Arginaseaktivität durch Hydroxy-L-Arginin, ein Zwischenprodukt bei der Hydrolyse von Arginin zu NO [94, 172]. Arginase inhibiert die Produktion von NO, indem es die Verfügbarkeit von intrazellulärem Arginin einschränkt [94].

Daher deutet die Ratio zu Gunsten von Harnstoff auf ein Überwiegen der Arginaseaktivität hin. Die Arginaseaktivität in frisch isolierten duodenalen Biopsien nahm mit fortschreitender Behandlungsdauer der MW-Patienten zu. Dies könnte widerspiegeln, dass der Erreger *T. whipplei* langsam aus dem Körper der MW-Patienten eliminiert wird, sich die beschädigten Zellen regenerieren und das natürliche Gleichgewicht wiederhergestellt wird.

### 6.6. Analyse des Zytokin- und Chemokinmilieus in der Peripherie und im Duodenum

Im Serum von MW-Patienten konnten erhöhte Konzentrationen an CCL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden (Abb. 27+28). Im Gegensatz dazu war die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  vergleichbar mit gesunden Kontrollen (Abb. 26.A-B). Die Menge an IL-17 und IFN $\gamma$  war im Serum von MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt (Abb. 26.C-D). Eine verminderte IFN $\gamma$  Produktion von MW-Patienten wurde bereits von Marth et al. beschrieben [32]. Im Vergleich zu MW-Patienten wurden bei IBD Patienten (Morbus Crohn / Colitis ulcerosa) erhöhte Konzentrationen von IL-17 im Serum beschrieben [120]. Schinnerling et al. konnten zeigen, dass T-Zellen von MW-Patienten verringerte Mengen an IL-17 nach SEB Stimulation produzieren [148]. Die Konzentration von IL-6 war im Serum bei unbehandelten MW-Patienten noch höher als bei behandelten MW-Patienten (Abb. 26.A). Zudem konnte in Biopsie-Überständen und in Monozyten nach Antigenstimulation mit LPS oder *T. whipplei* keine erhöhten IL-6 Expressionen nachgewiesen werden (Abb. 26.E; Abb. 18.C-D). Da IL-6 ein Akutphaseprotein ist, wird es in der frühen Phase der Infektion gebildet [85]. Im Blut von MW-Patienten sind einige Entzündungsparameter erhöht. Zusätzlich zur gesteigerten IL-6 Konzentration im Serum weisen MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Konzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP) [173] und LPS (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) auf. CRP wird hauptsächlich in der Leber sekretiert und kann durch IL-6 gesteigert werden [174]. Zudem besteht auch eine positive Korrelation zwischen IL-6 und CRP [175]. Th2-Zellen könnten für die erhöhte Produktion von IL-6 im Serum verantwortlich sein [156]. Zudem könnte IL-6 das Überleben von *T. whipplei* erleichtern, da es die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen induziert [176]. In Makrophagen hat *T. whipplei* bessere Überlebenschancen als in Monozyten, da in Makrophagen kein Thioredoxin vorhanden ist, welches Bakterien abtötet [43]. Thioredoxin aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und ermöglicht somit die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [43].

In duodenalen Proben von MW-Patienten war die Produktion von IL-6 unverändert und die Konzentration von TNF $\alpha$ , IL-17 und IFN $\gamma$  im Vergleich zu gesunden Kontrollen leicht erhöht (Abb. 26.E-H). Laut immunhistochemischen Analysen ist der Anteil IL-17 produzierender Zellen im Duodenum von MW-Patienten erniedrigt (Abb. 22.A). Diese Diskrepanz könnte

sich dadurch erklären lassen, dass im Duodenum von MW-Patienten weniger Zellen IL-17 produzieren, dafür aber jede einzelne Zelle mehr IL-17 sekretiert. Bei MW-Patienten konnten aber auch höhere Konzentrationen anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ , nachgewiesen werden (Abb. 27). In der nicht entzündeten Mukosa wird TGF- $\beta$  und CXCL-8 konstitutiv von mukosalen Epithelzellen und Mastzellen produziert und durch die extrazelluläre Matrix der Lamina propria (Stroma) abgegeben [177]. Dadurch werden zirkulierende Blutmonozyten angezogen und differenzieren zu residenten Gewebsmakrophagen [177].

Kalt et al. konnten in ihrer Arbeit keine Veränderungen in der TGF- $\beta$  Produktion im Serum von MW-Patienten und gesunden Kontrollen feststellen, zudem zeigten sie, dass Serum von MW-Patienten eine reduzierte TNF $\alpha$  Konzentration im Vergleich zu Kontrollen aufwies [36]. Möglicherweise liegen die Unterschiede darin begründet, dass in der hier vorliegenden Arbeit eine wesentlich größere Kohorte betrachtet wurde.

Des Weiteren waren in duodenalen Proben die Konzentrationen der Chemokine CCL-3, CCL-4 und CXCL-9 bei MW-Patienten unabhängig vom Behandlungszustand vergleichbar mit gesunden Kontrollen (Abb. 28.F-H). In Serumproben hingegen waren diese drei Chemokine und zusätzlich CCL-2 bei MW-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht (Abb. 28.A-D). In Überständen duodener Proben von behandelten MW-Patienten zeigte sich eine Erniedrigung der CCL-2 Konzentration im Vergleich zu unbehandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollen (Abb. 28.E). Moos et al. konnten zwar zeigen, dass in duodenalen Proben die CCL-2 mRNA bei MW-Patienten erhöht war [157], dies wurde aber in dieser Arbeit auf Proteinebene nicht nachgewiesen. Gerade bei den streng kontrollierten Zytokinen korrelieren mRNA und Proteinkonzentration oft nicht [178]. Sowohl IL-10 als auch CCL-2 fördern die M2 Polarisierung von Makrophagen. Zusätzlich unterstützt CCL-2 die Polarisierung von Th2 Zellen [179] und wirkt stark chemotaktisch auf Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen und lockt die Zellen an den Ort der Entzündung [106]. Ein Zytokinmilieu mit erniedrigten IFN $\gamma$  und erhöhten IL-4 Konzentrationen fördert ebenfalls die Differenzierung von M2 Makrophagen [68].

### 6.7. Analyse *in vitro* differenzierter Makrophagen

Bis jetzt ist unklar, ob *T. whipplei* selbst die Makrophagenaktivierung und Differenzierung beeinflussen kann oder ob ein intrinsischer Defekt der Makrophagen von MW-Patienten das Überleben von *T. whipplei* ermöglicht. Weiterhin könnte das Zytokinmilieu der T-Zellen die Makrophagen beeinflussen. Daher wurden aus CD14<sup>+</sup> Monozyten Makrophagen *in vitro* ausdifferenziert, um ihre Aktivierung unabhängig vom Milieu zu untersuchen, das im Blut und Duodenum von MW-Patienten vorherrscht. Die M1 Differenzierung erfolgte mit GM-CSF und

die M2 Makrophagendifferenzierung mit M-CSF. Da im humanen System die Bedingungen für eine M1/M2 Differenzierung nicht umfassend festgelegt und auch die verschiedenen Differenzierungsstufen nicht ganz klar eingegrenzt sind, stellt dieses System eine Annäherung an die *in vitro* Differenzierung von Makrophagen dar.

*In vitro* differenzierte Makrophagen wurden an Tag 10 auf ihre Expression von typischen Makrophagenmarkern untersucht. M2 Makrophagen wiesen eine stärkere CD14 und CD163 Expression auf ihrer Zelloberfläche als M1 Makrophagen auf (Abb. 29). Dabei unterschieden sich M1 und M2 Makrophagen nicht in der Expression von CD68, HLA-DR und CD64 (ohne Abb.). Dies deckt sich auch mit den Analysen von Verreck et al. [84]. Allerdings postulierten Verreck et al. eine höhere CD16 Expression in M2 im Vergleich zu M1 Makrophagen. Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, weder phänotypisch noch funktionell, da sich die über CD16 vermittelte Phagozytoseleistung zwischen M1 und M2 Makrophagen nicht signifikant unterschied (Abb. 30). Es wurde beschrieben, dass *in vitro* differenzierte M1 Makrophagen eine stärkere Expression von 25F9 aufweisen als M2 Makrophagen [180]. 25F9 wurde auch als ein Marker für spät aktivierte Makrophagen definiert [181]. In dieser Arbeit konnten keine abweichenden Expressionen von 25F9 auf *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen festgestellt werden. Eventuell liegt dies an der im Vergleich zur vorherigen Publikation unterschiedlichen Differenzierungsdauer. Waldo et al. untersuchten den Phänotyp an Tag sieben [180], in dieser Arbeit wurde der Phänotyp aber erst am zehnten Tag betrachtet. Vielleicht ist also die erhöhte Expression von 25F9 auf M1 Makrophagen nur in den ersten Tagen der Differenzierung sichtbar. Zum anderen verwendeten Waldo et al. für die Differenzierung von M2 Makrophagen M-CSF und IL-10 [180]. Möglicherweise verursacht auch IL-10 die gesteigerte Expression von 25F9 auf *in vitro* differenzierten Makrophagen, da IL-10 M1 Makrophagen deaktivieren kann [68, 162].

M1 und M2 Makrophagen unterscheiden sich in ihrer Zytokinproduktion nach Antigenstimulation. Die klassisch aktivierten M1 Makrophagen produzieren bevorzugt pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$ , wohingegen bei den alternativ aktivierten M2 Makrophagen die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 überwiegt. Nach 48-stündiger Inkubation von *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen mit *T. whipplei* ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Produktionen von IL-6,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TGF-}\beta$  in den beiden Makrophagensubpopulationen. Lediglich CCL-3 wurde vermehrt von den hier generierten M1 Makrophagen produziert, während sich die M2 Makrophagen durch eine höhere IL-10 Sekretion auszeichneten (Abb. 34). CCL-3 ist ein inflammatorisches wirksames Chemokin und es wurde bereits beschrieben, dass es bevorzugt von M1 Makrophagen gebildet wird [127].

Es wurde getestet, ob *T. whipplei* in *in vitro* differenzierten Makrophagen die Phagozytose beeinflussen kann. Makrophagen, die vor dem Phagozytostest mit *T. whipplei* inkubiert wurden, wiesen eine verringerte Phagozytosefähigkeit auf (Abb. 30). Allerdings wurde diese verringerte Phagozytose auch nach Inkubation mit *E. coli* oder *Cellulomonas celluans* beobachtet. Von daher ist die reduzierte rezeptorunabhängige Phagozytose von Dextranpartikel kein *T. whipplei*-spezifischer Effekt. M2 Makrophagen besitzen eine höhere Phagozytosekapazität als klassisch aktivierte Makrophagen [182]. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der Phagozytoseleistung zwischen *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen festgestellt werden (Abb. 30). Lediglich die erhöhte rezeptorabhängige Phagozytose von Transferrinpartikeln in M2 Makrophagen spiegelt die Differenzierung wieder (Abb. 30.B), da M2 Makrophagen verstärkt den Transferrinrezeptor CD71 auf ihrer Oberfläche exprimieren [183].

Es konnten keine Unterschiede in der Nitritproduktion und der Arginaseaktivität *per se* von *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 31). Somit spiegeln diese funktionellen Testsysteme den Differenzierungsstatus nicht wider. Durch die zum Nitritnachweis notwendige Vorbehandlung mit  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  könnten sich innerhalb der 48 Stunden die M2 in M1 Makrophagen umgewandelt haben, was die nicht vorhandenen Unterschiede in der Nitritproduktion und Arginaseaktivität zwischen den *in vitro* differenzierten M1 und M2 Makrophagen erklären könnte [73-75]. Des Weiteren ergab die Inkubationen mit *T. whipplei* oder LPS keine spezifisch nachweisbare Produktion von Nitrit. Eventuell liegt die Nitritproduktion unterhalb der Nachweisgrenze, da erst nach Nitratreduktion mit NADPH und Nitratreduktase Nitritwerte mit dem Griess-Reagenz nachgewiesen werden konnten. Der mangelnde Nachweis könnte auch auf suboptimale Differenzierung zurückzuführen sein. *In situ* erfolgt die Makrophagendifferenzierung viel effizienter als *in vitro* und ist von mehreren Faktoren abhängig.

LPS ist in der Lage, iNOS und die Arginaseaktivität gleichermaßen zu induzieren, allerdings reduziert  $\text{IFN}\gamma$  diese Wirkung von LPS [184]. In Biopsieüberständen konnte nach LPS Stimulation eine Nitritproduktion trotz  $\text{IFN}\gamma$  Vorbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 24.A). Han et al. analysierten ebenfalls die Nitritproduktion in M2 Makrophagen (M1 nicht generiert) von gesunden Kontrollen und detektierten ähnliche Werte in der Nitritproduktionen von M2 Makrophagen wie in dieser Arbeit [185].

*In vitro* differenzierte M1 und M2 Makrophagen wurden auch auf ihre Fähigkeit hin untersucht,  $\text{CD4}^+$  T-Zellen Antigene zu präsentieren und diese dann zur Proliferation und  $\text{IFN}\gamma$  Produktion anzuregen. Die Funktionalität *in vitro* differenzierter M1 und M2 Makrophagen konnte durch die Stimulation mit hCMV gezeigt werden (Abb. 33). Hierbei zeigte sich, dass sowohl M1 als auch M2 Makrophagen von MW-Patienten und gesunden

Kontrollen in der Lage waren, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Proliferation und IFN $\gamma$  Produktion anzuregen, wobei M1 Makrophagen stärkere T-Zellantworten induzieren konnten als M2 Makrophagen. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Verschoor et al. [60].

Jedoch waren weder M1 noch M2 Makrophagen von MW-Patienten in der Lage eine *T. whipplei*-spezifische Reaktion anzuregen (Abb. 32). Dies könnte bedeuten, dass *in vitro* differenzierte M1 und M2 Makrophagen von MW-Patienten nicht fähig sind, den T-Zellen *T. whipplei*-Antigene effizient zu präsentieren, andererseits könnten aber auch die T-Zellen nicht in der Lage sind, *T. whipplei* Antigene auf MHC-Klasse II Komplexen zu erkennen. Zum anderen könnte es auch einen Verlust von *T. whipplei* spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie widerspiegeln und somit könnte trotz effizienter Antigenpräsentation keine *T. whipplei* spezifische Th1 Antwort ausgelöst worden sein.

Abschließend sollte analysiert werden, ob *in vitro* differenzierte Makrophagen ihren Polarisierungszustand ändern können, da dies langfristig gesehen als potentielle Therapie für MW-Patienten eingesetzt werden könnte. Um dies zu erreichen, wurden zu bereits ausdifferenzierten M1 und M2 Makrophagen die Wachstumsfaktoren zur Differenzierung in die jeweils andere Makrophagensubpopulation gegeben und phänotypische und funktionelle Veränderungen analysiert. Die hier vorliegenden Daten zeigten, dass sich M2 Makrophagen in M1 Makrophagen durch Zugabe von GM-CSF umwandeln (Abb. 35+36). Im umgekehrten Fall konnte hier M1 Makrophagen durch Zugabe von M-CSF, IL-4 oder IL-10 nicht in M2 Makrophagen repolarisiert werden (Abb. 35+36). Vermutlich liegt die mangelnde Reversibilität der M2 Differenzierung in der Konzentration oder Kombination der verwendeten Zytokine begründet, da IL-10 eigentlich die Expression von CD163 und CCL-18 erhöhen sollte [73]. Daher ist es denkbar, dass höhere Konzentrationen von IL-4 und IL-10 oder weitere Zytokine wie z. B. TGF- $\beta$  prinzipiell den Wechsel von M1 zu M2 Makrophagen ermöglichen sollten [73-75]. Für unser Verständnis der Pathogenese des *M. Whipple* war es jedoch wichtig die Reversibilität der M2 Differenzierung nachzuweisen, da eine M1 Polarisierung für eine erfolgreiche Abwehr von *T. whipplei* notwendig zu sein scheint [68].

Die Analyse der *in vitro* Daten zeigte im Vergleich zu den *ex vivo* erhobenen Daten kaum Unterschiede zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen auf. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass intrinsische Makrophagendefekte für die Pathogenese des *M. Whipple* verantwortlich sind. Viel mehr erscheint es als Folge extremer Bedingungen das M2 Polarisierung stattfindet. Das vorhandene Zytokinmilieu in der Peripherie und im Duodenum bei MW-Patienten favorisiert M2 Makrophagen und zusätzlich induziert der Erreger *T. whipplei* selbst die Polarisierung von M2 Makrophagen bei MW-Patienten [157]. Da prinzipiell M2 Makrophagen von MW-Patienten zu M1 Makrophagen repolarisiert werden können, ist

---

der Einfluss des generellen Milieus in Kombination mit den Modulationen durch *T. whipplei* wahrscheinlicher als ein intrinsischer Defekt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine M2 Makrophagenpolarisierung bei MW-Patienten sowohl im Blut als auch im Duodenum (Abb. 18-25). Die M2 Polarisation scheint bereits bei Monozyten sichtbar zu sein (Abb. 16). Der Argininstoffwechsel war nur bedingt aussagekräftig da z. B. in der *in vitro* Differenzierung von Makrophagen keine Unterschiede zwischen M1 und M2 Makrophagen detektiert werden konnten (Abb. 31). Des Weiteren zeigte die *in vitro* Differenzierung von M1 und M2 Makrophagen kaum Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten auf (Abb. 29-36). Das Zytokinmilieu und die Empfänglichkeit der Monozyten/Makrophagen für die Modulation durch *T. whipplei* sind offenbar entscheidend. Dafür spricht ein anti-inflammatorisches Milieu mit einer hohen IL-10 und TGF- $\beta$  Konzentration im Blut und im Duodenum (Abb. 27). Auffällig ist die moderate Entzündung trotz der massiven Besiedlung von *T. whipplei* in den Makrophagen der Lamina propria. Die moderate Erhöhung der Sekretion einiger entzündliche Zytokine könnten auch durch eine Schleimhautschädigungen und den daraus resultierenden Barriere Defekt erklärt werden. *T. whipplei* induzierte in Monozyten der MW-Patienten eine vermehrte Produktion von IL-10, wohingegen das hsp70 von *T. whipplei* nicht die Expression von IL-10 erhöhte (Abb. 19.A). Daher besitzt *T. whipplei* unter Umständen modulatorisch wirkende Komponenten, die in Zukunft näher charakterisiert werden sollten.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Whipple, G.H., *A hitherto undescribed disease characterized anatomically by deposits of fat and fatty acids in the intestinal and mesenteric lymphatic tissues*. Bull Johns Hopkins Hosp, 1907. **18**: p. 382-393.
2. Raoult, D., et al., *Cultivation of the bacillus of Whipple's disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 620-5.
3. Fenollar, F., X. Puechal, and D. Raoult, *Whipple's disease*. N Engl J Med, 2007. **356**(1): p. 55-66.
4. Schneider, T., et al., *Whipple's disease: new aspects of pathogenesis and treatment*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(3): p. 179-90.
5. Dobbins, W.O., 3rd, *HLA antigens in Whipple's disease*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(1): p. 102-5.
6. La Scola, B., et al., *Description of Tropheryma whipplei gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 4): p. 1471-9.
7. Desnues, B., et al., *Whipple's disease: a macrophage disease*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(2): p. 170-8.
8. Maiwald, M., et al., *Environmental occurrence of the Whipple's disease bacterium (Tropheryma whippelii)*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(2): p. 760-2.
9. Marth, T. and D. Raoult, *Whipple's disease*. Lancet, 2003. **361**(9353): p. 239-46.
10. Renesto, P., et al., *Genome-based design of a cell-free culture medium for Tropheryma whipplei*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 447-9.
11. Raoult, D., et al., *Tropheryma whipplei Twist: a human pathogenic Actinobacteria with a reduced genome*. Genome Res, 2003. **13**(8): p. 1800-9.
12. Kowalczywska, M., et al., *Identification of candidate antigen in Whipple's disease using a serological proteomic approach*. Proteomics, 2006. **6**(11): p. 3294-305.
13. Mini, R., et al., *Helicobacter pylori immunoproteomes in case reports of rosacea and chronic urticaria*. Proteomics, 2005. **5**(3): p. 777-87.
14. Morgenegg, S., et al., *Antibodies against recombinant heat shock protein 65 of Tropheryma whipplei in patients with and without Whipple's disease*. J Microbiol Methods, 2001. **47**(3): p. 299-306.
15. Rolain, J.M., F. Fenollar, and D. Raoult, *False positive PCR detection of Tropheryma whipplei in the saliva of healthy people*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 48.
16. Schoniger-Hekele, M., et al., *Tropheryma whipplei in the environment: survey of sewage plant influents and sewage plant workers*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(6): p. 2033-5.
17. Bonhomme, C.J., et al., *Serological microarray for a paradoxical diagnostic of Whipple's disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(10): p. 959-68.
18. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3733-9.

19. Fenollar, F., et al., *Prevalence of asymptomatic Tropheryma whippiei carriage among humans and nonhuman primates*. J Infect Dis, 2008. **197**(6): p. 880-7.
20. Fenollar, F., et al., *Tropheryma whippiei in fecal samples from children, Senegal*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(6): p. 922-4.
21. Raoult, D., et al., *Tropheryma whippiei in children with gastroenteritis*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(5): p. 776-82.
22. Geissdorfer, W., et al., *High frequency of Tropheryma whippiei in culture-negative endocarditis*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(2): p. 216-22.
23. Lepidi, H., et al., *Cardiac valves in patients with Whipple endocarditis: microbiological, molecular, quantitative histologic, and immunohistochemical studies of 5 patients*. J Infect Dis, 2004. **190**(5): p. 935-45.
24. Marin, M., et al., *Tropheryma whippiei infective endocarditis as the only manifestation of Whipple's disease*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(6): p. 2078-81.
25. Lagier, J.C., et al., *Systemic Tropheryma whippiei: clinical presentation of 142 patients with infections diagnosed or confirmed in a reference center*. Medicine (Baltimore), 2010. **89**(5): p. 337-45.
26. Moos, V. and T. Schneider, *Changing paradigms in Whipple's disease and infection with Tropheryma whippiei*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011. **30**(10): p. 1151-8.
27. Raoult, D., *Afebrile blood culture-negative endocarditis*. Ann Intern Med, 1999. **131**(2): p. 144-6.
28. Gubler, J.G., et al., *Whipple endocarditis without overt gastrointestinal disease: report of four cases*. Ann Intern Med, 1999. **131**(2): p. 112-6.
29. Li, W., et al., *Genotyping reveals a wide heterogeneity of Tropheryma whippiei*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 2): p. 521-7.
30. Martinetti, M., et al., *The HLA alleles DRB1\*13 and DQB1\*06 are associated to Whipple's disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2289-94.
31. Moos, V., et al., *Reduced peripheral and mucosal Tropheryma whippiei-specific Th1 response in patients with Whipple's disease*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 2015-22.
32. Marth, T., et al., *Dysregulated peripheral and mucosal Th1/Th2 response in Whipple's disease*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1468-77.
33. Bai, J.C., et al., *Impaired monocyte function in patients successfully treated for Whipple's disease*. Acta Gastroenterol Latinoam, 1996. **26**(2): p. 85-9.
34. Bjerknes, R., O.D. Laerum, and S. Odegaard, *Impaired bacterial degradation by monocytes and macrophages from a patient with treated Whipple's disease*. Gastroenterology, 1985. **89**(5): p. 1139-46.
35. Marth, T., et al., *Defects of monocyte interleukin 12 production and humoral immunity in Whipple's disease*. Gastroenterology, 1997. **113**(2): p. 442-8.
36. Kalt, A., et al., *Decreased levels of interleukin-12p40 in the serum of patients with Whipple's disease*. Int J Colorectal Dis, 2006. **21**(2): p. 114-20.
37. Park, J.B., *Phagocytosis induces superoxide formation and apoptosis in macrophages*. Exp Mol Med, 2003. **35**(5): p. 325-35.

38. Gwinn, M.R. and V. Vallyathan, *Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2006. **9**(1): p. 27-39.
39. Kaufmann, S.H., *Immunity to intracellular bacteria*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 129-63.
40. Detanico, T., et al., *Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation*. Clin Exp Immunol, 2004. **135**(2): p. 336-42.
41. Desnues, B., K. Al Moussawi, and F. Fenollar, *New insights into Whipple's disease and Tropheryma whippelii infections*. Microbes Infect, 2010. **12**(14-15): p. 1102-10.
42. Ghigo, E., et al., *Survival of Tropheryma whippelii, the agent of Whipple's disease, requires phagosome acidification*. Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1501-6.
43. Desnues, B., D. Raoult, and J.L. Mege, *IL-16 is critical for Tropheryma whippelii replication in Whipple's disease*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4575-82.
44. Bonhomme, C.J., et al., *Tropheryma whippelii glycosylation in the pathophysiologic profile of Whipple's disease*. J Infect Dis, 2009. **199**(7): p. 1043-52.
45. Riha, P. and C.E. Rudd, *CD28 co-signaling in the adaptive immune response*. Self Nonself, 2010. **1**(3): p. 231-240.
46. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
47. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
48. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
49. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
50. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
51. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
52. Rees, A.J., *Monocyte and macrophage biology: an overview*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 216-33.
53. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
54. Nicola, N.A. and D. Metcalf, *Specificity of action of colony-stimulating factors in the differentiation of granulocytes and macrophages*. Ciba Found Symp, 1986. **118**: p. 7-28.
55. Scotton, C.J., et al., *Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 834-45.
56. Whitelaw, D.M., *Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling*. Cell Tissue Kinet, 1972. **5**(4): p. 311-7.
57. Kumar, S. and R. Jack, *Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells*. J Endotoxin Res, 2006. **12**(5): p. 278-84.
58. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.

59. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. *Blood*, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
60. Verschoor, C.P., A. Puchta, and D.M. Bowdish, *The macrophage*. *Methods Mol Biol*, 2012. **844**: p. 139-56.
61. Fingerle, G., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients*. *Blood*, 1993. **82**(10): p. 3170-6.
62. Grip, O., et al., *Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(5): p. 566-72.
63. Lingnau, M., et al., *Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes*. *Hum Immunol*, 2007. **68**(9): p. 730-8.
64. Forsyth, R.G., et al., *CD33+ CD14- phenotype is characteristic of multinuclear osteoclast-like cells in giant cell tumor of bone*. *J Bone Miner Res*, 2009. **24**(1): p. 70-7.
65. Gallay, P., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS*. *J Infect Dis*, 1994. **170**(5): p. 1319-22.
66. van der Meer, J.H., M.G. Netea, and C.A. Dinarello, *Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **156**(3): p. 428-33.
67. Siwiec, J., et al., *[Evaluation of Th1/Th2 lymphocyte balance and lipopolysaccharide receptor expression in asthma patients]*. *Pneumonol Alergol Pol*, 2009. **77**(2): p. 123-30.
68. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
69. Tobias, P.S., et al., *Innate immune system recognition of microbial pathogens*. *Immunol Res*, 2000. **21**(2-3): p. 341-3.
70. Testro, A.G., et al., *Effects of antibiotics on expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 on mononuclear cells in patients with advanced cirrhosis*. *J Hepatol*, 2010. **52**(2): p. 199-205.
71. Goerdts, S. and C.E. Orfanos, *Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells*. *Immunity*, 1999. **10**(2): p. 137-42.
72. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
73. Porcheray, F., et al., *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **142**(3): p. 481-9.
74. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(3): p. 509-13.
75. Stout, R.D., et al., *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. *J Immunol*, 2005. **175**(1): p. 342-9.
76. Warwick-Davies, J., D.B. Lowrie, and P.J. Cole, *Selective deactivation of human monocyte functions by TGF-beta*. *J Immunol*, 1995. **155**(6): p. 3186-93.
77. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. *J Exp Med*, 1992. **176**(1): p. 287-92.

78. Mantovani, A., et al., *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 328-36.
79. Villalta, S.A., et al., *Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(3): p. 482-96.
80. Schebesch, C., et al., *Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro*. Immunology, 1997. **92**(4): p. 478-86.
81. Philippidis, P., et al., *Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery*. Circ Res, 2004. **94**(1): p. 119-26.
82. Kzhyshkowska, J., et al., *Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 5825-32.
83. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
84. Verreck, F.A., et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 285-93.
85. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
86. Dale, D.C., L. Boxer, and W.C. Liles, *The phagocytes: neutrophils and monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 935-45.
87. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 126-34.
88. Jorens, P.G., K.E. Matthys, and H. Bult, *Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages*. Mediators Inflamm, 1995. **4**(2): p. 75-89.
89. Stempin, C.C., et al., *Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 683485.
90. Lee, J.S., et al., *Nitric Oxide Synthesis is Modulated by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Interferon-gamma in Human Macrophages after Mycobacterial Infection*. Immune Netw, 2009. **9**(5): p. 192-202.
91. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
92. Schulze-Tanzil, G., et al., *The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights*. Scand J Med Sci Sports, 2011. **21**(3): p. 337-51.
93. Natal, C., et al., *Specific protein nitration in nitric oxide-induced apoptosis of human monocytes*. Apoptosis, 2008. **13**(11): p. 1356-67.
94. Popovic, P.J., H.J. Zeh, 3rd, and J.B. Ochoa, *Arginine and immunity*. J Nutr, 2007. **137**(6 Suppl 2): p. 1681S-1686S.
95. Morris, S.M., Jr., *Enzymes of arginine metabolism*. J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
96. Morris, S.M., Jr., D. Kepka-Lenhart, and L.C. Chen, *Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. E740-7.

97. Horowitz, S., et al., *Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(5): p. G1323-36.
98. Pesce, J.T., et al., *Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000371.
99. El Kasmi, K.C., et al., *Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1399-406.
100. Modolell, M., et al., *Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1101-4.
101. Hesse, M., et al., *Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6533-44.
102. Sanchez-Munoz, F., A. Dominguez-Lopez, and J.K. Yamamoto-Furusho, *Role of cytokines in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(27): p. 4280-8.
103. Roca, H., et al., *CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34342-54.
104. Arend, W.P., G. Palmer, and C. Gabay, *IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 20-38.
105. Matsumoto, S., et al., *Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1543-51.
106. Melgarejo, E., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 998-1001.
107. Schutysse, E., A. Richmond, and J. Van Damme, *Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 14-26.
108. Wisniewski, T., et al., *Assessment of chemokine receptor function on monocytes in whole blood: In vitro and ex vivo evaluations of a CCR2 antagonist*. J Immunol Methods, 2010. **352**(1-2): p. 101-10.
109. Ma, X., et al., *Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1722-9.
110. Schreiber, T., et al., *Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1301-12.
111. Gerber, J.S. and D.M. Mosser, *Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6861-8.
112. Arend, W.P., et al., *IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently*. J Immunol, 1991. **147**(5): p. 1530-6.
113. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.

114. Nishimoto, N. and T. Kishimoto, *Interleukin 6: from bench to bedside*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(11): p. 619-26.
115. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
116. Moroguchi, A., et al., *Interleukin-10 suppresses proliferation and remodeling of extracellular matrix of cultured human skin fibroblasts*. Eur Surg Res, 2004. **36**(1): p. 39-44.
117. te Velde, A.A., et al., *IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 4048-52.
118. Schaefer, A., et al., *Mechanism of interferon-gamma mediated down-regulation of interleukin-10 gene expression*. Mol Immunol, 2009. **46**(7): p. 1351-9.
119. Calzada-Wack, J.C., M. Frankenberger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages*. J Inflamm, 1996. **46**(2): p. 78-85.
120. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
121. Fang, J.W., et al., *Interleukin-17A differentially modulates BCG induction of cytokine production in human blood macrophages*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(2): p. 333-41.
122. Blaschitz, C. and M. Raffatellu, *Th17 cytokines and the gut mucosal barrier*. J Clin Immunol, 2010. **30**(2): p. 196-203.
123. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
124. Del Zotto, B., et al., *TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(1): p. 120-6.
125. Dickensheets, H.L., et al., *Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4162-71.
126. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. Adv Immunol, 1994. **55**: p. 97-179.
127. Dorner, B.G., et al., *MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6181-6.
128. Ugucioni, M., et al., *Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes*. Eur J Immunol, 1995. **25**(1): p. 64-8.
129. Taub, D.D., et al., *Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta*. Science, 1993. **260**(5106): p. 355-8.
130. Farber, J.M., *Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(3): p. 246-57.
131. Martinet, L., et al., *High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes*. Oncoimmunology, 2012. **1**(6): p. 829-839.
132. Santos, J.C., et al., *Up-regulation of chemokine C-C ligand 2 (CCL2) and C-X-C chemokine 8 (CXCL8) expression by monocytes in chronic idiopathic urticaria*. Clin Exp Immunol, 2012. **167**(1): p. 129-36.

133. Nogueira, L.G., et al., *Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(10): p. e1867.
134. Boulos, A., J.M. Rolain, and D. Raoult, *Antibiotic susceptibility of Tropheryma whipplei in MRC5 cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(3): p. 747-52.
135. Liu, S., et al., *Removal of endotoxin from recombinant protein preparations*. Clin Biochem, 1997. **30**(6): p. 455-63.
136. [www.sickkids.ca/research/FCF/images/FACSlayout.gif](http://www.sickkids.ca/research/FCF/images/FACSlayout.gif). Stand: März 2007
137. Wang, X.Q., et al., *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. **37**(6): p. 379-85.
138. Durante, W., F.K. Johnson, and R.A. Johnson, *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(9): p. 906-11.
139. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
140. Granger, D.L., et al., *Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 142-51.
141. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07921.pdf>. Stand: März 2013
142. Corraliza, I.M., et al., *Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 231-5.
143. Conrad, K., *Diplomarbeit: HIV-1 assoziierte immunologische Veränderungen in der intestinalen Mukosa und im peripheren Blut*, 2010: Humboldt Universität zu Berlin.
144. <http://www.medizin.uni-greifswald.de/immun/meddiagn/leukdiff.html#Punkt%203>. Stand: März 2013
145. Kohalmi, F., et al., *[Expression of macrophage markers in childhood and adult Langerhans histiocytosis (LCH)]*. Orv Hetil, 1997. **138**(22): p. 1399-402.
146. Joshi, A.D., et al., *Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages*. BMC Immunol, 2010. **11**: p. 52.
147. Maiwald, M., P.W. Lepp, and D.A. Relman, *Analysis of conserved non-rRNA genes of Tropheryma whipplei*. Syst Appl Microbiol, 2003. **26**(1): p. 3-12.
148. Schinnerling, K., et al., *Regulatory T cells in patients with Whipple's disease*. J Immunol, 2011. **187**(8): p. 4061-7.
149. Cerutti, A. and M. Rescigno, *The biology of intestinal immunoglobulin A responses*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 740-50.
150. Macpherson, A.J., et al., *The immune geography of IgA induction and function*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(1): p. 11-22.
151. Geelhaar, A., et al., *Specific and nonspecific B-cell function in the small intestines of patients with Whipple's disease*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4589-92.
152. Golovistikov, I.N. and N.Z. Porakishvili, *[Age-related changes in the immunoglobulins of human blood serum]*. Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki, 1984(11): p. 78-82.
153. Adjobimey, T. and A. Hoerauf, *Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation*. Ann Trop Med Parasitol, 2010. **104**(6): p. 455-64.

154. Clancy, R., et al., *Characteristics of the immune response in a patient with Whipple's disease*. Aust N Z J Med, 1977. **7**(3): p. 294-8.
155. Garraud, O., et al., *Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses*. Trends Parasitol, 2003. **19**(7): p. 300-4.
156. Desnues, B., et al., *Whipple disease: intestinal infiltrating cells exhibit a transcriptional pattern of M2/alternatively activated macrophages*. J Infect Dis, 2005. **192**(9): p. 1642-6.
157. Moos, V., et al., *Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease*. Gastroenterology, 2010. **138**(1): p. 210-20.
158. Etzerodt, A. and S.K. Moestrup, *CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects*. Antioxid Redox Signal, 2012.
159. Biswas, S.K. and E. Lopez-Collazo, *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance*. Trends Immunol, 2009. **30**(10): p. 475-87.
160. Sanchez-Madrid, F., et al., *A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule*. J Exp Med, 1983. **158**(6): p. 1785-1803.
161. Marth, T., et al., *Persistent reduction of complement receptor 3 alpha-chain expressing mononuclear blood cells and transient inhibitory serum factors in Whipple's disease*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **72**(2): p. 217-26.
162. Bogdan, C., et al., *Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10*. J Biol Chem, 1992. **267**(32): p. 23301-8.
163. Joyce, D.A., et al., *Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(11): p. 2699-705.
164. Kropf, P., et al., *Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy*. Eur J Immunol, 2007. **37**(4): p. 935-45.
165. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
166. Schoedon, G., et al., *Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of Tropheryma whippelii*. J Infect Dis, 1997. **176**(3): p. 672-7.
167. Giacomini, E., et al., *Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7033-41.
168. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
169. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
170. Boutard, V., et al., *Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 2077-84.
171. Ash, D.E., *Structure and function of arginases*. J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.

172. Morris, S.M., Jr., *Arginine metabolism: boundaries of our knowledge*. J Nutr, 2007. **137**(6 Suppl 2): p. 1602S-1609S.
173. Feurle, G.E., N.S. Junga, and T. Marth, *Efficacy of ceftriaxone or meropenem as initial therapies in Whipple's disease*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 478-86; quiz 11-2.
174. Genest, J., *C-reactive protein: risk factor, biomarker and/or therapeutic target?* Can J Cardiol, 2010. **26 Suppl A**: p. 41A-44A.
175. Boss, B. and G. Neeck, *Correlation of IL-6 with the classical humoral disease activity parameters ESR and CRP and with serum cortisol, reflecting the activity of the HPA axis in active rheumatoid arthritis*. Z Rheumatol, 2000. **59 Suppl 2**: p. II/62-4.
176. Chomarat, P., et al., *IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 510-4.
177. Smith, P.D., et al., *Intestinal macrophages and response to microbial encroachment*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 31-42.
178. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS Lett, 2009. **583**(24): p. 3966-73.
179. Gu, L., et al., *Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 407-11.
180. Waldo, S.W., et al., *Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques*. Am J Pathol, 2008. **172**(4): p. 1112-26.
181. Rostasy, K.M., et al., *Distinct inflammatory properties of late-activated macrophages in inflammatory myopathies*. Acta Myol, 2008. **27**: p. 49-53.
182. Gratchev, A., et al., *Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages*. Scand J Immunol, 2005. **61**(1): p. 10-7.
183. Recalcati, S., et al., *Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 824-35.
184. Munder, M., K. Eichmann, and M. Modolell, *Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5347-54.
185. Han, I.H., et al., *Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with Trichomonas vaginalis*. Korean J Parasitol, 2009. **47**(3): p. 205-12.
186. Axel Martin Johann, *Dissertation: Anti-inflammatorische Signalwege nach der Phagozytose apoptotischer Zellen in Makrophagen*, 2006: Technische Universität Kaiserslautern.

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>T. whipplei</i> .....	6
Abb. 2: Polarisierung von Makrophagen .....	12
Abb. 3: Die drei Wege der Antigenpräsentation .....	14
Abb. 4: Einfluss von iNOS und Arginase auf den L-Argininmetabolismus .....	16
Abb. 5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pGEX-2T .....	31
Abb. 6: Schematische Darstellung der Zellpopulationen im FSC/SSC-Dot Plot .....	32
Abb. 7: Aufbau eines Durchflusszytometers .....	33
Abb. 8: Ablauf eines Phagozytostest mit <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen .....	43
Abb. 9: Analyseschema für die Auswertung eines Proliferationstest am Beispiel einer gesunden Kontrolle.....	45
Abb. 10: Testprinzip zum Nachweis von Nitrit- und Harnstoffproduktion und der Arginaseaktivität in <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen.....	46
Abb. 11: Nachweis von Nitrit mit Griess-Reagenz .....	48
Abb. 12: Schema des FlowCytomix Systems.....	50
Abb. 13: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung .....	54
Abb. 14: IFN $\gamma$ Produktion von aktivierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut nach Antigen- stimulation .....	56
Abb. 15: Bestimmung von Immunglobulinen in Serumproben und duodenalen Biopsien.....	58
Abb. 16: Phänotypisierung der Monozyten im Vollblut <i>ex vivo</i> .....	59
Abb. 17: Messung des Darm- <i>homing</i> Markers Integrin- $\beta$ 7 auf Monozyten im Vollblut .....	60
Abb. 18: Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten nach Antigen- stimulation .....	62
Abb. 19: Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten nach Antigen- stimulation .....	63
Abb. 20: Ratio zwischen IL-6 und IL-10 Produktion in Monozyten nach LPS Stimulation .....	64
Abb. 21: Phänotypisierung der Makrophagen in der Lamina propria .....	65
Abb. 22: Zytokinmilieu in der Lamina propria .....	66
Abb. 23: Bestimmung der Arginaseaktivität in frisch isolierten duodenalen Biopsien .....	67
Abb. 24: Nitrit- und Harnstoffnachweis in Biopsieüberständen nach Stimulation mit LPS .....	68
Abb. 25: Arginaseaktivität im Serum .....	69
Abb. 26: Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine in Serumproben und duodenalen Biopsien.....	70
Abb. 27: Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine in Serumproben und duodenalen Biopsien.....	71
Abb. 28: Bestimmung von Chemokinen in Serumproben und duodenalen Biopsien.....	73
Abb. 29: Phänotypisierung der <i>in vitro</i> differenzierten M1 und M2 Makrophagen.....	74
Abb. 30: Phagozytose von Dextran und Transferrin Partikel von M1 und M2 Makrophagen.....	75
Abb. 31: Bestimmung der Nitritproduktion in Kulturüberständen und die Bestimmung der Arginaseaktivität von <i>in vitro</i> differenzierten M1 und M2 Makrophagen.....	76
Abb. 32: Funktioneller Nachweis der Antigenpräsentation von <i>in vitro</i> differenzierten M1 und M2 Makrophagen nach <i>T. whipplei</i> Stimulation.....	78
Abb. 33: Funktioneller Nachweis der Antigenpräsentation von <i>in vitro</i> differenzierten M1 und M2 Makrophagen nach hCMV Stimulation .....	79
Abb. 34: Zytokinproduktion in Kulturüberständen <i>in vitro</i> differenzierter M1 und M2 Makrophagen nach <i>T. whipplei</i> Stimulation.....	80
Abb. 35: Änderung des Phänotyps beim Wechsel der Makrophagenpolarisierung .....	81
Abb. 36: Bestimmung der Zytokine nach der Stimulation mit LPS beim Wechsel der Makrophagenpolarisierung.....	82

## 8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Molekulares Repertoire von M1 versus M2 Makrophagen .....	13
Tab. 2: Zusammensetzung von Puffer und Medien .....	24
Tab. 3: Kommerzielle Komplettsysteme .....	24
Tab. 4: Verwendete Antigene.....	25
Tab. 5: Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	26
Tab. 6: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie .....	26
Tab. 7: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie .....	27
Tab. 8: Verwendete Antikörper zur magnetischen Zellisolation .....	28
Tab. 9: Patientenübersicht der verwendeten Proben .....	29
Tab. 10: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome.....	33
Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Phänotypisierung der <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen.....	40
Tab. 12: Übersicht über die verwendeten Zytokine für den Wechsel der Makrophagen- polarisierung.....	41
Tab. 13: Zellzahlverhältnisse zwischen Makrophagen und T-Zellen beim Proliferations- test.....	43
Tab. 14: Übersicht über die verwendeten Antikörper beim Proliferationstest .....	44
Tab. 15: Übersicht der nachgewiesenen Zytokine, Chemokine und Immunglobulinklassen in Seren und Biopsie-Überständen .....	51
Tab. 16: Protokollübersicht der nachgewiesenen Proteine in der Histochemie .....	53
Tab. 17: Verwendete Software.....	54

### 8.3. Danksagung

Für die Aufgabenstellung, die Anleitung und Beratung zur richtigen Vorgehensweise bei den Experimenten und für die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Thomas Schneider vielmals danken.

Prof. Dr. Blankenstein danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit, seine Offenheit und die hilfreichen Anregungen bei SFB-Treffen.

Ferner möchte ich mich bei allen Morbus Whipple Patienten bedanken, die uns auch gerne außer der Reihe mit Blutproben versorgt haben. Bekannten und Mitarbeitern, die sich als Kontrollpersonen im Laufe dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben, danke ich für die ein oder andere Blutspende.

Mein größter Dank geht an Dr. Verena Moos für die uneingeschränkte Unterstützung sowohl im Labor als auch beim Anfertigen dieser Arbeit. Von ihr habe ich viel gelernt und sie hat einen immensen Anteil am Gelingen dieser Dissertation. Danke für den täglichen Ansporn, die konstruktiven Debatten und all die persönlichen Gespräche.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen innerhalb und außerhalb des Labors bedanken, ohne die diese Arbeit nicht hätte gelingen können. Besonders die tolle Arbeitsatmosphäre im und außerhalb des Labors hat diese Zeit unvergesslich gemacht. Vielen Dank an alle, die dazu beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich mich bei Kristina Conrad, Katina Schinnerling, Diana Bösel, Martina Seipel, Kristina Allers, Nadine Gehrman, Mira Fehr und Julian Friebel für die wertvollen Tipps um den Laboraltag zu meistern bedanken. Auch außerhalb des Labors hatten wir viel Spaß. Vielen Dank dafür.

Elisabeth Nietz, Kristina Conrad, Marlies Knospe, Katharina Tomuzia, Christian Holdack und Friederike Wirth danke ich ganz herzlich für die Korrektur des Manuskripts. Es war sicherlich kein Zuckerschlecken.

Meinen Eltern gilt mein ganz besonderer Dank für die jahrelange Unterstützung all meiner Träume, ihr reges Interesse über die gesamte Zeit meiner naturwissenschaftlichen Ausbildung und für die Betreuung meiner Tochter Lenya während der Anfertigung dieser Dissertation. Meinen Ehemann Ingolf Karsch danke ich für den Beistand, die Ermutigungen in jeglichen Lebenslagen, seinen Glauben an meine Fähigkeiten und seine bedingungslose Liebe. Danke für Alles!